

(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2008-506366

(P2008-506366A)

(43) 公表日 平成20年3月6日(2008.3.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705	4 B O 6 5
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 6
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 180 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-513460 (P2007-513460)	(71) 出願人	506331147
(86) (22) 出願日	平成17年5月13日 (2005. 5. 13)		レセプター バイオロジックス インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成19年1月12日 (2007. 1. 12)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州,
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/017051		サウス サン フランシスコ, スイート
(87) 国際公開番号	W02005/113596		エー. ヴェテランズ ブルヴァード
(87) 国際公開日	平成17年12月1日 (2005. 12. 1)		1 1 4 0
(31) 優先権主張番号	60/571, 289	(74) 代理人	100094318
(32) 優先日	平成16年5月14日 (2004. 5. 14)		弁理士 山田 行一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100123995
(31) 優先権主張番号	60/580, 990		弁理士 野田 雅一
(32) 優先日	平成16年6月18日 (2004. 6. 18)	(72) 発明者	ジン, ペイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州,
(31) 優先権主張番号	60/666, 825		パロ アルト, ユニット ディー, カ
(32) 優先日	平成17年3月30日 (2005. 3. 30)		ートナー アヴェニュー 3 2 0
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞表面受容体アイソフォームならびにその同定および使用方法

(57) 【要約】

受容体チロシンキナーゼのアイソフォームを含めた細胞表面受容体のアイソフォームおよび受容体チロシンキナーゼのアイソフォームを含む薬剤組成物を提供する。一部分、たとえば1つの細胞表面受容体由来の細胞外ドメインまたはその一部、および第2の細胞表面タンパク質由来の第2の部分、特にイントロンにコードされた部分を含む細胞表面受容体を含む、キメラならびにコンジュゲートも提供する。アイソフォームは、細胞表面受容体の活性を変調する。受容体チロシンキナーゼを含めた細胞表面受容体のアイソフォームの同定方法および調製方法を提供する。また、細胞表面受容体アイソフォームを用いた治療方法も提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

E p h A 受容体の少なくとも 1 つのドメインを含む単離したポリペプチドであって、エフリンリガンド結合ドメインを含んでおり、E p h A 受容体の膜貫通ドメインに対応する 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、それによって E p h A 受容体と比較してポリペプチドの膜局在化が低下または消滅している、ポリペプチド。

【請求項 2】

E p h A 受容体が E p h A 1、E p h A 2、E p h A 3、E p h A 4、E p h A 5、E p h A 6、E p h A 7、および E p h A 8 からなる群から選択される、請求項 1 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 3】

E p h A 受容体が配列番号 2 5 3 ~ 2 6 0 のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含むか、またはその対立遺伝子変異体である、請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

対立遺伝子変異体が配列番号 2 8 9 ~ 2 9 3 のいずれか 1 つに記載の対立遺伝子変異のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

ポリペプチドが、E p h A 受容体と比較してプロテインキナーゼドメインの全体または一部を欠いている、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 6】

20

ポリペプチドが、E p h A 受容体と比較して不稔性 α モチーフドメイン (S A M) の全体または一部を欠いている、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 7】

配列番号 2 5 3 に記載の E p h A 1 受容体の少なくとも 1 つのドメインを含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含むポリペプチドであって、イントロンが E p h A 1 受容体をコードしている遺伝子由来である、請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

ポリペプチドが、E p h A 1 受容体をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した E p h A 1 受容体の少なくとも 1 つのドメインを含む、請求項 7 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 10】

ポリペプチドが、E p h A 1 受容体のプロテインキナーゼドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、それによって E p h A 1 受容体と比較してポリペプチドのキナーゼ活性が低下または消滅している、請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 11】

ポリペプチドが、配列番号 1 4 9、1 5 1 および 1 5 3 のいずれかに記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する、請求項 10 に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

40

配列番号 1 4 9、1 5 1 および 1 5 3 のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、またはその対立遺伝子変異体である、請求項 11 に記載のポリペプチド。

【請求項 13】

対立遺伝子変異体が配列番号 2 8 9 に記載の対立遺伝子変異のうちの 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 12 に記載のポリペプチド。

【請求項 14】

ポリペプチドが、配列番号 1 4 9、1 5 1 および 1 5 3 のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 7 ~ 13 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 15】

配列番号 2 5 4 に記載の E p h A 2 受容体の少なくとも 1 つのドメインを含むポリペプ

50

チドであって、E p h A 2 受容体と比較して膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインの1つまたは複数のアミノ酸を欠いており、それによってE p h A 2 受容体と比較して膜局在化およびポリペプチドのプロテインキナーゼ活性が低下または消滅している、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項16】

イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含むポリペプチドであって、イントロンがE p h A 2 受容体をコードしている遺伝子由来である、請求項15に記載のポリペプチド。

【請求項17】

ポリペプチドが、E p h A 2 受容体をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも1つのアミノ酸に動作可能に連結したE p h A 2 受容体の少なくとも1つのドメインを含む、請求項15に記載のポリペプチド。

10

【請求項18】

ポリペプチドが、E p h A 2 受容体と比較してフィブロネクチンドメインの1つまたは複数のアミノ酸を欠いている、請求項15～17のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項19】

ポリペプチドが、配列番号168に記載のアミノ酸の配列と少なくとも80%の配列同一性を有する、請求項18に記載のポリペプチド。

【請求項20】

配列番号168に記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、請求項19に記載のポリペプチド。

20

【請求項21】

対立遺伝子変異体が、配列番号290に記載の対立遺伝子変異の1つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項20に記載のポリペプチド。

【請求項22】

ポリペプチドが配列番号168に記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項15～21のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項23】

E p h B 受容体の少なくとも1つのドメインを含む単離したポリペプチドであって、E p h B 受容体と比較して膜貫通ドメインの1つまたは複数のアミノ酸を欠いており、それによってE p h B 受容体と比較してポリペプチドの膜局在化が低下または消滅している、ポリペプチド。

30

【請求項24】

E p h B 受容体が、E p h B 1、E p h B 2、E p h B 3、E p h B 4、E p h B 5、およびE p h B 6からなる群から選択される、請求項23に記載のポリペプチド。

【請求項25】

E p h B 受容体が、配列番号261～265のいずれか1つに記載のアミノ酸の配列またはその対立遺伝子変異体を含む、請求項24に記載のポリペプチド。

【請求項26】

対立遺伝子変異体が、配列番号294～298のいずれか1つに記載の対立遺伝子変異のうちの1つまたは複数を含む、請求項25に記載のポリペプチド。

40

【請求項27】

E p h B 受容体のプロテインキナーゼドメインの1つまたは複数のアミノ酸を欠いており、それによってE p h B 受容体と比較してポリペプチドのプロテインキナーゼ活性が低下または消滅している、請求項23～26のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項28】

ポリペプチドが、E p h B 受容体の不穏性 α モチーフドメイン(SAM)の1つまたは複数のアミノ酸を欠いている、請求項23～27のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項29】

ポリペプチドがエフリンリガンド結合ドメインを含む、請求項23～28のいずれかに

50

記載のポリペプチド。

【請求項 30】

ポリペプチドが、E p h B 受容体のフィブロネクチンドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いている、請求項 23～29 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 31】

ポリペプチドがイントロンにコードされたアミノ酸の配列を含んでおり、イントロンが E p h B 受容体をコードしている遺伝子由来である、請求項 23～30 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 32】

ポリペプチドが、E p h B 受容体をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した E p h B 受容体の少なくとも 1 つのドメインを含む、請求項 31 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 33】

ポリペプチドが、配列番号 155、170、172 および 174 のいずれかに記載のアミノ酸の配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する、請求項 23～32 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 34】

配列番号 155、170、172 および 174 のいずれかに記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、請求項 33 に記載のポリペプチド。

【請求項 35】

20

対立遺伝子変異体が、配列番号 294 または 297 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 34 に記載のポリペプチド。

【請求項 36】

ポリペプチドが、配列番号 155、170、172 および 174 のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 23～35 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 37】

F G F R-1 の少なくとも 1 つのドメインを含む単離したポリペプチドであって、配列番号 268 に記載の F G F R-1 のアミノ酸 253～357 に対応する免疫グロブリンドメインを含んでおり、F G F R-1 のアミノ酸 375～397 に対応する膜貫通ドメインの全体を欠いている、ポリペプチド。

30

【請求項 38】

イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含むポリペプチドであって、イントロンが F G F R-1 をコードしている遺伝子由来である、請求項 37 に記載のポリペプチド。

【請求項 39】

ポリペプチドが、F G F R-1 をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した F G F R-1 の少なくとも 1 つのドメインを含む、請求項 37 に記載のポリペプチド。

【請求項 40】

F G F R-1 のプロテインキナーゼドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、それによって F G F R-1 と比較してポリペプチドのプロテインキナーゼ活性が低下または消滅している、請求項 37～39 のいずれかに記載のポリペプチド。

40

【請求項 41】

ポリペプチドが、F G F R-1 のアミノ酸 156～246 に対応する免疫グロブリンドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 37～40 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 42】

ポリペプチドが、配列番号 119 または 176 に記載のアミノ酸の配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する、請求項 37～41 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 43】

配列番号 119 および 176 のいずれかに記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変

50

異体を含む、請求項 4 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 4】

対立遺伝子変異体が、配列番号 3 0 0 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 4 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 5】

ポリペプチドが、配列番号 1 1 9 または 1 7 6 に記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 3 7 ～ 4 4 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 4 6】

線維芽細胞成長因子受容体-2 (F G F R-2) の少なくとも 1 つのドメインを含む単離したポリペプチドであって、

F G F R-2 は配列番号 2 6 9 に記載のアミノ酸の配列を含んでおり；

ポリペプチドは F G F R-2 と比較して膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いており、それによって F G F R-2 と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅しており；かつ

ポリペプチドは配列番号 1 7 8、1 8 0、1 8 2 および 1 8 4 に記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する、

ポリペプチド。

【請求項 4 7】

イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含むポリペプチドであって、イントロンが F G F R-2 をコードしている遺伝子由来である、請求項 4 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 8】

ポリペプチドが、F G F R-2 をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した F G F R-2 の少なくとも 1 つのドメインを含む、請求項 4 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 9】

ポリペプチドが、F G F R-2 のアミノ酸 4 1 ～ 1 2 5 に対応する免疫グロブリンドメインを欠いている、請求項 4 6 ～ 4 8 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 5 0】

配列番号 1 7 8、1 8 0、1 8 2 または 1 8 4 に記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、請求項 4 6 ～ 4 8 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 5 1】

対立遺伝子変異体が配列番号 3 0 1 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 5 0 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 2】

ポリペプチドが、配列番号 1 7 8、1 8 0、1 8 2 および 1 8 4 のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 4 6 ～ 5 1 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 5 3】

F G F R-4 の少なくとも 1 つのドメインを含む単離したポリペプチドであって、配列番号 2 7 1 に記載の F G F R-4 のアミノ酸 2 4 9 ～ 3 5 1 に対応する免疫グロブリンドメインを含んでおり、F G F R-4 の膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いており、それによって F G F R-4 と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅している、ポリペプチド。

【請求項 5 4】

イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含むポリペプチドであって、イントロンが F G F R-4 をコードしている遺伝子由来である、請求項 5 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 5】

ポリペプチドが、F G F R-4 をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した F G F R-4 の少なくとも 1 つのドメインを含む、請求項 5 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 6】

10

20

30

40

50

ポリペプチドが、配列番号 1 2 1 に記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する、請求項 5 3 ~ 5 5 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 5 7】

配列番号 1 2 1 に記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、請求項 5 3 ~ 5 6 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 5 8】

対立遺伝子変異体が配列番号 3 0 3 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 5 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 9】

ポリペプチドが配列番号 1 2 1 に記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 5 3 ~ 5 8 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 6 0】

配列番号 2 5 0 に記載の D D R 1 の少なくとも 1 つのドメインを含む単離したポリペプチドであって、D D R 1 と比較して膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いており、それによって D D R 1 と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅しており、配列番号 1 1 5 または 1 1 7 に記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する、ポリペプチド。

【請求項 6 1】

イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含むポリペプチドであって、イントロンが D D R 1 をコードしている遺伝子由来である、請求項 6 0 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 2】

ポリペプチドが、D D R 1 をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した D D R 1 の少なくとも 1 つのドメインを含む、請求項 6 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 3】

配列番号 1 1 5 または 1 1 7 に記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、請求項 6 0 ~ 6 2 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 6 4】

対立遺伝子変異体が配列番号 2 8 6 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 6 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 5】

ポリペプチドが配列番号 1 1 5 または 1 1 7 に記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 6 0 ~ 6 4 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 6 6】

M E T 受容体の少なくとも 1 つのドメインを含む単離したポリペプチドであって、ポリペプチドは、M E T をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した M E T の少なくとも 1 つのドメインを含んでおり；かつ

ポリペプチドは、配列番号 2 7 4 に記載の M E T 受容体と比較して膜貫通ドメイン、プロテインキナーゼドメインおよび少なくとも 1 つの追加のドメインを欠いており、それによって M E T 受容体と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅している、

ポリペプチド。

【請求項 6 7】

イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含むポリペプチドであって、イントロンが M E T をコードしている遺伝子由来である、請求項 6 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 8】

ポリペプチドが、M E T をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した M E T の少なくとも 1 つのドメインを含む、請求項 6 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 69】

追加のドメインが S e m a ドメイン、プレキシンドメインおよび I P T / T I G ドメインからなる群から選択される、請求項 66～68 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 70】

ポリペプチドが、配列番号 186、188、190、192、196、198、200、202、204、206、208 および 214 のいずれかに記載のアミノ酸の配列と少なくとも 80% の配列同一性を有する、請求項 66～69 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 71】

配列番号 186、188、190、192、196、198、200、202、204、206、208 および 214 のいずれかに記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、請求項 66～70 のいずれかに記載のポリペプチド。

10

【請求項 72】

対立遺伝子変異体が配列番号 306 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 71 に記載のポリペプチド。

【請求項 73】

ポリペプチドが、配列番号 186、188、190、192、196、198、200、202、204、206、208 および 214 のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 66～72 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 74】

R O N 受容体の少なくとも 1 つのドメインを含む単離したポリペプチドであって、ポリペプチドは、R O N 受容体配列番号 277 に記載のプレキシンドメインを含んでおり；かつ

20

ポリペプチドは R O N 受容体の膜貫通ドメインを欠いており、それによって R O N 受容体と比較してポリペプチドの膜局在化が低下または消滅している、

ポリペプチド。

【請求項 75】

イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含むポリペプチドであって、イントロンが R O N 受容体をコードしている遺伝子由来である、請求項 74 に記載のポリペプチド。

【請求項 76】

ポリペプチドが、R O N をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した R O N の少なくとも 1 つのドメインを含む、請求項 74 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 77】

ポリペプチドが、配列番号 277 に記載の R O N 受容体と比較してプロテインキナーゼドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、それによって R O N 受容体と比較してポリペプチドのプロテインキナーゼ活性が低下または消滅している、請求項 74～76 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 78】

ポリペプチドが、R O N 受容体の少なくとも 1 つの I P T / T I G ドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 74～77 のいずれかに記載のポリペプチド。

40

【請求項 79】

ポリペプチドが、配列番号 216、218 および 220 のいずれかに記載のアミノ酸の配列と少なくとも 80% の配列同一性を有する、請求項 74～78 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 80】

配列番号 216、218 および 220 のいずれかに記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、請求項 74～79 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 81】

対立遺伝子変異体が配列番号 308 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ

50

酸を含む、請求項 80 に記載のポリペプチド。

【請求項 82】

ポリペプチドが、配列番号 216、218 および 220 のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 74～81 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 83】

配列番号 278 に記載の T E K 受容体の少なくとも 1 つのドメインを含む単離したポリペプチドであって、

ポリペプチドは膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いており、それによって T E K 受容体と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅しており；かつ

ポリペプチドは、T E K 受容体と比較して少なくとも 1 つのフィブロネクチンドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いている、

ポリペプチド。

【請求項 84】

イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含むポリペプチドであって、イントロンが T E K 受容体をコードしている遺伝子由来である、請求項 83 に記載のポリペプチド。

【請求項 85】

ポリペプチドが、T E K 受容体をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した T E K 受容体の少なくとも 1 つのドメインを含む、請求項 83 に記載のポリペプチド。

【請求項 86】

ポリペプチド中に欠いているフィブロネクチンドメインが、配列番号 278 のアミノ酸 444～529、543～626、または 639～724 に対応する、請求項 83～85 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 87】

ポリペプチドが、配列番号 278 のアミノ酸 444～529、543～626、および 639～724 に対応する T E K 受容体の 3 つのフィブロネクチンドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いている、請求項 83～86 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 88】

ポリペプチドが、配列番号 131 および 133 のいずれかに記載のアミノ酸の配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する、請求項 83～87 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 89】

配列番号 131 および 133 のいずれかに記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、請求項 83～88 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 90】

対立遺伝子変異体が配列番号 309 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 89 に記載のポリペプチド。

【請求項 91】

ポリペプチドが、配列番号 131 および 133 のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 83～90 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 92】

配列番号 279 に記載の T i e - 1 受容体の少なくとも 1 つのドメインの全体または一部を含む単離したポリペプチドであって、

ポリペプチドは、T i e - 1 受容体と比較して膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いており、それによって T i e - 1 受容体と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅しており；かつ

ポリペプチドは、配列番号 135、137、139、141、143 および 222 のいずれかに記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、

ポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 9 3】

対立遺伝子変異体が配列番号 3 1 0 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 9 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 9 4】

ポリペプチドが、配列番号 1 3 5、1 3 7、1 3 9、1 4 1、1 4 3 および 2 2 2 のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 9 2 または 9 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 9 5】

単離したポリペプチドであって、

ポリペプチドは、配列番号 1 2 3 に記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含んでおり；かつ

ポリペプチドは、配列番号 2 8 2 に記載の V E G F R - 1 受容体と比較して膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いている、

ポリペプチド。

【請求項 9 6】

配列番号 1 2 3 に記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、請求項 9 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 9 7】

ポリペプチドが配列番号 1 2 3 に記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 9 5 ~ 9 6 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 9 8】

配列番号 2 8 3 および 2 8 4 のいずれかに記載の V E G F R の少なくとも 1 つのドメインを含む単離したポリペプチドであって、V E G F R の膜貫通ドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、それによって V E G F R と比較してポリペプチドの膜局在化が低下または消滅している、ポリペプチド。

【請求項 9 9】

イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含むポリペプチドであって、イントロンが V E G F R をコードしている遺伝子由来である、請求項 9 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 0 0】

ポリペプチドが、V E G F R をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した V E G F R の少なくとも 1 つのドメインを含む、請求項 9 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 0 1】

ポリペプチドが、プロテインキナーゼドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、それによって V E G F R と比較してポリペプチドのプロテインキナーゼ活性が低下または消滅している、請求項 9 8 ~ 1 0 0 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 0 2】

ポリペプチドが、V E G F R と比較して免疫グロブリンドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いている、請求項 9 8 ~ 1 0 1 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 0 3】

ポリペプチドが、配列番号 1 2 5、1 2 7、2 2 4 および 2 2 6 のいずれかに記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する、請求項 1 0 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 0 4】

配列番号 1 2 5、1 2 7、2 2 4 および 2 2 6 のいずれかに記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、請求項 9 9 ~ 1 0 3 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 0 5】

対立遺伝子変異体が、配列番号 3 1 3 または 3 1 4 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 1 0 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 0 6】

ポリペプチドが、配列番号 125、127、224 および 226 のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 99～105 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 107】

配列番号 276 に記載の PDGFR-B の少なくとも 1 つのドメインを含む単離したポリペプチドであって、PDGFR-B の膜貫通ドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、それによって PDGFR-B と比較してポリペプチドの膜局在化が低下または消滅している、ポリペプチド。

【請求項 108】

イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含むポリペプチドであって、イントロンが PDGFR-B をコードしている遺伝子由来である、請求項 107 に記載のポリペプチド

10

【請求項 109】

ポリペプチドが、PDGFR-B をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した PDGFR-B の少なくとも 1 つのドメインを含む、請求項 107 に記載のポリペプチド。

【請求項 110】

ポリペプチドが、PDGFR-B のプロテインキナーゼドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、それによって PDGFR-B と比較してポリペプチドのプロテインキナーゼ活性が低下または消滅している、請求項 107～109 のいずれかに記載のポリペプチド。

20

【請求項 111】

ポリペプチドが、PDGFR-B の免疫グロブリンドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 107～110 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 112】

ポリペプチドが配列番号 147 に記載のアミノ酸の配列と少なくとも 80% の配列同一性を有する、請求項 107～111 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 113】

配列番号 147 に記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、請求項 107～112 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 114】

対立遺伝子変異体が配列番号 307 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 113 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 115】

ポリペプチドが配列番号 147 に記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 107～114 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 116】

配列番号 249 に記載の CSF1R の少なくとも 1 つのドメインを含む単離したポリペプチドであって、CSF1R の膜貫通ドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、CSF1R と比較してポリペプチドの膜局在化が低下または消滅している、ポリペプチド。

40

【請求項 117】

イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含むポリペプチドであって、イントロンが CSF1R をコードしている遺伝子由来である、請求項 116 に記載のポリペプチド。

【請求項 118】

ポリペプチドが、CSF1R をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した CSF1R の少なくとも 1 つのドメインを含む、請求項 117 に記載のポリペプチド。

【請求項 119】

ポリペプチドが、CSF1R のプロテインキナーゼドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、それによって CSF1R と比較してポリペプチドのプロテインキナーゼ

50

活性が低下または消滅している、請求項 1 1 6 ～ 1 1 8 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 0】

ポリペプチドが、C S F 1 R の免疫グロブリンドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 1 1 6 ～ 1 1 9 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 1】

ポリペプチドが配列番号 1 4 5 に記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する、請求項 1 1 6 ～ 1 2 0 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 2】

配列番号 1 4 5 に記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、請求項 1 1 6 ～ 1 2 1 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 3】

対立遺伝子変異体が配列番号 2 8 5 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 1 2 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 4】

ポリペプチドが配列番号 1 4 5 に記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 1 1 6 ～ 1 2 3 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 5】

配列番号 2 7 3 に記載の K I T 受容体の少なくとも 1 つのドメインを含んでおり、かつ K I T 受容体の膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いている単離したポリペプチドであって、それによって K I T 受容体と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅している、ポリペプチド。

【請求項 1 2 6】

イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含むポリペプチドであって、イントロンが K I T 受容体をコードしている遺伝子由来である、請求項 1 2 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 7】

ポリペプチドが、K I T 受容体をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した K I T 受容体の少なくとも 1 つのドメインを含む、請求項 1 2 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 8】

ポリペプチドが K I T 受容体の少なくとも 1 つの免疫グロブリンドメインを含む、請求項 1 2 5 ～ 1 2 7 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 9】

ポリペプチドが配列番号 9 3 に記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する、請求項 1 2 5 ～ 1 2 8 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 3 0】

配列番号 9 3 に記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、請求項 1 2 5 ～ 1 2 9 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 3 1】

対立遺伝子変異体が配列番号 3 0 5 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 1 3 0 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 3 2】

ポリペプチドが配列番号 9 3 に記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 1 2 5 ～ 1 3 1 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 3 3】

配列番号 2 8 0 または 2 8 1 に記載の T N F R の少なくとも 1 つのシステインに富んだ c 6 ドメインを含んでおり、かつ T N F R の膜貫通ドメインの全体を欠いている単離したポリペプチドであって、それによって T N F R と比較してポリペプチドの膜局在化が低下または消滅している、ポリペプチド。

【請求項 1 3 4】

イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含むポリペプチドであって、イントロンが T N F R をコードしている遺伝子由来である、請求項 1 3 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 3 5】

ポリペプチドが、T N F R をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した T N F R の少なくとも 1 つのドメインを含む、請求項 1 3 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 3 6】

ポリペプチドが、T N F R の少なくとも 2 つのシステインに富んだ c 6 ドメインを含む、請求項 1 3 3 ～ 1 3 5 のいずれかに記載のポリペプチド。

10

【請求項 1 3 7】

ポリペプチドが配列番号 9 5 に記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する、請求項 1 3 3 ～ 1 3 6 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 3 8】

配列番号 9 5 に記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、請求項 1 3 3 ～ 1 3 7 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 3 9】

対立遺伝子変異体が配列番号 3 1 2 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 1 3 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 4 0】

ポリペプチドが配列番号 9 5 に記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 1 3 3 ～ 1 3 9 のいずれかに記載のポリペプチド。

20

【請求項 1 4 1】

ポリペプチドが細胞表面受容体の生物学的機能を変調する、請求項 1 ～ 1 4 0 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 4 2】

ポリペプチドが同族受容体の生物学的機能を変調する、請求項 1 4 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 4 3】

ポリペプチドによって変調される活性が、二量体化、ホモ二量体化、ヘテロ二量体化、三量体化、キナーゼ活性、受容体関連キナーゼの活性、受容体関連プロテアーゼの活性、細胞表面受容体の自己リン酸化、細胞表面受容体のリン酸転移、シグナル伝達分子のリン酸化、リガンド結合、リガンド結合に対する細胞表面受容体との競合、シグナル伝達、シグナル伝達分子との相互作用、アポトーシスの誘導、膜会合および膜局在化のうちの 1 つまたは複数である、請求項 1 4 1 または請求項 1 4 2 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 1 4 4】

請求項 1 ～ 1 4 3 のいずれかに記載のポリペプチドを含む薬剤組成物。

【請求項 1 4 5】

細胞表面受容体の活性を変調するために有効な量のポリペプチドを含む、請求項 1 4 4 に記載の組成物。

40

【請求項 1 4 6】

ポリペプチドが同族受容体の生物学的機能を変調する、請求項 1 4 5 に記載の組成物。

【請求項 1 4 7】

ポリペプチドによって変調される活性が、二量体化、ホモ二量体化、ヘテロ二量体化、三量体化、キナーゼ活性、受容体関連キナーゼの活性、受容体関連プロテアーゼの活性、細胞表面受容体の自己リン酸化、細胞表面受容体のリン酸転移、シグナル伝達分子のリン酸化、リガンド結合、リガンド結合に対する細胞表面受容体との競合、シグナル伝達、シグナル伝達分子との相互作用、アポトーシスの誘導、膜会合および膜局在化のうちの 1 つまたは複数である、請求項 1 4 5 または請求項 1 4 6 に記載の組成物。

【請求項 1 4 8】

50

変調が活性の阻害である、請求項 1 4 5～1 4 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 4 9】

組成物のポリペプチドが、受容体チロシンキナーゼまたは腫瘍壊死因子受容体と複合体形成する、請求項 1 4 5～1 4 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 5 0】

請求項 1～1 4 3 のいずれかに記載のポリペプチドをコードしている核酸の配列を含む核酸分子。

【請求項 1 5 1】

イントロンおよびエクソンを含む核酸分子であって、

イントロンはストップコドンを含み；

核酸分子は、エクソンとイントロンとの接合点にまたがるオープンリーディングフレームをコードしており；かつ

オープンリーディングフレームは、イントロン中のストップコドンで終結する、請求項 1 5 0 に記載の核酸分子。

【請求項 1 5 2】

イントロンが、コードされたポリペプチドの 1 つまたは複数のアミノ酸をコードしている、請求項 1 5 1 に記載の核酸分子。

【請求項 1 5 3】

ストップコドンがイントロンの最初のコドンである、請求項 1 5 1 または請求項 1 5 2 に記載の核酸分子。

【請求項 1 5 4】

配列番号 9 0、9 2、9 4、1 1 4、1 1 6、1 1 8、1 2 0、1 2 2、1 2 4、1 2 6、1 2 8、1 3 0、1 3 2、1 3 4、1 3 6、1 3 8、1 4 0、1 4 2、1 4 4、1 4 6、1 4 8、1 5 0、1 5 2、1 5 4、1 6 7、1 6 9、1 7 1、1 7 3、1 7 5、1 7 7、1 7 9、1 8 1、1 8 3、1 8 5、1 8 7、1 8 9、1 9 1、1 9 3、1 9 5、1 9 7、1 9 9、2 0 1、2 0 3、2 0 5、2 0 7、2 0 9、2 1 1、2 1 3、2 1 5、2 1 7、2 1 9、2 2 1、2 2 3 および 2 2 5 のいずれかに記載の核酸の配列またはその対立遺伝子変異体を含む、単離した核酸分子。

【請求項 1 5 5】

請求項 1 5 0～1 5 4 のいずれかに記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 1 5 6】

請求項 1 5 5 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 1 5 7】

請求項 1 4 4～1 4 9 のいずれかに記載の薬剤組成物を投与することを含む、疾患または状態の治療方法。

【請求項 1 5 8】

疾患または状態が、癌、炎症性疾患、感染症、血管形成関連状態（血管形成に関わる状態）、細胞増殖関連状態、細胞の過剰増殖に関わる状態、免疫障害および神経変性疾患からなる群から選択される、請求項 1 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 5 9】

疾患または状態が、関節リウマチ、多発性硬化症、眼球後部の炎症、ブドウ膜炎の障害、眼球表面の炎症性障害、血管新生病、増殖性硝子体網膜症、アテローム性動脈硬化症、関節リウマチ、血管腫、真性糖尿病、炎症性腸疾患、乾癬、アルツハイマー病、ループス、血管狭窄症、再狭窄、炎症性関節疾患、アテローム性動脈硬化症、尿路閉塞性症候群、および喘息からなる群から選択される、請求項 1 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 6 0】

疾患または状態が、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病、リンパ性悪性疾患、扁平細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌、胃癌、消化管癌、膵臓癌、膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌もしくは子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、

10

20

30

40

50

前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、および頭頸部癌からなる群から選択される、請求項 1 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 6 1】

疾患または状態にウイルスもしくは寄生虫による感染症が含まれる、請求項 1 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

ウイルスが、粘液腫ウイルス、ワクシニアウイルス、タナポックスウイルス、エプスタインバーウイルス、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルスサイミリ、B型肝炎ウイルス、アフリカブタ熱ウイルス、パロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）、C型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、デングウイルスおよびエボラウイルスからなる群から選択される、請求項 1 6 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 6 3】

薬剤組成物が、血管形成、細胞増殖、細胞遊走、ウイルス侵入、ウイルス感染症、腫瘍細胞成長または腫瘍細胞転移を阻害するポリペプチドを含む、請求項 1 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 6 4】

配列番号 9 1、9 3、9 5、1 1 5、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3、1 2 5、1 2 7、1 2 9、1 3 1、1 3 3、1 3 5、1 3 7、1 3 9、1 4 1、1 4 3、1 4 5、1 4 7、1 4 9、1 5 1、1 5 3、1 5 5、1 6 8、1 7 0、1 7 2、1 7 4、1 7 6、1 7 8、1 8 0、1 8 2、1 8 4、1 8 6、1 8 8、1 9 0、1 9 2、1 9 4、1 9 6、1 9 8、2 0 0、2 0 2、2 0 4、2 0 6、2 0 8、2 1 0、2 1 2、2 1 4、2 1 6、2 1 8、2 2 0、2 2 2、2 2 4 および 2 2 6 のいずれか 1 つの配列を含む、単離したポリペプチド。

20

【請求項 1 6 5】

本質的に配列番号 9 1、9 3、9 5、1 1 5、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3、1 2 5、1 2 7、1 2 9、1 3 1、1 3 3、1 3 5、1 3 7、1 3 9、1 4 1、1 4 3、1 4 5、1 4 7、1 4 9、1 5 1、1 5 3、1 5 5、1 6 8、1 7 0、1 7 2、1 7 4、1 7 6、1 7 8、1 8 0、1 8 2、1 8 4、1 8 6、1 8 8、1 9 0、1 9 2、1 9 4、1 9 6、1 9 8、2 0 0、2 0 2、2 0 4、2 0 6、2 0 8、2 1 0、2 1 2、2 1 4、2 1 6、2 1 8、2 2 0、2 2 2、2 2 4 および 2 2 6 のいずれか 1 つの配列からなる、単離したポリペプチド。

30

【請求項 1 6 6】

配列番号 9 1、9 3、9 5、1 1 5、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3、1 2 5、1 2 7、1 2 9、1 3 1、1 3 3、1 3 5、1 3 7、1 3 9、1 4 1、1 4 3、1 4 5、1 4 7、1 4 9、1 5 1、1 5 3 または 1 5 5 のいずれかに記載のアミノ酸の配列またはその対立遺伝子変異体と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含む単離したポリペプチドであって、

配列同一性は、単離したポリペプチドの完全長配列に対して、それぞれの配列番号の完全長に沿って比較し；

40

配列番号 9 1、9 3、9 5、1 1 5、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3、1 2 5、1 2 7、1 2 9、1 3 1、1 3 3、1 3 5、1 3 7、1 3 9、1 4 1、1 4 3、1 4 5、1 4 7、1 4 9、1 5 1、1 5 3 および 1 5 5 のそれぞれは細胞表面受容体アイソフォームである、

ポリペプチド。

【請求項 1 6 7】

配列番号 9 1、9 3、9 5、1 1 5、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3、1 2 5、1 2 7、1 2 9、1 3 1、1 3 3、1 3 5、1 3 7、1 3 9、1 4 1、1 4 3、1 4 5、1 4 7、1 4 9、1 5 1、1 5 3 または 1 5 5 のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含む、単離したポリペプチド。

50

【請求項 168】

ポリペプチドが、それが同一性を示す配列番号に記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 166 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 169】

ポリペプチドが哺乳動物内で生じる、請求項 166 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 170】

哺乳動物がげっ歯類、霊長類またはヒトである、請求項 169 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 171】

細胞表面受容体をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に動作可能に連結した細胞表面受容体の少なくとも 1 つのドメインを含む、単離したポリペプチドであって、

細胞表面受容体は、DDR1、KIT、FGFR-1、FGFR-4、TNFR2、VEGFR-1、VEGFR-3、RON、TEK、Tie-1、CSF1R、PDGFR-B、EphA1、および EphB1 からなる群から選択されるか；または

ポリペプチドは、配列番号 91、93、95、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153 および 155 からなる群から選択されるアミノ酸の配列を含む、

ポリペプチド。

【請求項 172】

膜貫通ドメインの少なくとも全体または一部を欠いている短縮した細胞表面受容体を含む単離したポリペプチドであって、

膜局在性ではなく；

細胞表面受容体の活性を変調し；

細胞表面受容体は、DDR1、KIT、FGFR-1、FGFR-4、TNFR2、VEGFR-1、VEGFR-3、RON、TEK、Tie-1、CSF1R、PDGFR-B、EphA1、および EphB1 からなる群から選択されるか、または単離したポリペプチドは、配列番号 91、93、95、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153 もしくは 155 のいずれかに記載のアミノ酸の配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有し；かつ

配列同一性は、単離したポリペプチドの完全長の配列に対して、それぞれの配列番号の完全長に沿って比較する、

ポリペプチド。

【請求項 173】

細胞表面受容体がさらに細胞表面受容体の細胞質ドメインを欠いている、請求項 172 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 174】

イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含む単離したポリペプチドであって、

イントロンは、KIT、FGFR-4、TNFR2、VEGFR-1、RON、TEK、Tie-1、および EphA1 からなる群から選択される細胞表面受容体の遺伝子由来であるか；または

配列番号 91、93、95、121、123、129、131、133、135、137、139、141、149、151 および 153 のいずれかのイントロンにコードされた配列であり；かつ

ポリペプチドは細胞表面受容体の細胞質ドメインを欠いている、

ポリペプチド。

【請求項 175】

ポリペプチドがさらに膜貫通ドメインを欠いている、請求項 174 に記載のポリペプチ

10

20

30

40

50

ド。

【請求項 176】

単離したポリペプチドが細胞表面受容体の生物学的機能を変調する、請求項 174 または請求項 175 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 177】

ポリペプチドが TNFR アイソフォームを含み、TNFR が、TNFR1、TNFR2、TNFRrp、低親和性の神経成長因子受容体、Fas 抗原、CD40、CD27、CD30、4-1BB、OX40、DR3、DR4、DR5、およびヘルペスウイルス侵入媒介物質 (HVEM) からなる群から選択される、請求項 166 ~ 176 のいずれかに記載の単離したポリペプチド。

10

【請求項 178】

請求項 171 ~ 177 のいずれかに記載のポリペプチドを含む薬剤組成物。

【請求項 179】

細胞表面受容体の活性を変調するために有効な量のポリペプチドを含む、請求項 178 に記載の組成物。

【請求項 180】

ポリペプチドによって変調される細胞表面受容体の活性が、二量体化、ホモ二量体化、ヘテロ二量体化、三量体化、キナーゼ活性、受容体関連キナーゼの活性、受容体関連プロテアーゼの活性、細胞表面受容体の自己リン酸化、細胞表面受容体のリン酸転移、シグナル伝達分子のリン酸化、リガンド結合、リガンド結合に対する細胞表面受容体との競合、シグナル伝達、シグナル伝達分子との相互作用、アポトーシスの誘導、膜会合および膜局在化のうちの 1 つまたは複数である、請求項 179 に記載の組成物。

20

【請求項 181】

変調が活性の阻害である、請求項 179 または請求項 180 に記載の組成物。

【請求項 182】

組成物のポリペプチドが、受容体チロシンキナーゼまたは腫瘍壊死因子受容体と複合体形成する、請求項 179 または請求項 180 に記載の組成物。

【請求項 183】

請求項 166 ~ 177 のいずれかに記載のポリペプチドをコードしている核酸分子。

【請求項 184】

イントロンおよびエクソンを含む核酸分子であって、
イントロンはストップコドンを含み；
核酸分子は、エクソンとイントロンとの接合点にまたがるオープンリーディングフレームをコードしており；かつ
オープンリーディングフレームは、イントロン中のストップコドンで終結する、
請求項 183 に記載の核酸分子。

30

【請求項 185】

イントロンが、コードされたポリペプチドの 1 つまたは複数のアミノ酸をコードしている、請求項 184 に記載の核酸分子。

【請求項 186】

ストップコドンがイントロンの最初のコドンである、請求項 184 または請求項 185 に記載の核酸分子。

40

【請求項 187】

配列番号 90、92、94、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152 または 154 のいずれかに記載のヌクレオチドの配列およびその対立遺伝子変異体と少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチドの配列を含む、単離した核酸分子であって、

配列同一性は、単離した核酸分子の完全長配列に対して、それぞれの配列番号の完全長に沿って比較し；かつ

50

配列番号 90、92、94、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152 および 154 のそれぞれは細胞表面受容体アイソフォームである、

核酸分子。

【請求項 188】

配列番号 90、92、94、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152 または 154 を含む単離した核酸分子。

【請求項 189】

請求項 183～188 のいずれかに記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 190】

請求項 189 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 191】

請求項 178～182 のいずれかに記載の薬剤組成物を投与することを含む、疾患または状態の治療方法。

【請求項 192】

疾患または状態が、癌、炎症性疾患、感染症、血管形成関連状態、細胞増殖関連状態、免疫障害および神経変性疾患からなる群から選択される、請求項 191 に記載の方法。

【請求項 193】

疾患または状態が、関節リウマチ、多発性硬化症、眼球後部の炎症、ブドウ膜炎の障害、眼球表面の炎症性障害、血管新生、増殖性硝子体網膜症、アテローム性動脈硬化症、関節リウマチ、血管腫、真性糖尿病、炎症性腸疾患、乾癬、アルツハイマー病、ループス、血管狭窄症、再狭窄、炎症性関節疾患、アテローム性動脈硬化症、尿路閉塞性症候群、および喘息からなる群から選択される、請求項 191 に記載の方法。

【請求項 194】

疾患または状態が、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病、リンパ性悪性疾患、扁平細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌、胃癌、消化管癌、膵臓癌、膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌もしくは子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、および頭頸部癌からなる群から選択される、請求項 191 に記載の方法。

【請求項 195】

疾患または状態がウイルスもしくは寄生虫による感染症である、請求項 191 に記載の方法。

【請求項 196】

ウイルスが、粘液腫ウイルス、ワクシニアウイルス、タナポックスウイルス、エプスタインバーウイルス、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルスサイミリ、B型肝炎ウイルス、アフリカブタ熱ウイルス、パロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、C型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、デングウイルスおよびエボラウイルスからなる群から選択される、請求項 195 に記載の方法。

【請求項 197】

薬剤組成物が、血管形成、細胞増殖、細胞遊走、ウイルス侵入、ウイルス感染症、腫瘍細胞成長または腫瘍細胞転移を阻害するポリペプチドを含む、請求項 191 に記載の方法。

【請求項 198】

細胞または組織を、*in vitro* または *in vivo* で、CSR の 1 つもしくは複数のドメインまたは活性を欠いている細胞表面受容体アイソフォーム（CSR）と接触させることを含む、発生および／あるいは病状の調節方法であって、CSR が血管形成ま

10

20

30

40

50

たは発生に關与している方法。

【請求項 199】

C S R がイントロン融合タンパク質である、請求項 198 に記載の方法。

【請求項 200】

1 つの細胞表面受容体 (C S R) アイソフォームの一部分および第 2 の異なる C S R アイソフォームの一部分を含むキメラポリペプチドであって、

キメラアイソフォームは、1 つまたは複数のチロシンキナーゼ受容体の活性を変調し；かつ

それぞれの部分が少なくとも 4、5、6、7、8、10、12、15 個以上のアミノ酸残基を含む、

キメラポリペプチド。

【請求項 201】

第 1 および第 2 の細胞表面受容体アイソフォームが、請求項 1～143 および 165～177 のいずれかに記載のポリペプチドから選択されたポリペプチドを含むか、またはヘルスタチンポリペプチドである、請求項 200 に記載のポリペプチド。

【請求項 202】

第 1 の部分が細胞表面受容体の細胞外ドメインの全体または一部を含み、第 2 の部分がイントロン融合タンパク質由来のイントロンを含む、請求項 200 または請求項 201 に記載のポリペプチド。

【請求項 203】

イントロンにコードされた部分がヘルスタチンのイントロンにコードされた部分である、請求項 201 に記載のポリペプチド。

【請求項 204】

イントロンが配列番号 320～359 のいずれかに記載されている、請求項 203 に記載のポリペプチド。

【請求項 205】

イントロン融合ポリペプチドのイントロンにコードされた部分に直接またはリンカーを介して連結された、第 1 の部分を含むコンジュゲートであって、その結果生じるポリペプチドが細胞表面受容体の活性を変調するコンジュゲート。

【請求項 206】

第 1 の部分が任意の細胞表面受容体 (C S R) の細胞外ドメインの全体または一部である、請求項 205 に記載のコンジュゲート。

【請求項 207】

C S R が受容体チロシンキナーゼである、請求項 206 に記載のコンジュゲート。

【請求項 208】

第 1 および第 2 の部分が、請求項 1～143 および 164～177 のいずれかに記載のポリペプチド由来であるか、またはヘルスタチン由来であり、その一部分がヘルスタチン由来である場合、第 1 もしくは第 2 の部分は、リンカーを介して連結されているか、またはヘルスタチン由来ではない部分に連結される、請求項 205～207 のいずれかに記載のコンジュゲートあるいは請求項 200～204 のいずれかに記載のキメラポリペプチド。

【請求項 209】

第 1 の部分が血清アルブミン由来である、請求項 200～207 のいずれかに記載のコンジュゲートまたはキメラ。

【請求項 210】

ヘルスタチンのイントロンであるイントロンにコードされた部分を含む、請求項 200～209 のいずれかに記載のコンジュゲートまたはキメラ。

【請求項 211】

H E R - 2 以外の細胞表面受容体由来の N 末端部分とイントロンとを含み、膜貫通ドメインの少なくとも全体または一部を欠いており、

10

20

30

40

50

細胞表面受容体の活性を変調する、ポリペプチド。

【請求項 2 1 2】

C S R が R T K である、請求項 2 1 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 1 3】

1 つの細胞表面受容体アイソフォームの N 末端をイントロン融合タンパク質由来のイントロンに連結させることを含む、合成イントロン融合タンパク質の調製方法。

【請求項 2 1 4】

連結が共有結合である、請求項 2 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 1 5】

連結がペプチド結合である、請求項 2 1 3 に記載の方法。

10

【請求項 2 1 6】

C S R アイソフォームがイントロン融合タンパク質である、請求項 2 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 1 7】

請求項 2 0 0 ～ 2 1 2 のいずれかに記載のポリペプチド、キメラポリペプチドまたはコンジュゲートを含む薬剤組成物。

【請求項 2 1 8】

請求項 2 1 7 に記載の薬剤組成物を投与することを含む、疾患または状態の治療方法。

【請求項 2 1 9】

疾患または状態が、癌、炎症性疾患、感染症、血管形成関連状態、細胞増殖関連状態、免疫障害および神経変性疾患からなる群から選択される、請求項 2 1 8 に記載の方法。

20

【請求項 2 2 0】

疾患または状態が、関節リウマチ、多発性硬化症、眼球後部の炎症、ブドウ膜炎の障害、眼球表面の炎症性障害、血管新生病、増殖性硝子体網膜症、アテローム性動脈硬化症、関節リウマチ、血管腫、真性糖尿病、炎症性腸疾患、乾癬、アルツハイマー病、ループス、血管狭窄症、再狭窄、炎症性関節疾患、アテローム性動脈硬化症、尿路閉塞性症候群、および喘息からなる群から選択される、請求項 2 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2 1】

疾患または状態が、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病、リンパ性悪性疾患、扁平細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌、胃癌、消化管癌、膵臓癌、膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌もしくは子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、および頭頸部癌からなる群から選択される、請求項 2 1 8 に記載の方法。

30

【請求項 2 2 2】

疾患または状態がウイルスもしくは寄生虫による感染症である、請求項 2 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2 3】

ウイルスが、粘液腫ウイルス、ワクシニアウイルス、タナボックスウイルス、エプスタインバーウイルス、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルスサイミリ、B 型肝炎ウイルス、アフリカブタ熱ウイルス、パロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス (H I V)、C 型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、デングウイルス および エボラウイルスからなる群から選択される、請求項 2 2 2 に記載の方法。

40

【請求項 2 2 4】

薬剤組成物が、血管形成、細胞増殖、細胞遊走、ウイルス侵入、ウイルス感染症、腫瘍細胞成長または腫瘍細胞転移を阻害するポリペプチドを含む、請求項 2 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2 5】

細胞または組織を、in vitro または in vivo で、請求項 1 ～ 1 4 3、1

50

65～177、200～212のいずれかに記載のポリペプチド、キメラポリペプチドもしくはコンジュゲートと接触させることによって、病状の症状を寛解させるまたは発生を調節することを含む、発生および／あるいは病状の調節方法。

【請求項226】

FGFR-4、KIT、TNFRs、DDR1、FGFR-1、FGFR-4、VEGFR-2、VEGFR-3、RON、TEK、CSF1R、PDGFR-B、EphA、EphB、およびMETのアイソフォームから選択された、ポリペプチド受容体アイソフォームをコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも1つのアミノ酸を含む、単離したポリペプチド。

【請求項227】

ポリペプチドには膜貫通ドメインが含まれない、請求項226に記載のポリペプチド。

【請求項228】

請求項226または請求項227に記載のポリペプチドであって、少なくとも1つの追加のドメインもしくはその一部分を欠いており、それによって活性が取り除かれている、低下しているまたは改変されているポリペプチド。

【請求項229】

受容体拮抗剤である、請求項226に記載の単離したポリペプチド。

【請求項230】

2つおよび1つまたは複数の異なる細胞表面受容体アイソフォームおよび／もしくは治療薬、または細胞表面受容体アイソフォームおよび治療薬を含む組合せ。

【請求項231】

アイソフォームおよび／または薬物が個別の組成物中にあるか、または単一の組成物中にある、請求項230に記載の組合せ。

【請求項232】

請求項230に記載の組合せの成分を投与することを含む治療方法であって、それぞれの成分を、個別に、同時に、断続的に、単一の組成物中またはそれらの組合せで投与する方法。

【請求項233】

血管形成関連障害、腫瘍および／もしくは免疫障害を治療するための、請求項230または請求項231に記載の組合せの使用。

【請求項234】

血管形成関連障害、腫瘍および／もしくは免疫障害を治療するための医薬品を配合するための、請求項230または請求項231に記載の組合せの使用。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

2005年3月30日出願、題名「CELL SURFACE RECEPTOR ISOFORMS AND METHODS OF IDENTIFYING AND USING SAME (細胞表面受容体アイソフォームならびにその同定および使用方法)」の、Pei JinおよびH. Michael ShepardのU. S. Provisional Application Serial No. 60/666, 825; 2004年5月14日出願、題名「CELL SURFACE RECEPTOR ISOFORMS AND METHODS OF IDENTIFYING AND USING SAME (細胞表面受容体アイソフォームならびにその同定および使用方法)」の、Pei JinのU. S. Provisional Application Serial No. 60/571, 289; および2004年6月18日出願、題名「CELL SURFACE RECEPTOR ISOFORMS AND METHODS OF IDENTIFYING AND USING SAME (細胞表面受容体アイソフォームならびにその同定および使用方法)」の、Pei JinのU. S. Provis

10

20

30

40

50

ional Application Serial No. 60/580,990の優先権の利益を主張する。

【0002】

本出願は、2004年5月14日出願のU. S. application Serial No. 10/846,113号明細書、および関連する2005年2月24日公開、題名「(INTRON FUSION PROTEINS, AND METHODS OF IDENTIFYING AND USING SAME) イントロン融合タンパク質、ならびにその同定および使用方法」の、公開された国際PCT特許出願である国際公開第05/016966号パンフレットに関する。本出願は、本明細書と同日に出願、題名「(CELL SURFACE RECEPTOR ISOFORMS AND METHODS OF IDENTIFYING AND USING THE SAME) 細胞表面受容体アイソフォームならびにその同定および使用方法」の、Pei JinおよびH. Michael ShepardのU. S. Application Serial No. 11/129,740にも関する。

10

【0003】

認められる場合は、これらの特許出願、仮特許出願および国際特許出願のそれぞれの主題は、それを参考とすることによって本明細書中に組み込まれている。

【発明の分野】

【0004】

受容体チロシンキナーゼのアイソフォームを含めた細胞表面受容体のアイソフォームおよび受容体チロシンキナーゼのアイソフォームを含む薬剤組成物を提供する。細胞表面受容体アイソフォームおよびそれらを含む組成物を癌および炎症性疾患などの疾患の治療方法で用いることができる。

20

【背景】

【0005】

細胞シグナル伝達経路は、相互作用して細胞外、細胞間および細胞内のシグナルを中継する、ポリペプチドおよび小分子を含めた分子のネットワークを含む。このような経路は中継のように相互作用し、シグナルを経路の一メンバーから次のメンバーへと渡していく。経路の一メンバーの変調はシグナル伝達経路によって中継することができ、経路の他のメンバーの活性の変調ならびにシグナルに対する細胞または生物の表現型および応答に影響を与えることなどの、このようなシグナル伝達の結果の変調がもたらされる。疾患および障害は、シグナル伝達経路の変調の誤調節または変化を含み得る。薬物開発の目的は、シグナル伝達経路において、正常な調節が回復されるようにこのように誤調節された経路を標的とすることである。

30

【0006】

受容体チロシンキナーゼ(RTK)は、多くのシグナル伝達経路に関与するポリペプチドのうちの1つである。RTKは、細胞の分裂、増殖、分化、遊走および代謝を含めた様々な細胞プロセスにおいて役割を果たす。RTKはリガンドによって活性化することができる。このような活性化は立ち代って、自己分泌またはパラ分泌性の細胞シグナル伝達経路、たとえば二次メッセンジャーの活性化を始動することなどによって、シグナル伝達経路中の現象を活性化させ、これは特異的な生物学的効果をもたらす。RTKに対するリガンドは同族受容体に特異的に結合する。

40

【0007】

RTKは、乳癌および結腸直腸癌、胃癌、神経膠腫ならびに中胚葉性由来の腫瘍などの癌を含めたいくつかの疾患に関連するとされている。RTKの調節不備がいくつかの癌で注目されている。たとえば、乳癌をp185-HER2の発現の増幅と関連づけることができる。RTKはまた、糖尿病性網膜症および黄斑変性症を含めた眼の疾患に関連づけられている。RTKはまた、生理的な血管形成および腫瘍性血管形成を含めた血管形成に関与する経路の調節にも関連している。RTKはまた、細胞の増殖、遊走および生存の調節に関連するとされている。

50

【0008】

ヒト表皮成長因子受容体2遺伝子（HER-2；ErbB2とも呼ばれる）は、癌遺伝子として暗示されている受容体チロシンキナーゼをコードしている。HER-2は、約185kDのポリペプチド（P185HER2）をコードしている4.5Kbの主要なmRNA転写物を有する。P185HER2は、チロシンキナーゼ活性を有する細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含む。いくつかのポリペプチドの型がHER-2遺伝子から産生され、これには、タンパク質分解性プロセッシングによって生じたポリペプチドおよび選択的スプライシングされたRNAから生じた型が含まれる。ヘルスタチン（herstatin）およびその断片は、HER-2遺伝子によってコードされているHER-2結合タンパク質である。ヘルスタチン（p68HER-2とも呼ばれる）は、p185-HER2受容体をコードしている遺伝子の選択的スプライシングされた変異体によってコードされている。たとえば、1つのヘルスタチンは胎児の腎臓および肝臓で生じ、C末端に、膜局在受容体に関連する、79個のアミノ酸のイントロンにコードされた挿入物を含む（U. S. Patent No. 6, 414, 130およびU. S. Published Application No. 20040022785参照）。いくつかのヘルスタチン変異体が同定されている（たとえば、U. S. Patent No. 6, 414, 130；U. S. Published Application No. 20040022785、U. S. appln. Serial No. 09/234, 208；U. S. appln. Serial No. 09/506, 079；公開された国際出願の国際公開第0044403号パンフレットおよび国際公開第0161356号パンフレット参照）。ヘルスタチンは表皮成長因子（EGF）相同ドメインを欠いており、p185-HER2の細胞外ドメインの一部、典型的には最初の340個のアミノ酸を含む。ヘルスタチンは、ヒト表皮成長因子受容体のサブドメインIおよびII、HER-2細胞外ドメインおよびイントロンによってコードされているC末端ドメインを含む。その結果生じるヘルスタチンポリペプチドは、典型的には419個のアミノ酸を含む（サブドメインIおよびIIから340個のアミノ酸、加えてイントロン8から79個のアミノ酸）。ヘルスタチンタンパク質は細胞外ドメインIV、ならびに膜貫通ドメインおよびキナーゼドメインを欠いている。

【0009】

対照的に、表皮成長因子およびトランスフォーミング成長因子-αなどの正に作用するEGFRリガンドが、このようなドメインを保有する。さらに、ヘルスタチンの結合によって受容体は活性化されない。ヘルスタチンは、受容体チロシンキナーゼのEGFファミリーのメンバー、ならびにインスリン様成長因子-1（IGF-1）受容体および他の受容体を阻害することができる。ヘルスタチンは、リン酸転移および受容体活性化に必要である生産的な受容体二量体（ホモ二量体およびヘテロ二量体）の形成を妨げる。あるいはまたはそれに加えて、ヘルスタチンは、受容体末端への結合に関してリガンドと競合することができる（U. S. Patent No. 6, 414, 130；U. S. Published Application No. 20040022785、U. S. appln. Serial No. 09/234, 208；U. S. appln. Serial No. 09/506, 079；公開された国際出願の国際公開第0044403号パンフレットおよび国際公開第0161356号パンフレット参照）。

【0010】

腫瘍壊死因子受容体ファミリー（TNFR）は、シグナル伝達および調節に関与している受容体ファミリーの別例である。TNFリガンドおよび受容体ファミリーは、細胞の分化、活性化、および生存度に関与するものを含めた様々なシグナル伝達経路を調節する。TNFRは、シグナル伝達に関わる、リガンド結合ドメインを含めた細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含む。さらに、TNFRは典型的には、細胞表面で三量体化する三量体タンパク質である。TNFRは、炎症性疾患、中枢神経系疾患、自己免疫疾患、喘息におけるものなどの気道過敏症状態、関節リウマチおよび炎症性腸疾患において役割を果たす。TNFRは、ウイルス感染症などの感染症においても役割を果たす

。

【0011】

TNF受容体ファミリー（TNFR）は細胞外ドメイン間で相同性を示す。これらの受容体の一部はアポトーシスを開始し、一部は細胞増殖を開始し、一部はいずれの活性についても開始する。このファミリーによるシグナル伝達は、三量体リガンドによる受容体のクラスターリング、および続くタンパク質と受容体の細胞質領域との会合を要する。TNFRファミリーは、相同的な、細胞質の80個のアミノ酸のドメインを有するサブファミリーを含む。このドメインはデスドメイン（DD）と呼ばれ、このドメインを含むタンパク質がアポトーシスに関与していることから命名された。TNFRファミリーのメンバー間の区別は、明確に異なる遺伝子によってコードされた2つのTNFRによって例示される。TNFRI（55kDa）は、アポトーシスの開始および転写因子NFκBの活性化のシグナルを行う。TNFRII（75kDa）の機能はNFκBの活性化のシグナルを行うが、アポトーシスの開始のシグナルを行わない。TNFRIはDDを含んでおり、TNFRIIはDDを含まない。

10

【0012】

様々な疾患および状態に関与しているので、RTKおよびTNFRなどの細胞表面受容体（CSR）は治療行為の標的である。RTKを標的とする小分子治療剤が設計されている。小分子を、細胞表面受容体および／または他の受容体を標的とする治療剤として設計することは可能であり得るが、このような戦略にはいくつかの制限が存在する。小分子は1つの受容体との相互作用に限定される場合があり、したがって、複数のファミリーメンバーが誤調節されている可能性のある状態に対処することができない。小分子はまた、無差別的である可能性があり、意図する標的以外の受容体に影響を与える可能性がある。さらに、一部の小分子は、受容体と不可逆的にまたは実質的に不可逆的に結合する（すなわちナノモル以下の結合親和性である）。このような手法の利点は有効ではなかった。受容体および／または受容体リガンドに対する抗体を治療剤として用いることができる。しかし、抗体治療は対象において免疫応答をもたらす可能性があり、したがって、このような治療は多くの場合、治療における合併症を回避するために大規模なカスタマイズを必要とする。したがって、癌、ならびにRTK活性を示す細胞表面受容体および／もしくは他の細胞表面タンパク質に関与する、望ましくない細胞増殖や炎症性反応に関与する他の疾患を含めた疾患の治療の治療法の必要性が依然として存在する。したがって、本明細書中の目的のうち、とりわけ、このような治療法ならびに候補治療剤および治療方法を同定または発見する方法を提供することが目的である。

20

30

【概要】

【0013】

シグナル伝達経路および他の細胞表面受容体の相互作用に関与する疾患ならびに障害を治療するための治療分子を提供する。治療分子は、血管形成および血管新生ならびに細胞増殖、特定の異常な血管形成、血管新生および／または細胞増殖に関与するものを含めた、シグナル伝達経路に関わったRTKを特に標的とする。その分子を含む組成物、ならびに疾患および状態、特に、異常な血管形成、血管新生および／または細胞増殖を含むもしくは示す、またはそれを呈する疾患を治療するための方法も提供する。また、候補治療剤の同定方法ならびに治療分子および組成物を投与することによる治療方法も提供する。治療分子は、任意のこのような疾患または障害を治療するために用いることができ、活性を示し、それによりこのような治療が有効となる。増殖性障害を含めた疾患および障害には、腫瘍、免疫障害および炎症性障害が含まれる。標的には、血管形成および血管新生に関与する細胞ならびに炎症反応、癌および他のこのような障害に関与する細胞が含まれる。活性には、受容体との相互作用によって直接、またはリガンドとの相互作用によって間接的に活性を変更することによってなど、RTKおよびTNFRを含めた細胞表面受容体の活性の変調が含まれる。

40

【0014】

本明細書中で提供する治療分子には、とりわけ、血管形成因子の細胞性受容体の活性を

50

変調し（正および負）、複数の疾患プロセスにおいて介入点として役割を果たすものが含まれる。「多すぎる」血管形成が悪い状況の例には、腫瘍の病巣、または他の疾患部位（糖尿病におけるヒトの眼など）に血液を供給する血管形成が含まれる。このような場合には、本明細書中に提供する、このプロセスを阻害する治療分子を用いる。

【0015】

本明細書中に提供する治療分子によって変調される受容体チロシンキナーゼ（RTK）もしくはTNFR（または他の細胞表面受容体）の活性には、それだけには限定されないが、たとえば、二量体化、ホモ二量体化、ヘテロ二量体化、三量体化、キナーゼ活性、受容体チロシンキナーゼの自己リン酸化、受容体チロシンキナーゼのリン酸転移、シグナル伝達分子のリン酸化、リガンド結合、リガンド結合に対する受容体チロシンキナーゼとの競合、シグナル伝達、シグナル伝達分子との相互作用、アポトーシスの誘導、受容体関連キナーゼの活性、受容体関連プロテアーゼの活性、膜会合および膜局在化のうちの1つまたは複数が含まれる。変調には、たとえば、活性の阻害（拮抗剤としての活性など）および活性の亢進（作用剤としての活性）が含まれる。このような活性の変調により、このような受容体の効果が変調されるか、他の様式で改変される。

【0016】

本明細書中に提供する治療分子は、典型的には、たとえば生体利用度、送達、安定性、プロテアーゼ耐性および他の特性を改善するために設計された、ポリペプチドもしくはペプチド模倣体（改変された結合を有するポリペプチドを含む）またはポリペプチドの他の改変された形態である。生体利用度、タンパク質安定性および他のこのような特性などの特性を変更する変化を有する分子の、治療剤として用いるための改変が企図される。

【0017】

分子の例はポリペプチドである。任意のポリペプチドの対立遺伝子変異体も含まれる。対立遺伝子変異体には、受容体の任意の変異体、具体的には特定の受容体が発生する哺乳動物の集団に存在する細胞外ドメイン内の変異体が含まれる。キメラ分子、コンジュゲートおよびイントロン融合タンパク質のイントロン部分のコンジュゲートも提供される。キメラ分子およびコンジュゲートは、異なるリガンド結合および／または受容体相互作用特性を有する分子からの部分を含むことができる。たとえば、ヘルスタチンのイントロンなどのイントロン領域に直接もしくは間接的に連結した細胞外ドメインまたはその一部分を含む、コンジュゲートまたはキメラを提供する。キメラおよびコンジュゲートには、本明細書中に提供し、以下に記載の任意のものを含めた当業者に周知のCSRアイソフォーム由来の部分が含まれる：U. S. Provisional Application Serial No. 60/571, 289、U. S. Provisional Application Serial No. 60/580, 990、U. S. application Serial No. 10/846, 113、公開された国際PCT特許出願の国際公開第05/016966号パンフレット、U. S. Patent No. 6, 414, 130；U. S. Published Application No. 20040022785、U. S. appln. Serial No. 09/234, 208；U. S. appln. Serial No. 09/506, 079；公開された国際出願の国際公開第0044403号パンフレットおよび国際公開第0161356号パンフレット。

【0018】

単離したポリペプチドおよびその変異体を提供する。ポリペプチドは、細胞表面受容体のアイソフォーム（CSRアイソフォーム）ならびにそのキメラおよびコンジュゲートである。イントロン融合タンパク質などの一部のCSRアイソフォームは、完全長の同族受容体と比較してドメインの活性が低下もしくは排除されるように、および／または構造が変更されているように、機能的ドメインの全体もしくは一部または他の構造的特徴を欠いている。他の例には、選択的スプライシング中に起こる再配置により正または負のいずれかに作用する分子が生じることができる、イントロン融合タンパク質が含まれる。具体的には、本明細書中に提供するポリペプチドのうち、とりわけ、受容体の可溶性型または非

膜結合型が含まれる。ポリペプチドには、配列番号 91、93、95、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、および 226 のいずれかに記載のアミノ酸の配列と少なくとも 80%、85%、90% または 95% の配列同一性を有するアミノ酸の配列、ならびにその対立遺伝子変異体が含まれる。このような相同性は、ポリペプチドの完全長の少なくとも 70%、80%、85%、90%、95%、97% または 100% に沿って示される。配列同一性は、前記単離したポリペプチドの完全長配列に対して、それぞれの配列番号によって表されるポリペプチドの完全長に沿って比較し、配列番号 91、93、95、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、および 226 のそれぞれは細胞表面受容体アイソフォームである。このようなポリペプチドの例は、配列番号 91、93、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153 および 155 のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含む単離したポリペプチドを提供し、配列番号 91、93、95、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、および 226 のいずれかに記載のアミノ酸の配列を有する単離したポリペプチドも提供する。また、これらの分子のキメラおよびこれらの分子とヘルスタチンとのキメラも提供される。

【0019】

受容体アイソフォームであり、かつ同族の細胞表面受容体をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸に連結した細胞表面受容体の少なくとも 1 つのドメインを含む、単離したポリペプチドを提供する。細胞表面受容体は、DDR1（ジスコイジンドメイン受容体）、KIT（c-kit の受容体）、FGFR-1、FGFR-2、FGFR-4、（線維芽細胞成長因子受容体 1、2 および 4）、TNFR2（腫瘍壊死因子受容体）、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、（血管内皮成長因子受容体 1、2、および 3）、RON（recepteur d'origine nantais；マクロファージ刺激 1 受容体としても知られる）、MET（肝細胞成長因子受容体としても知られる）、TEK（内皮特異的受容体チロシンキナーゼ）、Tie-1（免疫グロブリンおよび表皮成長因子相同ドメインを有するチロシンキナーゼの受容体）、CSF1R（コロニー刺激因子 1 受容体）、PDGFR-B（血小板由来成長因子受容体 B）、EphA1、EphA2、および EphB1（それぞれエリスロポエチン産生肝細胞受容体 A1、A2 および B1）から選択される。このようなポリペプチドの例は、配列番号 91、93、95、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、および 226 に記載のアミノ酸の配列から選択されたアミノ酸配列を含むものである。

【0020】

また、生じるポリペプチドが膜局在性でもなく結合もしておらず、生物活性を含めた細胞表面受容体の活性を変調するように膜貫通ドメインの少なくとも一部を欠いている細胞表面受容体である、単離したポリペプチドも提供する。ポリペプチドはエクソン挿入を含むことができる。これらには、とりわけ、F G F R-4、K I TおよびT N F Rのアイソフォームから選択される細胞表面受容体アイソフォームが含まれる。単離したポリペプチドの例は、配列番号91、93、95、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、および226のいずれかに記載のアミノ酸の配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、または100%の配列同一性を有するものである。配列同一性は、単離したポリペプチドの完全長の配列に対して、それぞれの配列番号の完全長に沿って比較する。単離したポリペプチドはさらに細胞表面受容体の細胞質ドメインを欠いていることができる。

10

【0021】

また、イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含んでおり、細胞表面受容体の細胞質ドメインを欠いている、単離したポリペプチドも提供する。このイントロンはイントロンであり、核酸K I T、F G F R-4、T N F R 2、V E G F R-1、R O N、T E K、T i e-1、およびE p h A 1から選択されるか、または配列番号91、93、95、121、123、129、131、133、135、137、139、141、149、151、または153のいずれかからのイントロンである。また、さらに膜貫通ドメインを欠いているポリペプチドも提供する。これらには、とりわけ、細胞表面受容体の活性または機能を変調する単離したポリペプチドが含まれる。このようなポリペプチドには、それだけには限定されないがT N F R 1、T N F R 2およびT N F R r pなどのT N F Rアイソフォーム、低親和性の神経成長因子受容体、F a s 抗原、C D 4 0、C D 2 7、C D 3 0、4-1 B B、O X 4 0、D R 3、D R 4、D R 5、ならびにヘルペスウイルス侵入媒介物質（H V E M）が含まれる。

20

【0022】

また、イントロンまたはその一部分などのイントロンに連結したC S Rへの結合に影響を与えるN末端部分を含むキメライントロン融合タンパク質アイソフォームであって、その結果生じるキメラが1つまたは複数のC S Rの活性を変調する、具体的には阻害するアイソフォームも提供する。キメラには、本明細書中に提供するアイソフォームのうちの任意のものおよびヘルスタチンのN末端ならびに／またはイントロン部分が、異なるイントロン融合タンパク質アイソフォームからのイントロンと連結したものが含まれる。キメラの各部分は、リンカーまたは2つ以上のアミノ酸を介して連結されていることができる。あるいは、キメラは化学的コンジュゲートであることができる。

30

【0023】

また、N末端部分とイントロンにコードされた部分とが直接またはリンカーを介して連結されており、本明細書中に提供する任意のもの、ヘルスタチンもしくは任意の他のC S Rを含めた同一または異なるC S Rアイソフォーム由来である、C S Rアイソフォームコンジュゲートおよびキメラも提供する。2つの部分はポリペプチドまたは化学的リンカーなどのリンカーを介して連結されていることができる。アイソフォームコンジュゲートは、1つまたは複数のC S Rの活性を変調する、典型的には阻害する。C S Rには、シグナル伝達に関わるもの、具体的には血管形成、炎症反応および細胞増殖に関わる経路に関与するC S Rが含まれる（たとえば図1参照）。

40

【0024】

本明細書では、C S R受容体の少なくとも1つのドメインを含んでおり、膜貫通ドメインおよび／もしくはプロテインキナーゼドメインなどのC S R受容体の別のドメインの1つまたは複数のアミノ酸を欠いており、C S Rと比較して活性が低下または消滅している

50

C S Rアイソフォームを提供する。C S Rアイソフォームには、イントロンがC S Rをコードしている遺伝子由来である、イントロンにコードされたアミノ酸の配列を含むポリペプチドが含まれる。たとえば、C S Rアイソフォームは、C S Rをコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも1つのアミノ酸に動作可能に連結した、C S R受容体の少なくとも1つのドメインを含んでいることができる。本明細書中に提供するC S Rアイソフォームには、とりわけ、エフリン（E p h）受容体、線維芽細胞成長因子（F G F）受容体、D D R受容体、M E T受容体、R O N受容体、T E K／T I E受容体、V E G F受容体、P D G F受容体、C S F 1受容体、K I T受容体およびT N F R受容体の1つまたは複数のドメインを含むポリペプチドが含まれる。

【0025】

本明細書では、E p h Aアイソフォームを提供する。アイソフォームは、E p h A受容体の少なくとも1つのドメインを含む単離したポリペプチドである。ポリペプチドは、エフリンリガンド結合ドメインを含んでおり、E p h A受容体の膜貫通ドメインに対応する1つまたは複数のアミノ酸を欠いており、E p h A受容体と比較してポリペプチドの膜局在化が低下または消滅している。これには、E p h A受容体がとりわけE p h A 1、E p h A 2、E p h A 3、E p h A 4、E p h A 5、E p h A 6、E p h A 7、およびE p h A 8から選択されるポリペプチドが含まれる。一例では、このようなポリペプチドには、配列番号253～260のいずれか1つに記載の配列またはその対立遺伝子変異体が含まれる。対立遺伝子変異体は、配列番号289～293のいずれか1つに存在する対立遺伝子変異であることができる。E p h Aアイソフォームには、E p h A受容体と比較してプロテインキナーゼドメインの全体もしくは一部を欠いている、および／またはE p h A受容体と比較して不穏性 α モチーフドメイン（S A M）の全体もしくは一部を欠いているポリペプチドが含まれる。

【0026】

一例では、E p h Aアイソフォームは、配列番号253に記載の、E p h A 1受容体の少なくとも1つのドメインを有する。このようなアイソフォームには、ポリペプチドがE p h A 1受容体のプロテインキナーゼドメインの1つまたは複数のアミノ酸を欠いており、E p h A 1受容体と比較してポリペプチドのキナーゼ活性が低下または消滅しているE p h A 1アイソフォームが含まれる。また、E p h A 1アイソフォームには、配列番号149、151および153のいずれかに記載のアミノ酸の配列と少なくとも80%の配列同一性を有するポリペプチド、または配列番号149、151および153のいずれかに記載のアミノ酸配列もしくはその対立遺伝子変異体を含むポリペプチドも含まれる。対立遺伝子変異体には、配列番号289に記載の対立遺伝子変異が含まれる。E p h A 1アイソフォームには、配列番号149、151および153のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を含むポリペプチドが含まれる。

【0027】

本明細書では、E p h A 2アイソフォームを提供する。E p h A 2アイソフォームには、E p h A 2受容体と比較してポリペプチドが膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインの1つまたは複数のアミノ酸を欠いており、E p h A 2受容体と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅している、配列番号254に記載のE p h A 2受容体の少なくとも1つのドメインが含まれる。E p h A 2アイソフォームには、E p h A 2受容体と比較してフィブロネクチンドメインの1つまたは複数のアミノ酸を含むポリペプチドが含まれる。E p h A 2アイソフォームの例には、配列番号168に記載のアミノ酸の配列と少なくとも80%の配列同一性を有するポリペプチド、または配列番号168に記載のアミノ酸配列もしくはその対立遺伝子変異体を含むポリペプチドも含まれる。対立遺伝子変異体には、それだけには限定されないが、配列番号290に記載の対立遺伝子変異が含まれる。E p h A 2アイソフォームには、配列番号168に記載の配列と同数のアミノ酸を含むアイソフォームが含まれる。

【0028】

本明細書ではまた、E p h B受容体と比較して膜貫通ドメインの1つまたは複数のアミ

ノ酸を欠いており、E p h B受容体と比較してポリペプチドの膜局在化が低下または消滅しているポリペプチドを含むE p h Bアイソフォームも提供する。提供するE p h Bアイソフォームには、とりわけ、E p h B受容体がE p h B 1、E p h B 2、E p h B 3、E p h B 4、E p h B 5、およびE p h B 6から選択されるもの、ならびにE p h B受容体が配列番号261～265のいずれか1つに記載の配列を含むもの、またはその対立遺伝子変異体が含まれる。対立遺伝子変異体には、それだけには限定されないが、配列番号294～298に記載の対立遺伝子変異が含まれる。例示的なE p h Bアイソフォームには、E p h B受容体のプロテインキナーゼドメインの1つまたは複数のアミノ酸を欠いており、E p h B受容体と比較してポリペプチドのプロテインキナーゼ活性が低下または消滅しているアイソフォーム、およびE p h B受容体の不稔性 α モチーフドメイン（SAM）の1つまたは複数のアミノ酸を欠いているアイソフォームが含まれる。一例では、E p h B 1アイソフォームにはエフリン結合ドメインが含まれる。E p h Bアイソフォームには、E p h B受容体のフィブロネクチンドメインの1つまたは複数のアミノ酸を欠いているアイソフォームも含まれる。本明細書中で提供するE p h Bアイソフォームには、とりわけ、配列番号155、170、172および174のいずれかに記載のアミノ酸の配列と少なくとも80%の配列同一性を有するアイソフォーム、ならびに配列番号155、170、172および174のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むアイソフォーム、またはその対立遺伝子変異体が含まれる。対立遺伝子変異体には、それだけには限定されないが、配列番号294および297に記載の対立遺伝子変異が含まれる。E p h Bアイソフォームには、配列番号155、170、172および174のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を含むアイソフォームが含まれる。

10

20

【0029】

F G F Rアイソフォームを本明細書中に提供する。これには、F G F R-1の少なくとも1つのドメインを含んでおり、ポリペプチドが配列番号268に記載のF G F R-1のアミノ酸253～357に対応する免疫グロブリンドメインを含んでおり、F G F R-1のアミノ酸375～397に対応する膜貫通ドメインの全体を欠いている、F G F Rアイソフォームが含まれる。また、F G F Rアイソフォームには、F G F R-1のプロテインキナーゼドメインの1つもしくは複数のアミノ酸を欠いており、F G F R-1と比較してポリペプチドのプロテインキナーゼ活性が低下もしくは消滅しているアイソフォーム、および／またはF G F R-1アミノ酸156～246に対応する免疫グロブリンドメインの1つもしくは複数のアミノ酸を含むアイソフォームが含まれる。提供されるF G F Rアイソフォームには、配列番号119もしくは176に記載のアミノ酸の配列と少なくとも80%の配列同一性を有するアイソフォーム、ならびに配列番号119および176のいずれかを含むアイソフォーム、またはその対立遺伝子変異体が含まれる。対立遺伝子変異体には、それだけには限定されないが、配列番号300に記載の対立遺伝子変異が含まれる。F G F R-1アイソフォームには、配列番号119および176のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を有するアイソフォームが含まれる。

30

【0030】

また、配列番号269に記載のF G F R-2の少なくとも1つのドメインを有しており、F G F R-2と比較してポリペプチドが膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いており、F G F R-2と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅している、F G F R-2アイソフォームも提供する。このようなアイソフォームには、配列番号178、180、182および184に記載のアミノ酸の配列と少なくとも80%の配列同一性を有するポリペプチド、ならびに配列番号178、180、182もしくは184に記載のアミノ酸配列を含むアイソフォーム、またはその対立遺伝子変異体が含まれる。対立遺伝子変異体には、それだけには限定されないが、配列番号301に記載の対立遺伝子変異が含まれる。F G F R-2アイソフォームには、配列番号178、180、182または184のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を有するアイソフォームが含まれる。また、例示的なF G F R-2アイソフォームには、F G F R-2のアミノ酸41～125に対応する免疫グロブリンドメインを欠いている

40

50

アイソフォームも含まれる。

【0031】

本明細書では、配列番号271に記載のFGFR-4のアミノ酸249～351に対応する免疫グロブリンドメインなど、FGFR-4の少なくとも1つのドメインを含んでおり、FGFR-4の膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いており、FGFR-4と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅している、FGFR-4アイソフォームを提供する。FGFRアイソフォームには、配列番号121に記載のアミノ酸の配列と少なくとも80%の配列同一性を有するアイソフォーム、および配列番号121に記載のアミノ酸配列を含むアイソフォーム、またはその対立遺伝子変異体が含まれる。対立遺伝子変異体には、それだけには限定されないが、配列番号303に記載の対立遺伝子変異が含まれる。FGFR-4アイソフォームには、配列番号121に記載の配列と同数のアミノ酸を有するアイソフォームが含まれる。

10

【0032】

本明細書では、配列番号250に記載のDDR1の少なくとも1つのドメインを含むポリペプチドであり、DDR1と比較してポリペプチドが膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いており、DDR1と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅しており、ポリペプチドが配列番号115または117に記載のアミノ酸の配列と少なくとも80%の配列同一性を有する、DDR1アイソフォームを提供する。DDR1アイソフォームには、配列番号115もしくは117に記載のアミノ酸配列を含むアイソフォーム、またはそれだけには限定されないが配列番号286に記載の対立遺伝子変異などのその対立遺伝子変異体が含まれる。DDR1アイソフォームには、配列番号115または117に記載の配列と同数のアミノ酸を有するアイソフォームが含まれる。

20

【0033】

本明細書ではまた、METをコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも1つのアミノ酸に動作可能に連結したMET受容体の少なくとも1つのドメインを含むポリペプチドであり、配列番号274に記載のMET受容体と比較してポリペプチドが膜貫通ドメイン、プロテインキナーゼドメインおよび少なくとも1つの追加のドメインを欠いており、MET受容体と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅している、MET受容体アイソフォームも提供する。MET受容体アイソフォームには、MET受容体と比較して欠いている追加のドメインがSemadメイン、プレキシンドメインまたはIPTG/TIGドメインであるアイソフォームが含まれる。MET受容体アイソフォームには、配列番号186、188、190、192、196、198、200、202、204、206、208および214のいずれかに記載のアミノ酸の配列と少なくとも80%の配列同一性を有するアイソフォーム、ならびに配列番号186、188、190、192、196、198、200、202、204、206、208および214のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むアイソフォーム、またはその対立遺伝子変異体が含まれる。対立遺伝子変異体には、それだけには限定されないが、配列番号306に記載の対立遺伝子変異が含まれる。METアイソフォームには、配列番号186、188、190、192、196、198、200、202、204、206、208および214のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を有するアイソフォームが含まれる。

30

40

【0034】

RON受容体アイソフォームを本明細書中に提供する。RON受容体アイソフォームには、配列番号277に記載のRON受容体のプレキシンドメインを有しており、RON受容体の膜貫通ドメインを欠いており、RON受容体と比較してポリペプチドの膜局在化が低下または消滅しているポリペプチドが含まれる。RON受容体アイソフォームには、配列番号277に記載のRON受容体と比較してプロテインキナーゼドメインの1つもしくは複数のアミノ酸を欠いており、RON受容体と比較してポリペプチドのプロテインキナーゼ活性が低下もしくは消滅しており、および／またはRON受容体の少なくとも1つの

50

I P T G / T I G ドメインの 1 つもしくは複数のアミノ酸を含むアイソフォームが含まれる。R O N 受容体アイソフォームには、配列番号 2 1 6、2 1 8 および 2 2 0 のいずれかに記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアイソフォーム、ならびに配列番号 2 1 6、2 1 8 および 2 2 0 のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むアイソフォーム、またはそれだけには限定されないが配列番号 3 0 8 に記載の対立遺伝子変異などのその対立遺伝子変異体が含まれる。また、R O N 受容体アイソフォームには、配列番号 2 1 6、2 1 8 および 2 2 0 のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を有するアイソフォームも含まれる。

【0035】

本明細書では、配列番号 2 7 8 に記載の T E K 受容体の少なくとも 1 つのドメインを含んでおり、アイソフォームが膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いており、T E K 受容体と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅しており、T E K 受容体と比較して少なくとも 1 つのフィブロネクチンドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いている、T E K アイソフォームを提供する。T E K アイソフォームには、欠いているフィブロネクチンドメインが配列番号 2 7 8 のアミノ酸 4 4 4 ~ 5 2 9、5 4 3 ~ 6 2 6、または 6 3 9 ~ 7 2 4 に対応しており、配列番号 2 7 8 のアミノ酸 4 4 4 ~ 5 2 9、5 4 3 ~ 6 2 6、および 6 3 9 ~ 7 2 4 に対応する T E K 受容体の 3 つのフィブロネクチンドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いているアイソフォームが含まれる。T E K アイソフォームには、配列番号 1 3 1 および 1 3 3 のいずれかに記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアイソフォーム、ならびに配列番号 1 3 1 および 1 3 3 のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むアイソフォーム、またはそれだけには限定されないが配列番号 3 0 9 に記載の対立遺伝子変異などのその対立遺伝子変異体が含まれる。また、T e k アイソフォームには、配列番号 1 3 1 および 1 3 3 のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を含むアイソフォームも含まれる。

【0036】

本明細書中には、配列番号 2 7 9 に記載の T i e - 1 受容体の全体または一部の少なくとも 1 つのドメインを含んでおり、T i e - 1 受容体と比較してアイソフォームが膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いており、T i e - 1 受容体と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅しており、アイソフォームが配列番号 1 3 5、1 3 7、1 3 9、1 4 1、1 4 3 および 2 2 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む、T i e 受容体アイソフォームを提供する。対立遺伝子変異体には、それだけには限定されないが、配列番号 3 1 0 に記載の対立遺伝子変異が含まれる。T i e 受容体アイソフォームには、配列番号 1 3 5、1 3 7、1 3 9、1 4 1、1 4 3 および 2 2 2 のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を有するアイソフォームが含まれる。

【0037】

本明細書では、V E G F R アイソフォームを提供する。V E G F R アイソフォームには、配列番号 1 2 3 に記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含んでおり、配列番号 2 8 2 に記載の V E G F R - 1 受容体と比較して膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いている V E G F R - 1 アイソフォームが含まれる。このようなアイソフォームには、配列番号 1 2 3 に記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含むポリペプチド、および配列番号 1 2 3 のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を含むアイソフォームが含まれる。V E G F R アイソフォームには、配列番号 2 8 3 および 2 8 4 のいずれかに記載の V E G F R の少なくとも 1 つのドメインを含んでおり、ポリペプチドが V E G F R の膜貫通ドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、V E G F R と比較してポリペプチドの膜局在化が低下または消滅している、V E G F R - 2 ならびに V E G F R - 3 アイソフォームが含まれる。また、V E G F R - 2 および V E G F R - 3 アイソフォームには、プロテインキナーゼドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、V E G F R と比較してポリペプチドのプロテインキ

ナーゼ活性が低下または消滅しているアイソフォーム、および V E G F R と比較して免疫グロブリンドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いているアイソフォームが含まれる。V E G F R - 2 ならびに V E G F R - 3 アイソフォームには、配列番号 1 2 5、1 2 7、2 2 4 および 2 2 6 のいずれかに記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するポリペプチド、ならびに配列番号 1 2 5、1 2 7、2 2 4 および 2 2 6 のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはその対立遺伝子変異体が含まれる。対立遺伝子変異体には、それだけには限定されないが、配列番号 3 1 3 および 3 1 4 に記載の対立遺伝子変異が含まれていることができる。また、V E G F R - 2 ならびに V E G F R - 3 アイソフォームには、配列番号 1 2 5、1 2 7、2 2 4 および 2 2 6 のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を有するアイソフォームも含まれる。

10

【0038】

P D G F R アイソフォームを本明細書中に提供する。これには、配列番号 2 7 6 に記載の P D G F R - B の少なくとも 1 つのドメインを含んでおり、ポリペプチドが P D G F R - B の膜貫通ドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、P D G F R - B と比較してポリペプチドの膜局在化が低下または消滅している、P D G F R アイソフォームが含まれる。また、P D G F R アイソフォームには、P D G F R - B のプロテインキナーゼドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、P D G F R - B と比較してポリペプチドのプロテインキナーゼ活性が低下または消滅しているアイソフォーム、および P D G F R - B の免疫グロブリンドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を含むアイソフォームが含まれる。また、これには、配列番号 1 4 7 に記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する P D G F R アイソフォーム、および配列番号 1 4 7 に記載のアミノ酸配列を含むアイソフォーム、またはその対立遺伝子変異体が含まれる。対立遺伝子変異体には、それだけには限定されないが、配列番号 3 0 7 に記載の対立遺伝子変異が含まれていることができる。また、P D G F R アイソフォームには、配列番号 1 4 7 に記載の配列と同数のアミノ酸を有するアイソフォームも含まれる。

20

【0039】

本明細書ではまた、配列番号 2 4 9 に記載の C S F 1 R の少なくとも 1 つのドメインを含んでおり、ポリペプチドが C S F 1 R の膜貫通ドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、C S F 1 R と比較してポリペプチドの膜局在化が低下または消滅している、C S F 1 R アイソフォームも提供する。また、C S F 1 R アイソフォームには、C S F 1 R のプロテインキナーゼドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、C S F 1 R と比較してポリペプチドのプロテインキナーゼ活性が低下または消滅しているアイソフォーム、および C S F 1 R の免疫グロブリンドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を含むアイソフォームも含まれる。これには、配列番号 1 4 5 に記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する C S F 1 R アイソフォーム、および配列番号 1 4 5 に記載のアミノ酸配列を含むアイソフォーム、またはそれだけには限定されないが配列番号 2 8 5 に記載の対立遺伝子変異などのその対立遺伝子変異体が含まれる。また、例示的な C S F 1 R アイソフォームには、配列番号 1 4 5 に記載の配列と同数のアミノ酸を含むアイソフォームも含まれる。

30

【0040】

K I T 受容体アイソフォームを本明細書中に提供する。これには、配列番号 2 7 3 に記載の K I T 受容体の少なくとも 1 つのドメインを含んでおり、K I T 受容体の膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインの 1 つまたは複数のアミノ酸を欠いており、K I T 受容体と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅している K I T 受容体アイソフォーム、ならびに K I T 受容体の少なくとも 1 つの免疫グロブリンドメインを含むアイソフォームが含まれる。K I T アイソフォームには、配列番号 9 3 に記載のアミノ酸の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアイソフォーム、および配列番号 9 3 に記載のアミノ酸配列を含むアイソフォーム、またはそれだけには限定されないが配列番号 3 0 5 に記載の対立遺伝子変異などのその対立遺伝子変異体が含まれる。K I T 受容体アイソフォームには、配列番号 9 3 に記載の配列と同数のアミ

40

50

ノ酸を有するアイソフォームが含まれる。

【0041】

本明細書では、配列番号280または281に記載のTNFRの少なくとも1つのシステインに富んだc6ドメインを含んでおり、TNFRの膜貫通ドメインの全体を欠いており、TNFRと比較してポリペプチドの膜局在化が低下または消滅している、TNFRアイソフォームを提供する。TNFRアイソフォームには、TNFRの少なくとも2つのシステインに富んだc6ドメインを含むアイソフォームが含まれる。また、TNFRアイソフォームには、配列番号95に記載のアミノ酸の配列と少なくとも80%の配列同一性を有するアイソフォーム、および配列番号95に記載の配列を含むアイソフォーム、またはその対立遺伝子変異体が含まれる。対立遺伝子変異には、それだけには限定されないが、配列番号312に記載の対立遺伝子変異が含まれる。また、TNFRアイソフォームには、配列番号95に記載の配列と同数のアミノ酸を有するアイソフォームも含まれる。

10

【0042】

単離したポリペプチド（たとえばCSRアイソフォーム）は、哺乳動物、特にヒト中の遺伝子によってコードされていることができ、哺乳動物細胞から単離するか、もしくはそのような細胞からクローニングした核酸から調製することができ、または任意の手段によって調製した核酸から合成するか、もしくはポリペプチドとして合成することができる。例示的な哺乳動物には、ヒトや他の霊長類、ウマ、ウシ、イヌ、ネコおよび他の家畜、ならびにラットやマウスなどのげっ歯類が含まれる。単離したポリペプチドは、本明細書中に提供する方法、当業者に知られている方法、および／またはたとえば同時係属出願のU.S. application Serial No. 10/846, 113および公開されたPCT特許出願の国際公開第2005/016966号パンフレットに記載の方法によって同定することができる。

20

【0043】

また、単離したポリペプチドのうちの任意のものまたはそれらの組合せを含む薬剤組成物も提供する。組成物には、とりわけ、受容体チロシンキナーゼまたは腫瘍壊死因子受容体と複合体形成するポリペプチドを含むものが含まれる。薬剤組成物は、炎症性疾患、免疫疾患、癌、および異常な血管形成もしくは血管新生または細胞増殖を現す他の疾患を含めた疾患の治療に用いることができる。癌には、乳癌、肺癌、結腸癌、胃癌、膵臓癌および他の癌が含まれる。炎症性疾患には、たとえば、糖尿病性網膜症ならびに／または糖尿病の神経障害および他の炎症性血管合併症、自己免疫性糖尿病を含めた自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化症、クローン病、糖尿病性腎臓病、嚢胞性線維症、子宮内膜症、糖尿病に誘発される血管損傷、炎症性腸疾患、アルツハイマー病および他の神経変性疾患、ならびに増殖性応答、免疫応答および炎症反応に關与する当業者に知られている他の疾患、およびRTK、特に図1や本明細書の開示中全体にわたって記載したものが関連するとされている、關与している、または参加している他の疾患が含まれる。

30

【0044】

また、ポリペプチドのうちの任意のものをコードしている核酸分子も提供する。核酸分子を含むベクターを提供し、そのベクターまたは核酸分子を含む細胞も提供する。提供する核酸分子には、とりわけ、イントロンおよびエクソンを含んでおり、イントロンがストップコドンを含んでおり、核酸分子がエクソンとイントロンとの接合点にまたがるオープンリーディングフレームをコードしており、オープンリーディングフレームがイントロン中のストップコドンで終結する核酸分子が含まれる。イントロンは、コードされているポリペプチドの1つもしくは複数のアミノ酸をコードしていることができ、または、コドンはイントロン中の最初のコドン（かつ場合によっては唯一のコドン）であることができる。

40

【0045】

また、配列番号90、92、94、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、167、169、171、173、175

50

、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、および225のいずれかに記載のヌクレオチドの配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチドの配列またはその対立遺伝子変異体を含む核酸分子も提供する。配列同一性は、単離した核酸分子の完全長配列に対して、それぞれの配列番号の完全長に沿って比較し、配列番号90、92、94；114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、167、169、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、および225のそれぞれは細胞表面受容体アイソフォームである。具体的には、配列番号90、92、94、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、167、169、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、および225のいずれかに記載のヌクレオチドの配列を含む核酸分子を提供する。また、その核酸分子のうちの任意のものを含むベクター、およびその核酸分子またはベクターを含む細胞も提供する。

10

20

【0046】

核酸分子および／またはベクターを含む薬剤組成物を提供する。このような組成物は、*in vivo*方法および*ex vivo*方法を含めた遺伝子治療方法に用いることができる。

【0047】

薬剤組成物のうちの任意のものを投与することによる疾患または状態の治療方法を提供する。疾患または状態には、それだけには限定されないが、たとえば、癌、炎症性疾患、感染症、血管形成関連状態、他の細胞増殖性状態、免疫障害および神経変性疾患が含まれる。また、これには、薬剤組成物が、血管形成、細胞増殖、細胞遊走、ウイルス侵入、ウイルス感染症、腫瘍細胞成長または腫瘍細胞転移を阻害する1つもしくは複数のポリペプチドを含む、治療方法も含まれる。

30

【0048】

疾患および障害の例は、関節リウマチ、多発性硬化症および眼球後部の炎症、ブドウ膜炎の障害、眼球表面の炎症性障害、血管新生病、増殖性硝子体網膜症、アテローム性動脈硬化症、子宮内膜症、関節リウマチ、血管腫、真性糖尿病、糖尿病性網膜症、炎症性腸疾患、クローン病、乾癬、アルツハイマー病、ループス、血管狭窄症、再狭窄、炎症性関節疾患、アテローム性動脈硬化症、尿路閉塞性症候群、喘息、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、ならびに白血病、リンパ性悪性疾患、扁平細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌（*gastric cancer*）、胃癌（*stomach cancer*）、消化管癌、膵臓癌、膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、頭頸部癌および他の癌のうちの任意のものである。他の疾患または状態には、それだけには限定されないが、粘液腫ウイルス、ワクシニアウイルス、タナポックスウイルス、エプスタインバーウイルス、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルスサイミリ、B型肝炎ウイルス、アフリカブタ熱ウイルス、パロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、C型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、デングウイルスおよびエボラウイルスなどの、ウイルスもしくは寄生虫によって引き起こされるまたは媒介されるまたはそれに関与するものが含まれる。

40

50

【0049】

また、組合せおよび組合せを含むキット、ならびに任意選択の指示書および／または試薬も提供する。これらの組合せは、2つ以上の異なる細胞表面受容体アイソフォームおよび／もしくは治療薬、または細胞表面受容体アイソフォームおよび治療薬を含む組成物を含む。アイソフォームおよび／または薬物は、個別の組成物中もしくは単一の組成物中にあるか、または一方の組成物が薬物を2つ以上含み、他方が他の薬剤を含む様式、もしくは他のそのような様式であることができる。組合せの成分を投与することによる治療方法を提供する。それぞれの成分は、個別に、同時に、断続的に、単一の組成物中で、またはそれらの組合せで投与することができる。

【詳細な説明】

10

【0050】

A. 定義

別段に定義しない限りは、本明細書中で用いるすべての専門用語および科学用語は、発明が属する分野の技術者に一般に理解される意味と同様の意味を持つ。本明細書の開示の全体にわたって言及するすべての特許、特許出願、公開出願および出版物、G E N B A N Kの配列、ウェブサイトおよび他の公開された資料は、別段に指摘しない限りは、その全体で参考として組み込まれる。本明細書中の用語に複数の定義が存在する場合は、本セクション中の定義が優勢である。U R Lまたは他のそのような識別子もしくはアドレスを参考としている場合は、そのような識別子は変わる可能性があり、またインターネット上の特定の情報は現れてはすぐ消える可能性があるが、同等の情報が知られており、インターネットおよび／または適切なデータベースを検索することなどによって容易にアクセスすることができることを理解されよう。それへの言及が、そのような情報の利用可能性および一般への普及の証拠である。

20

【0051】

本明細書中で使用する細胞表面受容体（C S R）とは、細胞の表面上に発現されるタンパク質であり、典型的にはそれを細胞の表面に固定する膜貫通ドメインまたは他の部分を含む。受容体として、これはシグナル伝達もしくはリガンドの内部移行などの細胞表面受容体の活性を媒介するまたはそれに参加するリガンドと結合する。細胞表面受容体には、それだけには限定されないが、単一膜貫通受容体およびGタンパク質共役型受容体が含まれる。とりわけ、成長因子受容体などの受容体チロシンキナーゼもこのような細胞表面受容体に含まれる。

30

【0052】

本明細書中で使用する受容体チロシンキナーゼ（R T K）とは、成長因子受容体のタンパク質ファミリーのメンバーであるタンパク質、典型的には糖タンパク質をいう。典型的には、成長因子受容体は細胞成長、細胞分裂、分化、代謝および細胞遊走を含めた細胞プロセスに関与している。R T Kは、細胞増殖、分化および細胞運命の決定、ならびに腫瘍増殖に関与していることも知られている。R T Kは、細胞外ドメイン、膜にまたがる（膜貫通）ドメインおよび細胞内チロシンキナーゼドメインを含めた保存されたドメイン構造を有する。典型的には、細胞外ドメインはポリペプチド成長因子もしくは細胞膜に会合した分子または他のリガンドに結合する。チロシンキナーゼドメインは受容体の正の調節および負の調節に関与している。

40

【0053】

受容体チロシンキナーゼは、たとえばその細胞外ドメイン内における配列モチーフの構造的配置に基づいてファミリーに分類される。構造モチーフには、それだけには限定されないが、免疫グロブリン、フィブロネクチン、カドヘリン、表皮成長因子およびクリングル反復の領域の反復が含まれる。構造モチーフによる分類から、それぞれが保存されたチロシンキナーゼドメインを有する、16を超えるR T Kファミリーが同定された。R T Kの例には、それだけには限定されないが、エリスロポエチン産生肝細胞（E P H）受容体、表皮成長因子（E G F）受容体、線維芽細胞成長因子（F G F）受容体、血小板由来成長因子（P D G F）受容体、血管内皮成長因子（V E G F）受容体、細胞接着R T K（C

50

A K)、T i e / T e k 受容体、インスリン様成長因子 (I G F) 受容体、およびインスリン受容体関連 (I R R) 受容体が含まれる。R T K をコードしている遺伝子の例には、それだけには限定されないが、E r b B 2、E r b B 3、D D R 1、D D R 2、E G F R、E p h A 1、E p h A 8、F G F R - 2、F G F R - 4、F l t 1 (f m s 関連チロシンキナーゼ 1 受容体；V E G F R - 1 としても知られる)、F L K 1 (V E G F R - 2 としても知られる)、M E T、P D G F R - A、P D G F R - B、および T E K (T I E - 2 としても知られる)。

【 0 0 5 4 】

R T K の二量体化は、受容体の触媒チロシンキナーゼドメインおよびチロシンの自己リン酸化を活性化させる。キナーゼドメインの自己リン酸化によりチロシンキナーゼドメインが活性状態に維持される。タンパク質の他の領域における自己リン酸化は、受容体と他の細胞タンパク質との相互作用に影響を与える。一部の R T K では、細胞外ドメインに結合するリガンドが受容体の二量体化をもたらす。一部の R T K では、受容体はリガンドが存在していなくても二量体化することができる。また、二量体化は受容体の過剰発現によっても増大する可能性がある。

【 0 0 5 5 】

本明細書中で使用する腫瘍壊死因子受容体 (T N F R) とは、T N F R 1 および T N F R 2 中に見つかるものなどの、特徴的な反復性かつ細胞外のシステインに富んだモチーフを有する受容体ファミリーのメンバーをいう。また、T N F R は、T N F R ファミリーのメンバー間で異なる可変性の細胞内ドメインも有する。T N F R 受容体ファミリーには、それだけには限定されないが、T N F R 1、T N F R 2、T N F R r p、低親和性の神経成長因子受容体、F a s 抗原、C D 4 0、C D 2 7、C D 3 0、4 - 1 B B、O X 4 0、D R 3、D R 4、D R 5、およびヘルペスウイルス侵入媒介物質 (H V E M) が含まれる。T N F R に対するリガンドには、T N F - α 、リンフォトキシン、神経成長因子、F a s リガンド、C D 4 0 リガンド、C D 2 7 リガンド、C D 3 0 リガンド、4 - 1 B B リガンド、O X 4 0 リガンド、A P O 3 リガンド、T R A I L および L I G H T が含まれる。T N F R には、シグナル伝達に参与する、リガンド結合ドメインを含めた細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインが含まれる。T N F R は、典型的には細胞表面で三量体化する三量体タンパク質である。

【 0 0 5 6 】

本明細書中で使用する、受容体チロシンキナーゼのアイソフォームなどの細胞表面受容体のアイソフォーム (本明細書中では C S R アイソフォームとも呼ぶ) とは、ドメインまたは受容体の野生型および／もしくは優性型と比較して、受容体の活性を変更するまたは活性を変調するために十分なその一部分を欠いている受容体、あるいはドメインなどの構造的特徴を欠いている受容体をいう。したがって、C S R アイソフォームとは、受容体の活性、典型的にはドメインまたは生物活性を変更するために十分なドメインの一部分を欠いている受容体をいう。C S R アイソフォームは、ドメインまたは受容体の活性を変更もしくは変調するために十分なドメインの一部分を欠いている。C S R アイソフォームは、受容体から変更されている 1 つまたは複数の生物活性を有するアイソフォームを含むことができる。たとえば、アイソフォームは、アイソフォームを、受容体の正に作用する調節ポリペプチドからアイソフォームの負に作用する調節ポリペプチドへと変更する、たとえば受容体ドメインからリガンドへと変更する、p 1 8 5 - H E R 2 の細胞外ドメインの変更を含むことができる。一般に、アイソフォーム中で活性は、受容体の野生型および／または優性型と比較して、少なくとも 0. 1、0. 5、1、2、3、4、5、もしくは 1 0 倍変更されている。典型的には、活性は 2、5、1 0、2 0、5 0、1 0 0 または 1 0 0 0 倍以上変更されている。一実施形態では、活性の変更は活性の低下である。アイソフォームに関して、活性の変更とは、受容体の短縮されていない形態と比較した、短縮された特定のアイソフォームの活性の差をいう。活性の変更には活性の亢進または低下が含まれる。一実施形態では、活性の変更は生物活性の低下であり、低下は、受容体の野生型および／または優性型と比較して、少なくとも 0. 1、0. 5、1、2、3、4、5、もしくは

10

20

30

40

50

は10倍であることができる。典型的には、生物活性は5、10、20、50、100または1000倍以上低下している。

【0057】

本明細書中で使用する場合、細胞表面受容体の活性を変調することへの言及は、CSRが受容体と何らかの様式で相互作用し、リガンド結合もしくは二量体化または他のシグナル伝達に関連する活性などの活性が変更されていることを意味する。

【0058】

本明細書中で使用する場合、変更された活性を有するCSRアイソフォームへの言及は、同族受容体と比較して異なるCSRアイソフォームの構造または配列に基づく、活性の変更をいう。

【0059】

本明細書中で使用するイントロン融合タンパク質とは、1つもしくは複数のドメインまたは1つもしくは複数のドメインの一部分を欠いており、その結果受容体の活性の変更をもたらすアイソフォームをいう。活性は、イントロン融合タンパク質によって、受容体と相互作用することなどによって直接、または受容体リガンドもしくは補因子または受容体活性の他のモジュレーターと相互作用することによって間接的に、変更されることができる。細胞もしくは組織から単離したイントロン融合タンパク質、または細胞もしくは組織から単離したそのようなポリペプチドの配列を有するイントロン融合タンパク質は、「天然」である。自然に存在せず、生じる構築物がCSRの活性を変調するように合成または分子をイントロンに連結させることによって調製するものは、「合成」である。イントロン融合タンパク質には、とりわけ、1つもしくは複数のドメインまたは1つもしくは複数のドメインの一部分を欠いており、その結果受容体の活性の変更をもたらす細胞表面受容体アイソフォームが含まれる。さらに、イントロン融合タンパク質は、エクソンにコードされたアミノ酸に動作可能に連結した、(受容体の優性型または野生型に関して)エクソンによってコードされていない1つまたは複数のアミノ酸を含む。一般に、このようなアイソフォームは、CSR遺伝子によってコードされている野生型または優性型と比較して短縮されている。しかし、これらはエクソン部分内に挿入または他の修飾を含んでいることができ、したがって、優性型と同じ大きさまたはそれよりも大きくなることができる。しかし、そのそれぞれは、イントロンにコードされた部分を含む(少なくとも1つのアミノ酸、一般には少なくとも、2、3、4、5、8、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75個およびそれを超えるアミノ酸)。イントロン融合タンパク質は、*in silico*で同定された選択的スプライシングされたRNAおよび/またはRNA分子によってコードされていることができ、これは、潜在的なスプライス部位を同定し、その後組換え方法によってこのような分子を産生させることによって行う。典型的には、イントロン融合タンパク質は、CSRポリペプチドの野生型または優性型をコードしているRNAの対応する配列中に存在しない、イントロン融合タンパク質をコードしているRNA中の1つまたは複数のストップコドンの存在によって短縮されている。アミノ酸および/またはストップコドンの付加は、ポリペプチドの野生型または優性型とは大きさおよび配列が異なるイントロン融合タンパク質をもたらす可能性がある。

【0060】

本明細書中の目的のためのイントロン融合タンパク質には、天然コンビナトリアルおよび合成のイントロン融合タンパク質が含まれる。天然のイントロン融合タンパク質とは、遺伝子の1つもしくは複数のエクソンによってコードされているポリペプチドの1つまたは複数の部分に連結したイントロンによってコードされている、1つあるいは複数のアミノ酸を含む選択的スプライシングされたRNA分子によってコードされている、ポリペプチドをいう。選択的スプライシングされたmRNAは、単離するか、または遺伝子内でスプライスドナー部位およびアクセプター部位を連結させることによって合成して調製することができる。天然のイントロン融合タンパク質は、イントロン配列によってコードされている1つもしくは複数のアミノ酸および/またはストップコドンを含み、一般に細胞お

10

20

30

40

50

よび／または組織中に存在するが、スプライスドナー部位およびアクセプター部位を同定すること、ならびにコードされた潜在的なスプライシング変異体を同定することによって、遺伝子から同定することができる。コンビナトリアルイントロン融合タンパク質とは、ポリペプチドの野生型または優性型と比較して短縮されているポリペプチドをいう。典型的には、短縮することにより、活性が変更されるように1つまたは複数のドメインもしくはその一部分がポリペプチドから取り除かれる。コンビナトリアルイントロン融合タンパク質は多くの場合、1つまたは複数のドメインもしくはその一部分が、同じ遺伝子由来または関連遺伝子ファミリー中の遺伝子由来の天然のイントロン融合タンパク質では欠失しているという点で、天然のイントロン融合タンパク質を模倣する。自然に存在せず、生じる構築物がCSRの活性を変調するように合成または分子をイントロンに連結させることによって調製するものは、「合成」である。

10

【0061】

イントロン融合タンパク質に関して本明細書中で使用する天然とは、（適切なスプライスアクセプター／ドナー部位の存在によって）動物のゲノム内にコードされている、および／あるいは動物内で産生もしくは作製されるまたは遺伝子から産生することができる、任意のタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドまたはその断片をいう。天然のイントロン融合タンパク質には対立遺伝子変異体が含まれる。イントロン融合タンパク質は翻訳後に修飾することができる。

【0062】

本明細書中で使用するエクソンとは、RNAへと転写され、スプライシングおよび他のRNAプロセッシングののちにmRNA（メッセンジャーRNA）などのRNAの成熟型で表されるヌクレオチドの配列を含む、核酸分子をいう。mRNAは、動作可能に連結した1つまたは複数のエクソンを含む。エクソンは、ポリペプチドまたはポリペプチドの一部分をコードしていることができる。また、エクソンは、非翻訳配列、たとえば翻訳調節配列も含むことができる。エクソン配列は多くの場合保存されており、遺伝子ファミリーメンバー間で相同性を示す。

20

【0063】

本明細書中で使用するイントロンとは、RNAへと転写され、その後、典型的にはスプライシングによってRNAから取り除かれてRNAの成熟型、たとえばmRNAを生じる、ヌクレオチドの配列をいう。典型的には、イントロンのヌクレオチド配列は成熟RNA内に取り込まれず、また、イントロン配列またはその一部分は、典型的には翻訳されずにポリペプチド内にも取り込まれない。細胞のスプライシング機構によってスプライスドナーおよびアクセプターなどのスプライシングシグナル配列が用いられて、RNAからイントロンが取り除かれる。1つのスプライシング変異体中のイントロンが、別の変異体中ではエクソン（すなわちスプライシングされた転写物中に存在する）となることができることは、注目すべきである。したがって、イントロン融合タンパク質をコードしているスプライシングされたmRNAはエクソンおよびイントロンを含んでいることができる。

30

【0064】

本明細書中で使用するスプライシングとは、mRNA中のイントロンが取り除かれ、エクソンが動作可能に連結されて、メッセンジャーRNA（mRNA）が作製されるRNA成熟のプロセスをいう。

40

【0065】

本明細書中で使用する選択的スプライシングとは、1つの遺伝子から複数のmRNAを産生するプロセスをいう。選択的スプライシングには、1つの遺伝子のエクソンのすべてではないエクソンを動作可能に連結させること、および／または1つの遺伝子に由来するすべての転写物中には存在しない1つもしくは複数の選択的エクソンを動作可能に連結させることが含まれていることができる。

【0066】

本明細書中で使用するエクソン欠失とは、ポリペプチドの野生型または優性型をコードしているRNA分子と比較して、少なくとも1つのエクソンを欠いている核酸分子を産生

50

する選択的RNAスプライシングの現象をいう。欠失したエクソンを有するRNA分子は、このような選択的スプライシングによって、または、エクソンを欠失させるための *in vitro* 方法などの任意の他の方法によって、産生することができる。

【0067】

本明細書中で使用するエクソン挿入とは、ポリペプチドの野生型または優性型をコードしているRNA分子中に典型的には存在しない少なくとも1つのエクソンを含む核酸分子を産生する、選択的RNAスプライシングの現象をいう。挿入されたエクソンを有するRNA分子は、このような選択的スプライシングによって、またはエクソンを付加もしくは挿入するための *in vitro* 方法などの任意の他の方法によって産生することができる。

10

【0068】

本明細書中で使用するエクソン伸長とは、ポリペプチドの野生型または優性型をコードしているRNA中の対応するエクソンよりも長い（エクソン中に含まれるヌクレオチド数が多い）少なくとも1つのエクソンを含む核酸を産生する、選択的RNAスプライシングの現象をいう。伸長されたエクソンを有するRNA分子は、このような選択的スプライシングによって、またはエクソンを伸長させる *in vitro* 方法などの任意の他の方法によって産生することができる。場合によっては、本明細書中に記載のように、エクソン伸長によって産生されたmRNAはイントロン融合タンパク質をコードしている。

【0069】

本明細書中で使用するエクソン切断とは、1つもしくは複数のエクソンがポリペプチドの野生型または優性型をコードしているRNA分子中の対応するエクソンよりも短い（ヌクレオチド数が少ない）ように、1つもしくは複数のエクソンの切断または短縮を含む核酸分子を産生する、選択的RNAスプライシングの現象をいう。切断されたエクソンを有するRNA分子は、このような選択的スプライシングによって、またはエクソンを切断するための *in vitro* 方法などの任意の他の方法によって産生することができる。

20

【0070】

本明細書中で使用するイントロン保持とは、1つまたは複数のエクソンに動作可能に連結したイントロンまたはその一部分を含む核酸分子を産生する、選択的RNAスプライシングの現象をいう。イントロンまたはその一部分を保持しているRNA分子は、このような選択的スプライシングによって、または、保持されたエクソンを有するRNA分子を産生するための *in vitro* 方法などの任意の他の方法によって産生することができる。場合によっては、本明細書中に記載のように、イントロン保持によって産生されたmRNA分子はイントロン融合タンパク質をコードしている。

30

【0071】

本明細書中で使用する、遺伝子配列とも呼ばれる遺伝子とは、少なくとも1つのポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含めた、RNA（イントロンおよびエクソン）へと転写されるヌクレオチドの配列をいう。遺伝子には、RNAの転写およびプロセッシングを調節するヌクレオチドの配列が含まれる。遺伝子にはまた、プロモーターおよびエンハンサーなどのヌクレオチドの調節配列、ならびに翻訳調節配列も含まれる。

【0072】

本明細書中で使用するスプライス部位とは、イントロンの除去および／またはエクソンの結合に関与する、遺伝子内の1つまたは複数のヌクレオチドをいう。スプライス部位にはスプライスアクセプター部位およびスプライスドナー部位が含まれる。

40

【0073】

本明細書中に提供するアイソフォームに関して本明細書中で使用する同族受容体とは、特定のアイソフォームと同じ遺伝子によってコードされている受容体をいう。一般に、同族受容体は特定の細胞または組織内の有性型でもある。たとえば、ヘルスタチンは、p185-HER2（ErbB2受容体）をコードしているpre-mRNAのスプライシング変異体によってコードされている。したがって、p185-HER2はヘルスタチンの同族受容体である。

50

【0074】

本明細書中で使用する野生型、たとえばポリペプチドの野生型とは、遺伝子によってコードされているポリペプチドをいう。典型的には、野生型とは、突然変異または機能もしくは構造を変更する他の修飾を有さない遺伝子（またはそれに由来するRNAもしくはタンパク質）をいう。野生型には種にわたる対立遺伝子変異および種間の対立遺伝子変異が含まれる。

【0075】

本明細書中で使用する優性型、たとえばポリペプチドの優性型とは、遺伝子から産生される主要なポリペプチドであるポリペプチドをいう。「優性型」はその源に応じて異なる。たとえば、異なる細胞または組織の型により、たとえば選択的スプライシングによっておよび／または選択的タンパク質プロセッシングによって、異なる型のポリペプチドが産生されることができる。それぞれの細胞または組織の型において、異なるポリペプチドが「優性型」となることができる。

【0076】

本明細書中で使用するドメインとは、1つまたは複数の構造モチーフ（たとえばループ領域によって結合された α ヘリックスおよび／もしくは β 鎖の組合せ）からなる、および／あるいはキナーゼ活性などの機能的活性によって認識される、タンパク質内に独立して折り畳み構造を形成することができるポリペプチド鎖の一部分（典型的には3つ以上、一般には5または7つ以上のアミノ酸の配列）をいう。タンパク質は1つまたは複数の明確に異なるドメインを有することができる。たとえば、ドメインは、細胞外ドメインを定義する相同性およびモチーフなどの、関連するファミリーメンバーに対するドメイン内の配列の相同性によって同定、定義または識別することができる。別の例では、ドメインは、酵素活性、たとえばキナーゼ活性などのその機能によって、またはDNA結合、リガンド結合、および二量体化などの生体分子と相互作用する能力によって、識別することができる。ドメインは、ドメインが独立してまたは別の分子と融合してたとえばタンパク質分解活性などの活性もしくはリガンド結合を行うことができるように、独立して生物学的機能または活性を示すことができる。ドメインは、ポリペプチド由来のアミノ酸の直鎖状配列またはアミノ酸の非直鎖状配列であることができる。多くのポリペプチドは複数のドメインを含む。たとえば、受容体チロシンキナーゼは、典型的には細胞外ドメイン、膜にまたがる（膜貫通）ドメインおよび細胞内チロシンキナーゼドメインを含む。

【0077】

本明細書中で使用するドメインのすべてまたは一部分を欠いているポリペプチドとは、同族ポリペプチドと比較して、ドメインの1つもしくは複数のアミノ酸またはすべてのアミノ酸が欠失しているポリペプチドをいう。ドメインの全体または一部を欠いているポリペプチドにおいて欠失しているアミノ酸は、同族ポリペプチドのドメイン内の連続したアミノ酸である必要はない。ドメインのすべてまたは一部を欠いているポリペプチドには、同族ポリペプチドの活性と比較したポリペプチドの活性の損失もしくは低下、またはポリペプチド中の構造の損失が含まれていることができる。

【0078】

たとえば、同族受容体が膜貫通ドメインを有する場合は、膜貫通ドメインのすべてまたは一部を欠いている受容体アイソフォームポリペプチドは、同族受容体中の同じアミノ酸位置に対応するアミノ酸間で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のアミノ酸の欠失を有することができる。

【0079】

本明細書中で使用するドメインを含むポリペプチドとは、同族受容体の対応するドメインに関して完全なドメインを含むポリペプチドをいう。完全なドメインは、同族ポリペプチド内のその特定のドメインの定義に関連して決定される。たとえば、ドメインを含む受容体アイソフォームとは、同族受容体中で見つかる完全なドメインに対応するドメインを含むアイソフォームをいう。たとえば、同族受容体がアミノ酸位置400～420に21

10

20

30

40

50

個のアミノ酸の膜貫通ドメインを含む場合は、このような膜貫通ドメインを含む受容体アイソフォームは、同族受容体の21個のアミノ酸のドメインと実質的な同一性を有する21個のアミノ酸のドメインを含む。実質的な同一性とは、同族受容体のドメインと比較して、対立遺伝子変異および保存的置換を含むことができるドメインをいう。実質的に同一であるドメインは、同族受容体のドメインと比較して、アミノ酸の欠失、非保存的な置換または挿入を有さない。ドメイン（すなわちフリン（f u r i n）ドメイン、I g 様ドメイン）は多くの場合、ドメイン、具体的にはタンパク質に対する構造的および／または配列相同性によって同定される。

【0080】

このようなドメインは、これを同定することができる当業者に知られている。本明細書中での例のために定義を提供するが、特定のドメインを名称によって認識することは当業者の技術範囲内にあることを理解されたい。必要な場合は、ドメインを同定するために適切なソフトウェアを用いることができる。

【0081】

本明細書中で使用する細胞外ドメインとは、受容体の表面に生じる細胞表面受容体の部分であり、リガンド結合部位が含まれる。一例では、エフリン受容体リガンド結合ドメイン（E P H__l b d）が、タンパク質受容体とエフリンリガンドとの結合を媒介するポリペプチド部分である。典型的には、E p h A 受容体が G P I に固定されたエフリンーA リガンドと結合し、一方で E p h B 受容体が膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを有するエフリンーB タンパク質と結合する。

【0082】

たとえば E r b B 2 中のものなどの受容体 L ドメイン（R L D）は、リガンド結合部位を含むドメインの別例である。それぞれの L ドメインは、第2の L ドメインと会合してリガンド分子を収容するために十分な大きさの中心空間を取り囲む三次元の二葉性構造を形成することができる、一本鎖の右方向βヘリックスを含む。

【0083】

本明細書中で使用するフリンドメインとは、当業者によってそのように認識されるドメインであり、システインに富んだ領域である。フリンは1型膜貫通セリンプロテアーゼである。フリンドメインはフリンプロテアーゼの切断部位として機能する。

【0084】

本明細書中で使用する S e m a ドメインとは、当業者によってそのように認識されるドメインであり、受容体の認識および結合モジュールである。S e m a ドメインは、4つのジスルフィド結合を形成して構造を安定化させる保存された一組のシステイン残基によって特徴づけられている。S e m a ドメインの折畳みはβプロペラトポロジーの変形であり、7つの羽根が中心軸の周りに放射状に配置されている。それぞれの羽根は4本鎖の逆平行のβシートを含む。S e m a ドメインは最初と最後の羽根の間の円を閉じるために「ループフック」システムを用いている。羽根は、第7の（C末端の）羽根の最も外側の鎖を提供することによってN末端のβ鎖が円を閉じ、逐次的に構成される。βプロペラは、羽根6の外側の端にN末端を伸長して追加の第5のβ鎖を提供することによって、さらに安定化される。

【0085】

本明細書中で使用するプレキシンドメインとは、当業者によってそのように認識されるドメインであり、システインに富んだ反復を含む。プレキシンは、複合体として膜結合したセマフォリンと相互作用する受容体である。プレキシンは、散乱係数に誘導される運動性の受容体である c - m e t に対して相同性を有する3つのドメインを含むが、c - m e t の本来のチロシンキナーゼ活性を欠いている。細胞内では、不変のアルギニンによりグアノシントリホスファターゼ活性化タンパク質に対して相同性を有するプレキシンドメインが同定される。タンパク質は1つまたは複数のプレキシンドメインを含むことができる。本明細書中に記載のように、M E T 受容体は単一のプレキシンドメインを含む。

【0086】

本明細書中で使用する F 5 / 8 C 型ドメインとは、当業者によってそのように認識されるドメインであり、2つのβシートに配置された8つの逆平行鎖を含む、歪んだジェリーロール型のβバレルモチーフを示すドメインである。βバレルの下方部分は、塩基性残基の優勢および3つの隣接した突出したループによって特徴づけられている。F 5 / 8 C 型ドメインを形成するポリペプチド部分は2つの保存されたシステインを含んでおり、これはドメインの末端をジスルフィド結合によって連結される。

【0087】

本明細書中で使用する I g 様ドメインとは、当業者によってそのように認識されるドメインであり、疎水性の相互作用によって安定化され、かつ鎖間のジスルフィド結合によって一緒になって挟まれている (sandwiched)、2つのβシートの緻密な折畳み構造を形成するβ鎖の折畳みを含むドメインである。一例では、I g 様C型ドメインは、4つのβ鎖が1つのβシートを形成し、3つのβ鎖が第2のβシートを形成するように、4本の鎖および3本の鎖として配置されている7つのβ鎖を含む。別の例では、I g 様V型ドメインは、4つのβ鎖および5つのβ鎖として配置されている9つのβ鎖を含む (J aneway C. A. 他 (編) : 免疫生物学—健康および疾患における免疫系 (Immunobiology—the immune system in health and disease)、第5版、New York、Garland Publishing、2001)。

【0088】

本明細書中で使用するフィブロネクチン I I I 型 (FN3) ドメインとは、当業者によってそのように認識されるドメインであり、一方のβシートが4本の鎖を含み、他方のシートが3本の鎖を含む、保存されたβサンドイッチ折畳みを含む。FN3ドメインおよびI g 様ドメインの折畳み構造は、FN3ドメインが保存されたジスルフィド結合を欠いている以外は位相幾何学的に非常に類似している。FN3ドメインをコードしているポリペプチド部分はまた、血栓症、炎症、および腫瘍転移を変調する細胞接着分子との相互作用を媒介する、Arg-Gly-Asp (RGD) を含むアミノ酸の短いストレッチによって特徴づけられている。一例では、EphA1は2つのFN3ドメインを含む。

【0089】

本明細書中で使用する I P T / T I G ドメインとは、当業者によってそのように認識されるドメインであり、免疫グロブリンの折畳み様のドメインを有する。タンパク質は1つまたは複数の I P T / T I G ドメインを含む。I P T / T I G ドメインは、プレキシン、転写因子、ならびにたとえば細胞増殖および細胞接着を調節すると考えられている本明細書中に記載の細胞表面受容体METおよびRONなどの受容体タンパク質の細胞外領域中に見つかる (Johnson CA 他、Journal of Medical Genetics、40:311~319、(2003))。

【0090】

本明細書中で使用する E G F ドメインとは、当業者によってそのように認識されるドメインであり、タンパク質の三次元構造に重要であり、したがって受容体および他の分子によるその認識に重要であるいくつかの保存されたシステイン残基を含む、反復パターンを含む。本明細書中に記載の E G F ドメインは、ジスルフィド結合の形成に関与している6つのシステイン残基を含む。E G F ドメインは2本鎖のβシート、次いでループを形成し、C末端の短い2本鎖のシートを形成する。保存されたシステイン間のサブドメインは長さが異なる。E G F ドメインの反復は、典型的には、たとえば本明細書中に記載の Tie-1 などのように膜結合タンパク質の細胞外ドメイン中に見つかる。E G F ドメインの変形は、本明細書中に記載のように6つではなく8つの保存されたシステインを有し、したがって平均的な E G F モジュールよりも長く、かつ E G F 様領域のさらなるジスルフィド結合C末端を含む、ラミニン (Lam) E G F ドメインである。

【0091】

本明細書中で使用する C 6 ドメインとは、ポリペプチドのN末端領域中の典型的には約110~160個のアミノ酸の、システインに富んだドメインである。これは、鎖間のジ

10

20

30

40

50

スルフィド結合に關与する6つの保存されたシステインを含む、約40個の残基ずつの4つ、または場合によっては3つ以上のモジュールに細分することができる。タンパク質は1つまたは複数のC6ドメインを有することができる。本明細書中に記載のように、たとえばTNFR2は3つのC6ドメインを含む。

【0092】

本明細書中で使用する膜貫通ドメインとは、受容体を固定している形質膜にまたがり、一般に疎水性残基を含む。

【0093】

本明細書中で使用する細胞質ドメインとは、シグナル伝達に關与し、膜貫通細胞表面受容体の細胞質部分中に生じるドメインである。一例では、細胞質ドメインはプロテインキナーゼ(PK)ドメインを含むことができる。PKドメインとは、当業者によってそのように認識され、かつ保存された触媒核を含むドメインである。保存された触媒核は、ATP結合に關与することが示されているドメインのN末端の端にあるリシン残基の近傍に、および酵素の触媒活性に重要である触媒ドメインの中心部分にあるアスパラギン酸残基の近傍に、グリシンに富んだ残基のストレッチを有すると認識されている。典型的には、PKドメインは、たとえばチロシンキナーゼドメインを含むタンパク質がチロシン残基上の基質タンパク質をリン酸化し、一方で、たとえばセリン/スレオニンプロテインキナーゼドメインを含むタンパク質がセリンまたはスレオニン残基上の基質タンパク質をリン酸化するなどのように、受容体ドメインの基質特異性に応じてセリン/スレオニンプロテインキナーゼまたはチロシンプロテインキナーゼドメインであることができる。

【0094】

本明細書中で使用する不穏性αモチーフ(SAM)ドメインは、タンパク質-タンパク質相互作用モジュールと見なされている。SAMドメインとは、当業者によってそのように認識され、典型的には約70個の残基にわたって拡がって、2つの大きな界面を有する小さな5つのヘリックスの束に配置された独立して折り畳まれた構造を形成するドメインである。一例、たとえばEphB2のSAMドメインなどでは、界面のそれぞれが二量体を形成する能力を有する。SAMドメインがホモまたはヘテロオリゴマーを形成する能力により、タンパク質タンパク質の相互作用を媒介する結合表面が作製される。

【0095】

本明細書中で使用する対立遺伝子変異体または対立遺伝子変異とは、遺伝子の基準型とは異なる遺伝子によってコードされているポリペプチド(すなわち対立遺伝子によってコードされている)を指す。典型的には、遺伝子の基準型は、種の集団または単一の基準メンバー由来のポリペプチドの野生型および/もしくは優性型をコードしている。典型的には、種間および種にわたる変異体を含めた対立遺伝子変異体には、典型的には、同一種由来の野生型および/もしくは優性型と少なくとも80%、90%またはそれ以上のアミノ酸の同一性が含まれ、同一性の度合いは、遺伝子、および比較が種内であるか種間であるかに依存する。一般に、種内の対立遺伝子変異体は野生型および/あるいは優性型と、少なくとも約80%、85%、90%もしくは95%の同一性またはそれ以上を有し、ポリペプチドの野生型および/または優性型と96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するものが含まれる。

【0096】

ポリペプチドのアミノ酸の配列または核酸分子中のヌクレオチドの配列の修飾に關して本明細書中で使用する修飾には、それぞれアミノ酸ならびにヌクレオチドの欠失、挿入、および置換が含まれる。

【0097】

本明細書中で使用するオープンリーディングフレームとは、機能的ポリペプチドまたはその一部分、典型的には少なくとも約50個のアミノ酸をコードしているヌクレオチドの配列をいう。オープンリーディングフレームは、完全長のポリペプチドまたはその一部分をコードしていることができる。オープンリーディングフレームは、ストップコドンがイントロン中にあり、イントロンのすべてまたは一部分が転写されたmRNA中に存在する

場合に、1つもしくは複数のエクソンまたはエクソンとイントロンとを動作可能に連結させることによって作製することができる。

【0098】

本明細書中で使用するポリペプチドとは、共有結合した2つ以上のアミノ酸をいう。用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、本明細書中では互換性があるように用いる。

【0099】

核酸分子またはタンパク質の短縮に関して本明細書中で使用する切断もしくは短縮とは、タンパク質または核酸分子の野生型もしくは優性型と比較して、完全長よりも短いヌクレオチドの配列またはアミノ酸をいう。

10

【0100】

本明細書中で使用する基準遺伝子とは、遺伝子内のイントロンおよびエクソンの地図作成に用いることができる遺伝子をいう。基準遺伝子は、遺伝子中のイントロンおよびエクソンの地図作成を行うためにたとえば発現された遺伝子配列と比較することができる、ゲノムDNAまたはその一部分であることができる。また、基準遺伝子はポリペプチドの野生型または優性型をコードしている遺伝子であることもできる。

【0101】

本明細書中で使用するタンパク質または遺伝子のファミリーもしくは関連ファミリーとは、それぞれ、互いに相同性ならびに／または構造的類似度および／もしくは機能的類似度を有する、タンパク質または遺伝子の群をいう。

20

【0102】

本明細書中で使用する早期ストップコドンとは、ポリペプチドの野生型もしくは優性型などのタンパク質の完全長の形を産生または作製するために用いるストップコドンの前に、配列のオープンリーディングフレーム中に生じるストップコドンである。早期ストップコドンの発生は、たとえば選択的スプライシングおよび突然変異の結果である場合がある。

【0103】

本明細書中で使用する発現された遺伝子配列とは、遺伝子から転写された、または転写されると予測された任意のヌクレオチドの配列をいう。発現された遺伝子配列には、それだけには限定されないが、cDNA、EST、ならびにたとえばスプライス部位の予測およびスプライシングされた配列の *in silico* 作製に基づいた発現された配列の *in silico* 予測が含まれる。

30

【0104】

本明細書中で使用する発現された配列タグ (EST) とは、発現された遺伝子配列から作製したヌクレオチドの配列をいう。ESTは、cDNAを産生するためにmRNAの集団を用いて作製する。cDNA分子は、たとえばmRNA上に存在するポリAテイルから開始することによって産生することができる。また、cDNA分子は、mRNA内でcDNAの内部合成を開始する1つまたは複数のオリゴヌクレオチドを用いて、ランダムプライミングによっても産生することができる。作製されたcDNA分子の配列決定を行い、配列を典型的にはデータベースに記憶する。ESTデータベースの例は、*ncbi.nlm.nih.gov/dbEST* にオンラインで見つかるdbESTである。それぞれのEST配列には、典型的に固有の識別子が割り当てられており、ヌクレオチドの配列、長さ、発現された場所の組織型、および他の関連するデータなどの情報が識別子に関連づけられている。

40

【0105】

本明細書中で使用するキナーゼとは、巨大分子および小分子を含めた分子、典型的には生体分子をリン酸化する能力を有するタンパク質である。たとえば、分子は小分子またはタンパク質であることができる。リン酸化には自己リン酸化が含まれる。一部のキナーゼは構成的キナーゼ活性を有する。他のキナーゼは活性化を要する。たとえば、シグナル伝達に関与する多くのキナーゼはリン酸化されている。リン酸化により、経路中の別の生体

50

分子に対するそのキナーゼ活性が活性化される。一部のキナーゼは、タンパク質構造の変化および／または別の分子との相互作用によって変調される。たとえば、タンパク質の複合体化または分子のキナーゼへの結合分子により、キナーゼ活性が活性化または阻害されることができる。

【0106】

本明細書中で使用する指定とは、基準または比較点としての分子の選択もしくはその一部分をいう。たとえば、選択されたドメイン内で修飾されたポリペプチドを構築するための指定ドメインとして、ドメインを選択することができる。別の例では、選択されたイントロンを含むまたは排除するRNA転写物を同定するために、イントロンを指定イントロンとして選択することができる。

10

【0107】

本明細書中で使用する、変調するおよび変調とは、タンパク質などの分子の活性の変化をいう。例示的な活性には、それだけには限定されないが、シグナル伝達およびタンパク質リン酸化などの生物活性が含まれる。変調には、活性の増大（すなわちアップレギュレーション作用活性）、活性の低減（すなわちダウンレギュレーションもしくは阻害）または活性の任意の他の変更（特異性、頻度、期間、速度など）が含まれていることができる。変調は状況に依存する可能性があり、典型的には、変調は指定の状態、たとえば野生型タンパク質、構成的状態のタンパク質、または指定の細胞種もしくは状態において発現されたタンパク質と比較する。

【0108】

本明細書中で使用する、阻害するおよび阻害とは、阻害されていない活性に対する生物活性などの活性の低下をいう。

20

【0109】

本明細書中で使用する組成物とは、任意の混合物をいう。これは、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水溶液、非水性溶液、またはその任意の組合せであることができる。

【0110】

本明細書中で使用する組合せとは、2つ以上の項目間またはそれにわたる任意の関連性をいう。組合せは、2つの組成物もしくは2つのコレクションなどの2つ以上の個別の項目、2つ以上の項目の単一の混合物などのその混合物、またはその任意の変形であることができる。組合せの要素は、一般に機能的に関連しているまたは関係がある。キットとは、任意選択で組合せもしくはその要素の使用説明書を含み、および／または任意選択でキットを意図する方法で用いる他の試薬および容器および道具および装置を含む、梱包した組合せをいう。

30

【0111】

本明細書中で使用する製薬上の効果とは、疾患もしくは障害の治療またはその症状の寛解を意図した薬剤を投与した際に観察される効果をいう。

【0112】

本明細書中で使用する治療とは、状態、障害もしくは疾患の症状または他の徴候が寛解されるか、または他の様式で有益に変更された、任意の様式を意味する。

【0113】

本明細書中で使用する治療効果とは、疾患もしくは状態の症状を変化させる、典型的には改善または寛解させる、あるいは疾患または状態を治癒する、対象の治療の結果生じる効果を意味する。治療上有効な量とは、対象に投与した結果として治療効果をもたらす、組成物、分子または化合物の量をいう。

40

【0114】

本明細書中で使用する用語「対象」とは、ヒトなどの哺乳動物を含めた動物をいう。本明細書中で使用する患者とは、ヒト対象をいう。

【0115】

本明細書中で使用する活性とは、ポリペプチドなどの生体分子の機能または機能性もしくは変化または相互作用をいう。このような活性の例は、それだけには限定されないが、

50

複合体化、二量体化、多量体化、受容体関連キナーゼの活性または他の酵素活性もしくは触媒活性、受容体関連プロテアーゼの活性、リン酸化、脱リン酸化、自己リン酸化、他の分子と複合体形成する能力、リガンド結合、触媒活性もしくは酵素活性、自己活性化および他のポリペプチドの活性化を含めた活性化、別の分子の機能の阻害もしくは変調、細胞増殖、遊走、分化、および増殖などのシグナル伝達ならびに／または細胞応答の刺激もしくは阻害、分解、膜局在化、膜結合、発癌である。活性は、本明細書中に記載のアッセイによって、それだけには限定されないが、細胞系アッセイを含めた *in vitro* アッセイ、特定の疾患の動物モデルにおけるアッセイを含めた *in vivo* アッセイを含む、当業者に知られている任意の適切なアッセイによって評価することができる。生物活性とは、*in vivo* で示された活性をいう。本明細書中の目的では、生物活性とは、本明細書中に提供するポリペプチドによって示された活性のうちの任意のものをいう。 10

【0116】

本明細書中で使用する血管形成病（もしくは血管形成関連病）とは、血管形成のバランスが変更されているまたはそのタイミングが変更されている疾患をいう。血管形成病には、望ましくない血管化などの血管形成の変更が起こるものが含まれる。このような疾患には、それだけには限定されないが、癌、糖尿病性網膜症および他の糖尿病性合併症を含めた細胞増殖性障害、炎症性疾患、子宮内膜症ならびに上述のものを含めた過剰の血管化が疾患プロセスの一部である他の疾患が含まれる。

【0117】

本明細書中で使用する複合体化とは、複合体を形成する、2つのタンパク質分子などの2つ以上の分子の相互作用をいう。相互作用は非共有結合および／または共有結合によるものであることができ、それだけには限定されないが、疎水性相互作用および静電的な相互作用、ファンデルワールス力ならびに水素結合が含まれる。一般に、タンパク質-タンパク質の相互作用には疎水性相互作用および水素結合が関与する。複合体化は、温度、pH、イオン強度および圧力、ならびにタンパク質濃度などの環境条件によって影響を受けることができる。 20

【0118】

本明細書中で使用する二量体化とは、2つの受容体分子などの2つの同型の分子の相互作用をいう。二量体化には、2つの同一の分子が相互作用するホモ二量体化が含まれる。また、二量体化には、受容体の2つのサブユニットなどの2つの異なる分子のヘテロ二量体化、および2つの異なる受容体分子の二量体化も含まれる。典型的には、二量体化は、それぞれの分子に含まれる二量体化ドメインの相互作用によって互いに相互作用する2つの分子が関与する。 30

【0119】

本明細書中で使用するリガンド拮抗剤とは、リガンドとCSRとの相互作用の結果生じる活性を拮抗する、CSRの活性アイソフォームをいう。

【0120】

本明細書中で使用する *in silico* とは、コンピュータを用いて行った研究および実験をいう。*In silico* 方法には、それだけには限定されないが、分子モデリング研究、生体分子結合実験、ならびに分子構造および／または分子の相互作用などのプロセスの仮想表示が含まれる。 40

【0121】

本明細書中で使用する生体試料とは、生命源もしくはウイルス源または巨大分子および生体分子の他の源から得た任意の試料をいい、核酸もしくはタンパク質または他の巨大分子を得ることができる対象の任意の細胞種あるいは組織が含まれる。生体試料は、生物源から直接得た試料、または加工した試料であることができる。たとえば、増幅された単離した核酸は生体試料を構成する。生体試料には、それだけには限定されないが、血液、血漿、血清、脳脊髄液、潤滑液、尿および汗などの体液、動物および植物由来の組織および器官の試料ならびにそれらに由来する加工した試料が含まれる。また、これには、土壌および水の試料ならびに他の環境試料、ウイルス、細菌、真菌藻類、原虫およびそれらの成 50

分も含まれる。

【0122】

本明細書中で使用する巨大分子とは、数百から数百万までの分子量を有する任意の分子をいう。巨大分子には、ペプチド、タンパク質、ヌクレオチド、核酸、および一般に生物によって合成される他のこのような分子が含まれるが、合成によって、または組換え分子生物学方法によって調製することができる。

【0123】

本明細書中で使用する生体分子とは、自然に見つかる任意の化合物またはその誘導体である。例示的な生体分子には、それだけには限定されないが：オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、ペプチド核酸（PNA）、オリゴ糖および単糖が含まれる。

【0124】

本明細書中で使用する用語「核酸」とは、デオキシリボ核酸（DNA）やリボ核酸（RNA）などの一本鎖および／または二本鎖のポリヌクレオチド、ならびにRNAもしくはDNAのどちらかの類似体または誘導体をいう。また、用語「核酸」には、ペプチド核酸（PNA）、ホスホロチオエートDNA、ならびに他のこのような類似体および誘導体などの核酸の類似体またはそれらの組合せも含まれる。核酸とは、デオキシリボ核酸（DNA）およびリボ核酸（RNA）などのポリヌクレオチドをいうことができる。また、この用語には、均等物として、ヌクレオチド類似体、一本鎖（センスもしくはアンチセンス）および二本鎖ポリヌクレオチドから作製した、RNAまたはDNAのどちらかの誘導体、変異体ならびに類似体も含まれる。デオキシリボヌクレオチドには、デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシンおよびデオキシチミジンが含まれる。RNAでは、ウラシル塩基はウリジンである。

【0125】

本明細書中で使用する用語「ポリヌクレオチド」とは、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、および、たとえばヌクレオチド類似体またはリン酸ジエステル結合以外の「主鎖」結合、たとえばリン酸トリエステル結合、ホスホラミデート結合、ホスホロチオエート結合、チオエステル結合、もしくはペプチド結合（ペプチド核酸）を含むDNAあるいはRNA誘導体を含めた、少なくとも2つの連結したヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体を含むオリゴマーまたはポリマーをいう。また、用語「オリゴヌクレオチド」は、本明細書中では本質的に「ポリヌクレオチド」と同義で用いられるが、当業者は、オリゴヌクレオチド、たとえばPCRプライマーは、一般に約50～100個未満のヌクレオチド長であることを理解されよう。

【0126】

ポリヌクレオチドには、ヌクレオチド類似体、たとえばポリヌクレオチドの質量の識別を可能にする質量を改変したヌクレオチド；ポリヌクレオチドの検出を可能にする蛍光、放射性、発光もしくは化学発光標識などの検出可能な標識を含むヌクレオチド；またはポリヌクレオチドを固体担体に固定することを容易にするビオチン基もしくはチオール基などの反応基を含むヌクレオチドが含まれていることができる。また、ポリヌクレオチドは、たとえば化学的に、酵素的に、または光分解によって選択的に切断可能な1つもしくは複数の主鎖結合を含んでいることができる。たとえば、ポリヌクレオチドは、1つまたは複数のデオキシリボヌクレオチド、次いで1つまたは複数のリボヌクレオチドを含んでいることができ、これは次いで1つまたは複数のデオキシリボヌクレオチドを含んでいることができ、このような配列は塩基の加水分解によってリボヌクレオチド配列で切断可能である。また、ポリヌクレオチドは、切断に対して比較的耐性のある1つまたは複数の結合、たとえばキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含んでいることもでき、これは、ペプチド核酸結合によって連結されているヌクレオチド、および3'末端にリン酸ジエステル結合または他の適切な結合によって連結されている少なくとも1つのヌクレオチドを含んでいることができ、かつポリメラーゼによって伸長可能である。ペプチドの核酸配列は周知の方法を用いて調製することができる（たとえばWeiler他、Nucleic acid

10

20

30

40

50

c i d s Res. 25:2792~2799 (1997) 参照)。

【0127】

合成配列および合成遺伝子の文脈において本明細書中で使用する合成とは、組換え方法および／または化学合成方法によって産生される核酸分子をいう。

【0128】

本明細書中で使用するオリゴヌクレオチドとは、DNA、RNA、PNAなどの核酸類似体、およびそれらの組合せを含むポリマーをいう。本明細書中の目的では、プライマーおよびプローブは一本鎖オリゴヌクレオチドであるか、部分的に一本鎖のオリゴヌクレオチドである。

【0129】

10

本明細書中で使用するプライマーとは、2つ以上、一般には3つを超えるデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドであって、そこからプライマー伸長産物の合成を開始することができるオリゴヌクレオチドをいう。合成を助ける実験条件には、ヌクレオシド三リン酸およびDNAポリメラーゼなどの重合剤や伸長剤の存在、適切な緩衝液、温度、ならびにpHが含まれる。

【0130】

本明細書中で使用する、組換えDNA方法を用いた組換え手段による産生とは、クローニングしたDNAによってコードされているタンパク質を発現させるための、分子生物学の周知の方法の使用を意味する。

【0131】

20

核酸分子、オリゴヌクレオチド、ポリペプチドまたは抗体などの分子に関して本明細書中で使用する「単離した」とは、その天然の環境中で見つかるものから人工的に変更されている分子を示す。たとえば、組換え宿主細胞によって産生させたおよび／またはそれ内に含まれる分子は、「単離した」とみなされる。同様に、自然の源または組換え宿主細胞から部分的にもしくは実質的に精製した、あるいは合成方法によって産生した分子は、「単離した」と見なされる。意図する用途に応じて、単離した分子は、動物、細胞もしくはその抽出物中；脱水した形、蒸気、溶液もしくは懸濁液の形；または固体担体上に固定した形などの任意の形態で存在することができる。

【0132】

30

本明細書中で使用する用語「ベクター」とは、核酸分子であって、それに連結している別の核酸を輸送する能力を有する核酸分子をいう。ベクターの一種は、エピソード、すなわち染色体外複製が可能な核酸である。ベクターには、それが連結している核酸の自律複製および／または発現が可能なものが含まれる。それに動作可能に連結した遺伝子の発現を指揮する能力を有するベクターは、本明細書中では「発現ベクター」と呼ぶ。一般に、発現ベクターは多くの場合、そのベクターの形態では染色体に結合していない、一般に環状の二本鎖DNAループである「プラスミド」の形態にある。ベクターの最も一般的な形態がプラスミドであるので、「プラスミド」および「ベクター」は互換性があるように使用される。同等の機能を果たし、本明細書ののちに当分野で知られるようになる、発現ベクターの他のこのような形態。

【0133】

40

本明細書中で使用する「トランスジェニック動物」とは、動物の細胞のうちの1つまたは複数が、当分野で周知のトランスジェニック技術などの人の介入によって導入された異種核酸を含む、任意の動物、一般に非ヒト動物、たとえば哺乳動物、鳥または両生類をいう。核酸は、微量注入もしくは組換えウイルスを用いた感染などによる意図的な遺伝子操作によって細胞の前駆体内に導入することにより、直接または間接的に細胞に導入する。この分子は、染色体内に安定に組み込まれる、すなわち染色体の一部として複製されることができるか、または染色体外でDNAを複製することができる。典型的なトランスジェニック動物では、導入遺伝子により、細胞によるタンパク質の組換え型の発現が引き起こされる。

【0134】

50

本明細書中で使用するレポーター遺伝子構築物とは、転写制御配列に動作可能に連結したレポーターをコードしている核酸を含む核酸分子である。レポーター遺伝子の転写はこれらの配列によって制御されている。これらの制御配列のうちの少なくとも1つまたは複数の活性は、細胞表面タンパク質、細胞内のシグナル伝達に関与しているタンパク質もしくは小分子などの別の分子によって直接または間接的に調節されている。転写制御配列には、プロモーター、およびプロモーターの活性を変調するエンハンサー配列またはRNAポリメラーゼの活性もしくは効率を変調する制御配列などの他の調節領域が含まれる。このような配列は、本明細書中で転写制御要素または配列と総称する。さらに、構築物は、結果的に生じるmRNAの翻訳を変更し、したがってレポーター遺伝子産物の量を変更するヌクレオチドの配列を含んでいることができる。

10

【0135】

本明細書中で使用する「レポーター」または「レポーター部分」とは、細胞によって発現されたタンパク質または生物粒子などの目的分子の検出を可能にする任意の部分という。典型的なレポーター部分には、たとえば、赤色、青色および緑色蛍光タンパク質（たとえばウミシイタケ種および他の種由来のGFPを提供するU. S. Patent No. 6, 232, 107参照）などの蛍光タンパク質、大腸菌由来のlacZ、アルカリホスファターゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）および他のこのような周知の遺伝子が含まれる。細胞内での発現には、本明細書中で「レポーター遺伝子」と呼ぶ、レポーター部分をコードしている核酸を、目的タンパク質との融合タンパク質として、または目的プロモーターの制御下で、発現させることができる。

20

【0136】

核酸の配列に関して本明細書中で使用する語句「動作可能に連結した」とは、核酸分子またはそのセグメントが、一本鎖または二本鎖の形態のどちらであろうとDNAもしくはRNAなどの一片の核酸へと共有結合されていることを意味する。セグメントは必ずしも連続している必要はなく、むしろ、2つ以上の成分は、成分がその意図される様式で機能することを可能にする関係にあるように並列されている。たとえば、RNAのセグメント（エクソン）は、スプライシングなどによって動作可能に連結され単一のRNA分子を形成することができる。別の例では、DNAセグメントは動作可能に連結されていることができ、ここで、1つのセグメントの制御体上の制御配列あるいは調節配列が、他のセグメント発現もしくは複製または他のそのような制御を可能にする。したがって、レポーターもしくは任意の他のポリヌクレオチドに動作可能に連結した調節領域、または調節領域に動作可能に連結したレポーターもしくは任意のポリヌクレオチドの場合、ポリヌクレオチド／レポーターの発現は調節領域によって影響を受けるまたは制御される（たとえば、増大もしくは減少など、変調または変更される）。遺伝子発現には、ヌクレオチド配列および調節配列は、転写活性化タンパク質などの適切な分子シグナルが調節配列に結合した場合に遺伝子発現が制御されるまたは可能になるように結合されている。DNAなどの異種核酸と、プロモーター、エンハンサー、転写終結部位や翻訳終結部位、および他のシグナル配列などのヌクレオチドの調節配列ならびにエフェクター配列との動作可能な連結とは、このようなDNAとこのようなヌクレオチドの配列との関係性をいう。たとえば、異種DNAのプロモーターへの動作可能な連結とは、このようなDNAの転写が、読み枠中のDNAを特異的に認識、結合および転写するRNAポリメラーゼによってプロモーターから開始されるような、DNAとプロモーターとの物理的な関係性をいう。

30

40

【0137】

ポリペプチド中のアミノ酸に関して本明細書中で使用する用語「動作可能に連結した」とは、アミノ酸の共有結合（直接または間接）をいう。たとえば、語句「細胞表面受容体をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも1つのアミノ酸に動作可能に連結した細胞表面受容体の少なくとも1つのドメイン」の文脈中で用いた場合、細胞表面受容体からのドメインのアミノ酸が、結合、典型的にはペプチド結合を介した直接結合などによって、細胞表面受容体の遺伝子からのイントロンによってコードされているアミノ酸と共有結合しているか、またはリンカーまたは非ペプチド結合などを介

50

して間接的にもたすこともできることを意味する。したがって、細胞表面受容体をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも1つのアミノ酸に動作可能に連結した細胞表面受容体の少なくとも1つのドメインを含むポリペプチドは、イントロン融合タンパク質であることができる。これは、受容体の優性型中には見つからないが、優性型をコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている部分を含んでいる、1つまたは複数のアミノ酸を含む。これら1つまたは複数のアミノ酸は、細胞表面受容体をコードしている遺伝子のイントロン配列によってコードされている。このようなポリペプチドをコードしている核酸は、イントロン配列がスプライシングされた場合、または他の様式で細胞表面受容体のドメインをコードしているエクソン配列とフレーム内で共有結合された場合に産生されることができる。核酸分子の翻訳により、イントロン配列のアミノ酸が細胞表面受容体ドメインに共有結合しているポリペプチドが産生される。また、これらは、エクソンがイントロン部分とは異なる細胞表面受容体アイソフォームの遺伝子によってコードされているキメライントロン融合タンパク質を含めて、エクソンを含む部分とイントロンを含む部分とを連結させることによって合成して産生することができる。

10

【0138】

アイソフォームおよびイントロン融合タンパク質などのポリペプチドの作製に関して本明細書中で使用する語句「核酸から作製した」には、核酸配列からアミノ酸の配列への翻訳による、文字通りポリペプチド分子の作製およびポリペプチドのアミノ酸配列の作製が含まれる。

20

【0139】

本明細書中で使用するプロモーター領域とは、それが動作可能に連結したDNAの転写を制御する、遺伝子のDNAの一部をいう。プロモーター領域には、RNAポリメラーゼによる認識、結合および転写開始に十分なDNAの特異的配列が含まれる。プロモーター領域のこの一部分がプロモーターと呼ばれる。さらに、プロモーター領域には、RNAポリメラーゼのこの認識、結合および転写開始の活性を変調する配列が含まれる。このような配列は、シス作用性であるか、またはトランス作用性因子に応答性であることができる。プロモーターは、調節の性質に応じて構成的であるか調節されていることができる。

【0140】

本明細書中で使用する調節領域とは、動作可能に連結した遺伝子の発現に正または負の影響を与える、シス作用性のヌクレオチド配列を意味する。調節領域には、遺伝子の誘導性の（すなわち転写の増大に物質もしくはは刺激を要する）発現をもたらしヌクレオチドの配列が含まれる。誘導物質が存在するか、または濃度が上昇している場合は、遺伝子発現を増大させることができる。また、調節領域には遺伝子発現の抑制（すなわち物質またはは刺激が転写を減少させる）をもたらし配列が含まれていることもできる。抑制物質が存在するか、または濃度が上昇している場合は、遺伝子発現を減少させることができる。調節領域は、細胞増殖、細胞成長および細胞死、細胞分化ならびに免疫変調を含めた多くの *in vivo* 生物活性に影響を与える、それを変調する、または制御することが知られている。調節領域は典型的には1つまたは複数のトランス作用性タンパク質に結合し、その結果、遺伝子の転写の増大または減少のどちらかがもたらされる。

30

40

【0141】

遺伝子調節領域の具体例はプロモーターおよびエンハンサーである。プロモーターとは、転写または翻訳開始部位の周辺に位置する、典型的には翻訳開始部位の5'に配置されている配列である。プロモーターは通常、翻訳開始部位の1 Kb以内に位置するが、さらに離れて、たとえば、2 Kb、3 Kb、4 Kb、5 Kb以上、10 Kbを含めてそれ以内に位置することができる。エンハンサーは、遺伝子の5'もしくは3'に配置されている場合、あるいはエクソンもしくはイントロンの中またはその一部に配置されている場合に、遺伝子発現に影響を与えることが知られている。また、エンハンサーは、遺伝子から顕著な距離、たとえば、約3 Kb、5 Kb、7 Kb、10 Kb、15 Kb以上の距離でも機能することができる。

50

【0142】

また、調節領域には、プロモーター領域に加えて、翻訳を促進する配列、イントロンのスプライシングシグナル、mRNAのフレーム内翻訳を可能にするための遺伝子の正しい読み枠の維持、ストップコドン、リーダー配列および融合パートナー配列、内部リボソーム結合部位（IRES）、多重遺伝子または多シストロン性メッセージを作製するための要素、目的遺伝子の転写物の正確なポリアデニル化をもたらすためのポリアデニル化シグナルならびにストップコドンが含まれ、任意選択で発現ベクター中に含まれていることができる。

【0143】

本明細書中で使用する、本明細書中に表わす様々なアミノ酸配列中に出現する「アミノ酸」は、その周知の三文字または一文字の略記に従って同定される（表1参照）。様々なDNA断片中に出現するヌクレオチドは、当分野で日常的に使用される標準の一文字の名称を用いて指定する。

10

【0144】

本明細書中で使用する「アミノ酸残基」とは、ペプチド結合におけるポリペプチドの化学的消化（加水分解）の際に形成されるアミノ酸をいう。本明細書中に記載のアミノ酸残基は一般に「L」異性体である。「D」異性体中の残基で任意のL-アミノ酸残基を置き換えることができるが、ただし、所望の機能特性がポリペプチドに保持されてなければならない。NH₂とは、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基をいう。COOHとは、ポリペプチドのカルボキシル末端に存在する遊離カルボキシ基をいう。J. Biol. Chem.、243:3552~59（1969）に記載されており、37 C. F. R. §§ 1.821~1.822で採用された標準のポリペプチド命名法を順守して、アミノ酸残基の略記を表1に示す。

20

【0145】

【表 1】

表1－対応表

記号		
一文字	三文字	アミノ酸
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	スレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リシン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
Z	Glx	Gluおよび/又はGln
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
B	Asx	Asnおよび/又はAsp
C	Cys	システイン
X	Xaa	未知又はその他

10

20

30

【0146】

式によって本明細書中に表すアミノ酸残基すべての配列は、アミノ末端からカルボキシル末端への習慣的な方向で、左から右への方向である。さらに、語句「アミノ酸残基」は、対応表に記載のアミノ酸の修飾されたアミノ酸、非天然アミノ酸および異例のアミノ酸が含まれるように定義されている。さらに、アミノ酸残基の配列の始めまたは終わりのダッシュ記号は、1つもしくは複数のアミノ酸残基のさらなる配列、あるいはNH₂などのアミノ末端基またはCOOHなどのカルボキシル末端基へのペプチド結合を示すことに留意されたい。

【0147】

ペプチドまたはタンパク質では、アミノ酸の適切な保存的置換は当業者に知られており、一般に、その結果生じる分子の生物活性を変更せずに行うことができる。当業者は、一般に、ポリペプチドの非必須領域中の単一のアミノ酸置換によっては生物活性が実質的に変更されないことを理解されよう（たとえばWatson他、Molecular Biology of the Gene（遺伝子の分子生物学）、第4版、1987、The Benjamin/Cummings Pub. co.、ページ224参照）。

40

【0148】

このような置換は、以下の表2に記載のものに従って行い得る。

【0149】

【表 2】

表2

元の残基	同類置換
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

10

20

【0150】

他の置換も許容され、他の知られている保存的または非保存的置換に従って決定することができる。

30

【0151】

本明細書中で使用するペプチド模倣体とは、特定のペプチドの生物活性のある型のコンホメーションおよび特定の立体化学的な特徴を模倣する化合物である。一般に、ペプチド模倣体は、化合物の特定の望ましい特性を模倣するが、生物活性のあるコンホメーションの損失および結合の崩壊をもたらす柔軟性などの望ましくない特性は模倣しないように設計されている。ペプチド模倣体は、望ましくない特性に寄与する特定の基または結合をバイオイソスターで置き換えることによって、生物活性のある化合物から調製することができる。バイオイソスターは当業者に知られている。たとえば、メチレンバイオイソスター CH_2S はエンケファリン類似体においてアミドの置換えとして用いられている（たとえば Spatola (1983) ページ 267~357、Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins (アミノ酸、ペプチド、およびタンパク質の化学および生化学)、Weinstein 編、第7巻、Marcel Dekker、New York 参照)。経口投与することができるモルヒネは、ペプチドエンドルフィンのペプチド模倣体化合物である。本明細書中の目的では、ポリペプチドの主鎖を形成する1つまたは複数のペプチド結合がバイオイソスターで置き換えられているポリペプチドはペプチド模倣体である。

40

【0152】

本明細書中で使用する2つのタンパク質または核酸間の「類似度」とは、タンパク質の amino 酸配列間または核酸のヌクレオチド配列間の関連性をいう。類似度は、残基の配列

50

およびそれに含まれている残基の同一性ならびに／または相同性の度合に基づくことができる。タンパク質間または核酸間の類似度の度合の評価方法は当業者に知られている。たとえば、配列の類似度の評価方法の1つでは、2つのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を、配列間で最大レベルの同一性をもたらす様式でアラインメントを行う。「同一性」とは、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列が不変である程度をいう。アミノ酸配列のアラインメント、ならびにある程度はヌクレオチド配列のアラインメントには、保存的差異および／またはアミノ酸（もしくはヌクレオチド）の頻繁な置換も考慮することができる。保存的差異とは、関与する残基の物理化学的特性が保たれるものである。アラインメントは、全体的（配列の全長にわたり、すべての残基を含む配列を比較したアラインメント）または局所的（最も類似した領域もしくは複数の領域のみを含む配列の一部分のアラインメント）であることができる。 10

【0153】

「同一性」とは、それ自体で当分野において理解される意味をもち、公開されている技術を用いて計算することができる。（たとえば、Computational Molecular Biology（コンピュータ分子生物学）Lesk, A. M. 編、Oxford University Press、New York、1988；Biocomputing：Informatics and Genome Projects（バイオコンピューティング：情報科学およびゲノムプロジェクト）、Smith, D. W. 編、Academic Press、New York、1993；Computer Analysis of Sequence Data, Part I（配列データのコンピュータ解析、パート1）、Griffin, A. M. およびGriffin, H. G. 編、Humana Press、New Jersey、1994；Sequence Analysis in Molecular Biology（分子生物学における配列解析）、von Heinje, G.、Academic Press、1987；ならびにSequence Analysis Primer（配列解析プライマー）、Gribnikov, M. およびDevereux, J. 編、M Stockton Press、New York、1991参照）。2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド間の同一性を測定するいくつかの方法が存在するが、用語「同一性」は当業者には周知である（Carillo, H. & Lipton, D.、SIAM J Applied Math、48：1073（1988））。 20 30

【0154】

本明細書中で使用する、別のポリペプチドと比較して、ポリペプチドの完全長に沿って比較した配列同一性とは、その完全長に沿った、ポリペプチド中のアミノ酸の同一性の割合をいう。たとえば、ポリペプチドAが100個のアミノ酸を有し、ポリペプチドBがポリペプチドAのアミノ酸1～95と同一である95個のアミノ酸を有する場合は、ポリペプチドBの完全長に比べてポリペプチドAの完全長に沿って配列同一性を比較した場合にポリペプチドBは95%の同一性を有する。下に記載しており、かつ当業者に知られているように、同一性を評価する様々なプログラムおよび方法が当業者に知られている。90%または95%の同一性などの高レベルの同一性は、ソフトウェアを用いずに容易に決定することができる。 40

【0155】

本明細書中で使用する（核酸配列および／またはアミノ酸配列に関して）相同的とは、約25%以上の配列相同性、典型的には25%、40%、60%、70%、80%、85%、90%または95%以上の配列相同性を意味し、必要な場合は正確な割合を指定することができる。本明細書中の目的では、用語「相同性」および「同一性」は、別段に指定しない限りは多くの場合互換性があるように用いられる。一般に、相同性または同一性の割合を決定するために、最も高い桁数の一致が得られるように配列のアラインメントを行う（たとえば、Computational Molecular Biology（コンピュータ分子生物学）Lesk, A. M. 編、Oxford University Press、New York、1988；Biocomputing：Informa 50

t i c s a n d G e n o m e P r o j e c t s (バイオコンピューティング：情報科学およびゲノムプロジェクト)、Smith, D. W. 編、Academic Press、New York、1993；Computer Analysis of Sequence Data, Part I (配列データのコンピュータ解析、パート1)、Griffin, A. M. およびGriffin, H. G. 編、Humana Press、New Jersey、1994；Sequence Analysis in Molecular Biology (分子生物学における配列解析)、von Hein je, G.、Academic Press、1987；ならびにSequence Analysis Primer (配列解析プライマー)、Gribskov, M. およびDevereux, J. 編、M Stockton Press、New York、1991；Carillo他(1988)SIAM J Applied Math、48：1073参照)。配列相同性によって、標準のアラインメントアルゴリズムプログラムによって保存されたアミノ酸の数が決定され、これを、それぞれの供給者によって確立されている初期設定のギャップペナルティと共に用いることができる。実質的に相同的な核酸分子は、典型的には、目的核酸の全長に沿って中程度のストリンジェンシーまたは高いストリンジェンシーでハイブリダイズするであろう。また、ハイブリダイズする核酸分子においてコドンの代わりに縮重コドンを含む核酸分子も企図される。

【0156】

任意の2つの核酸分子が少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%「同一である」または「相同的である」ヌクレオチド配列を有するかどうかは、たとえばPearson他(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85：2444に記載の初期設定パラメータを用いた「FAST A」プログラムなどの知られているコンピュータアルゴリズムを用いて決定することができる(他のプログラムにはGCGプログラムパッケージ(Devereux, J. 他、Nucleic Acids Research、12(I)：387(1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul, S. F. 他、J Molec Biol、215：403(1990)；Guide to Huge Computers (大コンピュータへの手引き)Martin J. Bishop編、Academic Press、San Diego、1994、およびCarillo他(1988)SIAM J Applied Math、48：1073)が含まれる。たとえば、米国バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)データベースのBLAST機能を用いて同一性を決定することができる。他の市販されているまたは一般に利用可能なプログラムには、DNASTarの「MegAlign」プログラム(ウィスコンシン州Madison)およびウィスコンシン大学遺伝子コンピュータグループ(University of Wisconsin Genetics Computer Group、UWG)の「ギャップ」プログラム(ウィスコンシン州Madison)が含まれる)。タンパク質および／または核酸分子の相同性もしくは同一性の割合は、たとえば、ギャップコンピュータプログラムを用いて配列情報を比較することによって決定することができる(たとえばSmithおよびWaterman((1981)Adv. Appl. Math.、2：482))が改良したNeedleman他(1970)J. Mol. Biol.、48：443。手短に述べると、ギャッププログラムは、類似度を、類似しているアラインメントされた記号(すなわちヌクレオチドまたはアミノ酸)の数を、2つの配列のうちの短い方中の記号の合計数で割り算した数値として定義する。ギャッププログラムの初期設定パラメータには、(1)単項比較マトリクス(同一性には値1、非同一性には0)、およびSchwartzおよびDayhoff編、ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE (タンパク質配列および構造のアトラス)、National Biomedical Research Foundation、ページ353～358(1979)に記載のGribskov他(1986)Nucl. Acids Res.、14：6745の重みつき比較マトリク

ス；（２）それぞれのギャップに３．０のペナルティおよびそれぞれのギャップ中のそれぞれの記号にさらに０．１０のペナルティ；ならびに（３）末端のギャップにはペナルティなしが含まれていることができる。

【０１５７】

したがって、本明細書中で使用する用語「同一性」または「相同性」とは、試験および基準のポリペプチドまたはポリヌクレオチド間の比較を表す。本明細書中で使用する用語少なくとも「９０％同一である」とは、基準の核酸またはアミノ酸配列に対して９０～９９．９９の同一性の割合をいう。９０％以上のレベルの同一性は、例示目的で１００個のアミノ酸の長さの試験および基準のポリペプチドを比較したと仮定した場合、試験ポリペプチド中１０％（すなわち１００個のうち１０個）未満のアミノ酸しか基準ポリペプチドのアミノ酸と異ならないという事実の指標である。試験および基準のポリヌクレオチド間で類似の比較を行うことができる。このような差異は、アミノ酸配列の全長にわたるランダムな点突然変異として表れるか、または、これらは最大の許容であるたとえば１０／１００個のアミノ酸の差異（約９０％の同一性）までの様々な長さの１つもしくは複数の位置で集まっていることができる。差異は、核酸もしくはアミノ酸の置換、挿入または欠失として定義される。約８５～９０％を超える相同性または同一性レベルでは、その結果はプログラムおよびギャップパラメータのセットと独立しているべきであり、このような高レベルの同一性は、多くの場合ソフトウェアに依存しない手動のアラインメントによって容易に評価することができる。

【０１５８】

本明細書中で使用するアラインメントされた配列とは、ヌクレオチドまたはアミノ酸の配列中の対応する位置のアラインメントを行うための相同性（類似度および／または同一性）の使用をいう。典型的には、５０％以上の同一性で関連している２つ以上の配列はアラインメントされている。アラインメントされた配列のセットとは、対応する位置でアラインメントされた２つ以上の配列をいい、ＥＳＴなどのＲＮＡ由来のアラインメントされた配列およびゲノムＤＮＡ配列とアラインメントされた他のｃＤＮＡが含まれていることができる。

【０１５９】

本明細書中で使用する「プライマー」とは、適切な条件下（たとえば４種の異なるヌクレオシド三リン酸およびＤＮＡポリメラーゼ、ＲＮＡポリメラーゼまたは逆転写酵素などの重合化剤の存在下）で、適切な緩衝液中かつ適切な温度において、鋳型に指揮されるＤＮＡ合成開始点として作用することができる核酸分子をいう。特定の核酸分子が「プローブ」および「プライマー」として役割を果たすことができることは理解されよう。しかし、プライマーは伸長用の３′ヒドロキシル基を有する。プライマーは、たとえば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、逆転写酵素（ＲＴ）－ＰＣＲ、ＲＮＡ ＰＣＲ、ＬＣＲ、多重ＰＣＲ、パンハンドル（panhandle）ＰＣＲ、捕捉ＰＣＲ、発現ＰＣＲ、３′および５′ＲＡＣＥ、in situ ＰＣＲ、ライゲーション媒介ＰＣＲおよび他の増幅プロトコルを含めた様々な方法において用いることができる。

【０１６０】

本明細書中で使用する「プライマー対」とは、（たとえばＰＣＲによって）増幅する配列の５′末端とハイブリダイズする５′（上流）プライマーおよび増幅する配列の３′末端の相補体とハイブリダイズする３′（下流）プライマーを含むプライマーの組をいう。

【０１６１】

本明細書中で使用する「特異的にハイブリダイズする」とは、核酸分子（たとえばオリゴヌクレオチド）の標的核酸分子への、相補的な塩基対合によるアニーリングをいう。当業者は、特異的ハイブリダイゼーションに影響を与える、特定分子の長さおよび組成などのin vitroならびにin vivoのパラメータに精通している。特にin vitroハイブリダイゼーションに関連するパラメータには、アニーリングおよび洗浄温度、緩衝液の組成ならびに塩濃度がさらに含まれる。高ストリンジェンシーにおいて非特異的に結合した核酸分子を除去する例示的な洗浄条件は０．１×ＳＳＰＥ、０．１％のＳ

10

20

30

40

50

D S、65℃であり、中程度のストリンジェンシーでは0.2×SSPE、0.1%のSDS、50℃である。匹敵するストリンジェンシー条件が当分野で知られている。当業者は、特定の用途に適切な、核酸分子と標的核酸分子との特異的ハイブリダイゼーションを成すために、これらのパラメータを容易に調節することができるであろう。

【0162】

本明細書中で使用する有効量とは、疾患または障害の症状の予防、治癒、寛解、抑制もしくは部分的抑制に必要な治療剤の量である。

【0163】

本明細書中で使用する単位用量とは、ヒトおよび動物対象に適した、当分野で知られているように個別にパッケージングされた、物理的に分離された単位をいう。

10

【0164】

B. 細胞表面受容体(CSR)アイソフォーム

本明細書では、細胞表面受容体(CSR)アイソフォーム、CSRアイソフォームのファミリー、およびCSRアイソフォームの調製方法を提供する。CSRアイソフォームは、挿入および／または欠失が存在し、その結果生じるCSRアイソフォームが同族受容体と比較して1つもしくは複数の活性または機能において差異を示すという点で、同族受容体とは異なる。このような変化には、キナーゼ活性の排除などの生物活性の変化、および／または膜貫通ドメインの全体もしくは一部の排除が含まれる。本明細書中に提供するCSRアイソフォームは、細胞表面受容体の活性を変調するために用いることができる。これらはまた、薬物もしくは毒素または核酸などの分子を、標的細胞または組織へ送達するための標的化剤としても用いることができる。

20

【0165】

CSRアイソフォームは、受容体の野生型および／または優性型と比較して、新しいドメインを含んでいるおよび／または新しいもしくは異なる生物学的機能を含んでいることができる。たとえば、イントロンにコードされたアミノ酸は、新しいドメインまたはその一部分をアイソフォーム内に導入することができる。変更することができる生物活性には、それだけには限定されないが、二量体化、多量体化および複合体形成などのタンパク質-タンパク質相互作用、リガンドに対する特異性および／または親和性、細胞の局在化および再局在化、膜への固定、キナーゼ活性などの酵素活性、調節タンパク質、補因子、ならびにシグナル伝達経路におけるものなどの他のシグナル伝達分子を含めた調節分子に対する応答が含まれる。

30

【0166】

一般に、生物活性は、受容体の野生型および／または優性型と比較して、アイソフォームにおいて少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、または10倍変更されている。典型的には、生物活性は、10、20、50、100または1000倍以上変更されている。たとえば、アイソフォームは生物活性が低下していることができる。

【0167】

また、CSRアイソフォームは受容体の野生型および／または優性型の活性を変調することもできる。たとえば、CSRアイソフォームは、CSRアイソフォームと直接または間接的に相互作用して受容体の生物活性を変調することができる。変更することができる生物活性には、それだけには限定されないが、二量体化、多量体化および複合体形成などのタンパク質-タンパク質相互作用、リガンドに対する特異性および／または親和性、細胞の局在化および再局在化、膜への固定、キナーゼ活性などの酵素活性、調節タンパク質、補因子、ならびにシグナル伝達経路におけるものなどの他のシグナル伝達分子を含めた調節分子に対する応答が含まれる。

40

【0168】

CSRアイソフォームは、細胞表面受容体と直接または間接的に相互作用して、細胞表面受容体の生物活性を変調することなどによって生物学的効果を引き起こすまたはそれに関与することができる。また、CSRアイソフォームは、細胞表面受容体とは独立して相互作用して、シグナル伝達経路を開始または阻害することなどによって生物学的効果を引

50

き起こすこともできる。たとえば、CSRアイソフォームは、シグナル伝達経路を開始し、細胞成長を亢進または促進することができる。別の例では、CSRアイソフォームは、たとえば細胞成長を妨害または阻害することができるシグナル伝達経路を阻害することによって、生物学的効果を引き起こすリガンドとして細胞表面受容体と相互作用することができる。したがって、本明細書中に提供するアイソフォームは、同族リガンドが受容体の活性と相互作用してそれを変更する様式と同じ様式で標的受容体と相互作用するという点で、細胞表面受容体リガンドとして機能することができる。アイソフォームは、必ずしも必要ではないが、リガンドとしてリガンド結合部位と結合して、受容体の二量体化を遮断する役割を果たすことができる。これらは、受容体と相互作用するという点でリガンドとして作用することができる。また、CSRアイソフォームは、受容体に対するリガンドに結合することによって、および／または二量体化などの受容体活性を防止することによっても作用することができる。

10

【0169】

たとえば、CSRアイソフォームは、リガンド結合に対してCSRと競合することができる。CSRアイソフォームは、受容体と結合した場合に、受容体機能の阻害をもたらす負のエフェクターリガンドとなることができる。また、一部のCSRアイソフォームが同族受容体に結合し、受容体の活性化をもたらされる可能性もある。CSRアイソフォームは、たとえばCSRアイソフォームと複合体形成し、CSRが他のCSRと多量体化する（たとえば二量体化または三量体化する）能力を変更することによって、CSRの競合的阻害剤として作用することができる。CSRアイソフォームは、シグナル伝達経路中の他のポリペプチドおよび補因子との相互作用に対してCSRと競合することができる。本明細書中に提供する細胞表面アイソフォームおよびアイソフォームファミリーには、それだけには限定されないが、受容体チロシンキナーゼのアイソフォーム（本明細書中ではRTKアイソフォームとも呼ぶ）ならびにTNFおよび他のGタンパク質共役型受容体などの他のCSRファミリーのアイソフォームが含まれる。一例では、CSRアイソフォームは可溶性ポリペプチドである。たとえば、CSRアイソフォームは膜貫通ドメインの少なくとも一部または全体を欠いている。可溶性アイソフォームは受容体の野生型または優性型の生物活性を変調することができる（たとえば、Kendall他（1993）PNAS、90:10705、Werner他（1992）Molec. Cell Biol.、12:82、Heaney他（1995）PNAS、92:2365、Fukunaga他（1990）PNAS、87:8702、Wypych他（1995）Blood、85:66~73、Barron他（1994）Gene、147:263、Cheng他（1994）Science、263:1759、Dastot他（1996）PNAS、93:10723、Abramovich他（1994）FEBS Lett.、338:295、Diamant他（1997）FEBS Lett.、412:379、Ku他（1996）Blood、88:4124、Heaney MLおよびGolde DW（1998）、J Leukocyte Biol.、64:135~146参照）。

20

30

【0170】

細胞表面受容体アイソフォームは、細胞、組織および生物中で発現されたアイソフォームの単離を含めた当分野で知られている任意の方法によって、組換え方法、ならびにin silicoステップを含む方法、合成方法および当業者に知られている任意の方法によって、産生することができる。受容体チロシンキナーゼのアイソフォームを含めた細胞表面受容体のアイソフォームは、受容体チロシンキナーゼの遺伝子から転写された、選択的スプライシングされたRNA分子によってコードされていることができる。このようなアイソフォームには、エクソン欠失、エクソン伸長、エクソン切断およびイントロン保持された、選択的スプライシングされたRNAが含まれる。CSRアイソフォームには、イントロン（または選択的エクソン）によってコードされている配列を含む受容体アイソフォームが含まれ、これはイントロン分裂タンパク質とも呼ばれる。

40

【0171】

1つまたは複数の異なるCSRアイソフォームを含む薬剤組成物を提供する。また、ア

50

イソフォームをコードしているベクターを投与することなどの、薬剤組成物を投与するまたはCSRアイソフォームを送達することによる、疾患および状態の治療方法も提供する。投与は*in vivo*または*ex vivo*で成すことができる。

【0172】

CSRアイソフォームおよびCSRアイソフォームをコードしている核酸分子を同定および産生する方法を本明細書中に提供する。また、CSRアイソフォームを発現、単離および配合する方法も提供する。

【0173】

CSRアイソフォームのクラス

記載のように、CSRアイソフォームとは、ドメインあるいは受容体の同族の結合していない形態と比較して、生物活性を除去もしくは低下させるまたはそれに正もしくは負の効果を有することを含めた他の方法で変更するために十分なドメインの一部分を欠いているポリペプチドである。また、一部のCSRアイソフォームは、ドメインの獲得もしくは損失の結果、またはさらには単一のアミノ酸置換の結果、完全に新規な機能も有する。CSRアイソフォームは遺伝子のスプライシング変異体（または組換えの短縮された変異体）を表し、選択的スプライシングによって、または組換えもしくは合成方法によって作製することができる。CSRアイソフォームは、選択的スプライシングされたRNAによってコードされていることができる。また、CSRアイソフォームは、組換え方法によって、ならびに*in silico*および合成の方法を用いることによって作製することができる。

【0174】

典型的には、選択的スプライシングされたRNAから産生したCSRアイソフォームは、遺伝子によってコードされているポリペプチドの優性型ではない。場合によっては、CSRアイソフォームは、組織特異的もしくは発生段階特異的のポリペプチドであるか、または疾患特異的であることができる（すなわち、組織間または段階間で異なるレベルで発現される、あるいは健常状態と比較して病状において異なるレベルで発現される、あるいはその組織中でのみ、疾患のプロセスもしくは進行の段階またはその間にのみ発現されることことができる）。CSRアイソフォームをコードしていること、選択的スプライシングされたRNAの形態には、それだけには限定されないが、エクソン欠失、エクソン保持、エクソン伸長、エクソン切断、およびイントロン保持された、選択的スプライシングされたRNAが含まれる。CSRアイソフォームには、とりわけイントロン融合タンパク質が含まれる。

【0175】

(a) CSRアイソフォームの選択的スプライシングおよび作製

真核生物中の遺伝子には、RNAポリメラーゼによって、一般にpre-mRNAと呼ばれるRNA産物へと転写されるイントロンおよびエクソンが含まれる。Pre-mRNAとは、典型的には、RNAスプライシングおよびプロセッシングによりさらにプロセッシングされて最終的なメッセンジャーRNA (mRNA) を生じる、中間産物である。典型的には、最終的なmRNAはエクソン配列を含み、イントロンをスプライシングして除去することによって得られる。イントロンとエクソンとの境界は、スプライス接合点、すなわち、細胞のスプライシング機構にシグナルとして用いられるヌクレオチドの配列およびイントロンを除去してエクソン配列を結合するための基質によって印されている。エクソンが動作可能に連結されて、成熟RNA分子を形成する。典型的には、mRNA中の1つまたは複数のエクソンが、ポリペプチドをコードしているオープンリーディングフレームを含む。多くの場合、オープンリーディングフレームは、2つ以上のエクソンを動作可能に連結させることによって作製することができ、たとえば、コード配列はエクソン接合点にまたがることができ、オープンリーディングフレームは接合点にわたって維持される。

【0176】

RNAはまた、選択的スプライシングを受けて、単一の遺伝子から様々な異なるmRNA

A 転写物を産生することもできる。選択的スプライシングされた mRNA は、異なる数および／または配置のエクソンを含んでいることができる。たとえば、10 個のエクソンを有する遺伝子により様々な選択的スプライシングされた mRNA を作製することができる。一部の mRNA は 10 個のエクソンすべてを含んでいることができ、一部は 9、8、7、6、5 個などのみを含んでいることができる。さらに、たとえば 10 個のうち 9 個のエクソンの産物が、それぞれが異なるエクソンを欠いている様々な mRNA のうちの 1 つであることができる。選択的スプライシングされた mRNA は、典型的には、優性または野生型をコードしている RNA 中に存在しない追加のエクソンを含んでいることができる。エクソンの付加および欠失には、5' エクソン、3' エクソンおよび RNA 内部のエクソンのそれぞれ付加および欠失が含まれる。また、選択的スプライシングされた RNA 分子には、RNA に動作可能に連結したまたはその内部への、イントロンもしくはイントロンの一部分の付加も含まれる。たとえば、通常は野生型または優性型をコードしている RNA 中でのスプライシングによって除去されるイントロンが、選択的スプライシングされた RNA 中に存在することができる。イントロンまたはイントロン部分が、RNA 内の 2 つのエクソンの間などで動作可能に連結されていることができる。イントロンまたはイントロン部分は、転写物の 3' 末端などの RNA の一端で動作可能に連結されていることができる。一部の例では、RNA 内にイントロン配列が存在することにより、イントロン内のポリアデニル化配列に基づいた転写が終結される。

【0177】

選択的 RNA スプライシングのパターンは、細胞および組織の型に応じて変化する可能性がある。また、選択的 RNA スプライシングは、生物、細胞の型または組織の型の発生段階によっても調節されることができる。たとえば、RNA スプライシング酵素および RNA スプライシングを調節するポリペプチドは、特定の細胞および組織の型中ならびに特定の発生段階において、様々な濃度で存在することができる。場合によっては、特定の酵素または調節ポリペプチドは、特定の細胞もしくは組織の型中または特定の発生段階において存在しない場合がある。このような差異は、細胞もしくは組織の型または段階において様々な RNA スプライシングパターンを生じることができ、これにより、様々な mRNA 集団が生じる。このような複雑さにより、特定の細胞種または発生段階において適切ないくつかのタンパク質産物が生じることができる。

【0178】

選択的スプライシングされた mRNA により、様々な異なるポリペプチドを作製することができ、本明細書中ではアイソフォームとも呼ぶ。このようなアイソフォームには、欠失、付加および短縮を有するポリペプチドを含めることができる。たとえば、通常はエクソンによってコードされているオープンリーディングフレームの一部分を選択的スプライシングされた mRNA において除去することができ、その結果より短いポリペプチドが生じる。アイソフォームは、アミノ酸が N 末端もしくは C 末端から除去されていることができ、または欠失は内部的であることができる。アイソフォームは、エクソンを欠失させた結果ドメインまたはドメインの一部分を欠いていることができる。また、選択的スプライシングされた mRNA により、追加の配列を有するポリペプチドも作製することができる。たとえば、エクソン中にストップコドンを含むことができ、このエクソンが mRNA 中に含まれていない場合は、ストップコドンが存在せず、オープンリーディングフレームは下流のエクソンに含まれる配列へと続く。このような例では、追加のオープンリーディングフレーム配列によりポリペプチドに追加のアミノ酸配列が付加され、これには新しいドメインまたはその一部分の付加が含まれる。

【0179】

(b) イントロン融合タンパク質

アイソフォームクラスの 1 つは、イントロン融合タンパク質である。イントロン融合タンパク質とは、ドメインまたは受容体の生物活性を除去もしくは低下させるために十分なドメインの一部分を欠いている、アイソフォームである。さらに、イントロン融合タンパク質は、エクソンによってコードされておらず、エクソンにコードされたアミノ酸に動作

可能に連結しており、および／またはC S R遺伝子によってコードされている野生型もしくは優性型と比較して短縮されている、1つあるいは複数のアミノ酸を含む。典型的には、イントロン融合タンパク質は、C S Rポリペプチドの野生型もしくは優性型をコードしているR N Aの対応する配列中には存在しないイントロン融合タンパク質をコードしているR N A中に、1つまたは複数のストップコドンが存在することによって、短縮されている。アミノ酸および／またはストップコドンの付加の結果、ポリペプチドの野生型または優性型とは大きさおよび配列が異なるイントロン融合タンパク質を生じさせることができる。

【0180】

イントロン融合タンパク質は、1つまたは複数の生物活性が改変されている。たとえば、イントロン融合タンパク質におけるアミノ酸の付加により、ポリペプチドの野生型または優性型と比較して生物活性が追加、拡張または改変されることができる。たとえば、イントロンにコードされたアミノ酸配列とタンパク質との融合の結果、新しい機能を有するドメインの付加をもたらすことができる。また、イントロンにコードされたアミノ酸配列とタンパク質との融合は、生物活性を阻害することによって、たとえば二量体化の阻害もしくはキナーゼ活性の阻害などによって、タンパク質の既存の生物活性を変調することもできる。

【0181】

イントロン融合タンパク質には、天然およびコンビナトリアルのイントロン融合タンパク質が含まれる。天然のイントロン融合タンパク質は、遺伝子の1つまたは複数のエクソンに動作可能に連結した1つまたは複数のイントロンもしくはその一部分を含む、選択的スプライシングされたR N Aによってコードされている。天然のイントロン融合タンパク質は、イントロン配列によってコードされている1つもしくは複数のアミノ酸を含むか、および／あるいは1つもしくは複数のエクソンに動作可能に連結したイントロン配列によってコードされている1つまたは複数のストップコドンの結果短縮されたイントロン融合タンパク質である。コンビナトリアルイントロン融合タンパク質とは、ポリペプチドの野生型または優性型と比較して短縮されているポリペプチドである。典型的には、短縮によりポリペプチドから1つまたは複数のドメインもしくはその一部分が除去される。コンビナトリアルイントロン融合タンパク質は、多くの場合、同じ遺伝子配列由来あるいは関連遺伝子ファミリー中の遺伝子配列由来の天然のイントロン融合タンパク質と同様に1つまたは複数のドメインもしくはその一部分が欠失しているという点で、天然のイントロン融合タンパク質を模倣する。

【0182】

i. 天然のイントロン融合タンパク質

天然のイントロン融合タンパク質は、イントロン配列ならびにイントロン保持R N A分子および一部のエクソン伸長R N Aなどのエクソン配列をm R N A内に組み込んだm R N Aを含めた、選択的スプライシングされたm R N Aのクラスから作製する。これには、細胞もしくは組織中に発生してそれから単離することができる変異体、データベース中で同定された変異体、または遺伝子の配列および構造に基づいて合成した変異体のすべてが含まれる。可能かつイントロン由来の1つまたは複数のコドン（ストップコドンのみも含まれる）を含むすべてのスプライシング変異体が天然のイントロン融合タンパク質と見なされる。

【0183】

組み込まれたイントロン配列は、1つまたは複数のイントロンもしくはその一部分を含む。このようなm R N Aは、イントロン保持の機構によって生じることができる。たとえば、スプライシング機構によって1つまたは複数のイントロンが除去される前に、p r e - m R N Aが細胞の核から細胞質へと搬出される。場合によっては、スプライス部位は、たとえば細胞タンパク質によって能動的に遮断されて、1つまたは複数のイントロンのスプライシングを防止することができる。

【0184】

1つまたは複数のイントロンもしくはその一部分の保持も、本明細書中で天然のイントロン融合タンパク質と呼ぶアイソフォームの作製をもたらすことができる。たとえば、イントロン配列は、RNAスプライシングによってエクソン配列に動作可能に連結しているオープンリーディングフレームを含むことができる。イントロンにコードされた配列により、ポリペプチドに、たとえばポリペプチドのN末端もしくはC末端のどちらかまたはポリペプチドの内部に、アミノ酸を付加することができる。一部の例では、イントロン配列は1つまたは複数のストップコドンも含んでいることができる。1つまたは複数のエクソン中のオープンリーディングフレームに動作可能に連結した、イントロンにコードされたストップコドンは、コードされたポリペプチドを終結させることができる。したがって、ストップコドンの結果短縮されているアイソフォームを産生することができる。一部の例では、mRNA中に保持されているイントロンは、オープンリーディングフレームに1つまたは複数のアミノ酸およびストップコドンの付加をもたらすことができ、これにより、イントロンにコードされた配列で終結されるアイソフォームが産生される。

10

【0185】

本明細書では、イントロンによってコードされているドメインまたはドメイン部分を付加したイントロン融合タンパク質、および1つまたは複数のドメインもしくはドメインの部分が欠失しているイントロン融合タンパク質を含めた、イントロン保持によって作製することができる天然のイントロン融合タンパク質を提供する。たとえば、イントロン配列が、典型的には遺伝子のmRNA中にあるエクソン配列の代わりに動作可能に連結していることができる。したがって、エクソンによってコードされているメインもしくはその一部分が欠失しており、イントロンにコードされたアミノ酸がコードされたポリペプチドに含まれる。

20

【0186】

別の例では、典型的に存在するmRNA中のエクソンに加えて、イントロン配列が動作可能に連結している。一例では、動作可能に連結したイントロン配列により、ストップコドンをフレーム内で、ポリペプチドをコードしているエクソン配列と共に導入することができる。別の例では、動作可能に連結したイントロン配列により、1つまたは複数のアミノ酸をポリペプチド内に導入することができる。一部の実施形態では、フレーム内ストップコドンもポリペプチドをコードしているエクソン配列に動作可能に連結しており、これにより、イントロンにコードされたアミノ酸をC末端に有する、ポリペプチドをコードしているmRNAが作製される。

30

【0187】

天然のイントロン融合タンパク質の一例では、イントロン配列によってコードされている1つまたは複数のアミノ酸がポリペプチドのC末端に動作可能に連結している。たとえば、イントロン融合タンパク質は、RNAの5'末端に1つまたは複数のエクソン配列を含み、次いでRNAの3'末端に1つまたは複数のイントロン配列もしくはイントロンの一部分配列が保たれている核酸配列から作製される。このような核酸から産生したイントロン融合タンパク質は、エクソンにコードされたアミノ酸をN末端に含み、イントロン配列によってコードされている1つまたは複数のアミノ酸をC末端に含む。別の例では、イントロン融合タンパク質は、イントロン配列中にコードされているストップコドンを1つまたは複数のエクソン配列に動作可能に連結させて、短縮ポリペプチドをコードしている核酸配列を作製することによって、核酸から作製する。

40

【0188】

i i. コンビナトリアルイントロン融合タンパク質

イントロン融合タンパク質は、ポリペプチドの野生型もしくは優性型と比較して修飾されているポリペプチドを産生するための組換え方法ならびに／またはin silicoおよび合成方法によっても作製することができる。典型的には、コンビナトリアルイントロン融合タンパク質は、野生型または優性型と比較して短縮されたポリペプチドである。短縮により、1つまたは複数のドメインもしくはその一部分を除去することができる。

【0189】

50

コンビナトリアルイントロン融合タンパク質は、同じ遺伝子配列由来もしくは関連遺伝子ファミリー中の遺伝子配列由来の天然のイントロン融合タンパク質中で欠失している1つあるいは複数のドメインまたはその一部分が欠失しているという点で、いわゆる天然のイントロン融合タンパク質を模倣している。たとえば、本明細書中でさらに説明するように、遺伝子ファミリーメンバーの配列アラインメントを行うことによって、イントロンおよびエクソン、構造およびコードされたタンパク質ドメインを核酸中で同定することができる。1つまたは複数のエクソンおよびイントロンまたはその一部分を含む、ポリペプチドをコードしている組換え核酸分子を合成することができる。このような組換え分子は、イントロンによってコードされており、エクソンに動作可能に連結しており、イントロン融合タンパク質を産生する、1つもしくは複数のアミノ酸および／またはストップコドンを含んでいることができる。また、コンビナトリアルイントロン融合タンパク質を含む組換えポリペプチドも産生することができる。この方法の一部として、モチーフ走査を用いて潜在的な免疫原性エピトープを認識し、保存的アミノ酸置換またはペグ化などの当分野で周知の他の修飾によって修飾することができる。一般に、最適化された薬物動態学を達成するまたは免疫原性回避するために、任意の治療的イントロン融合タンパク質を同様に修飾することができる。

【0190】

(c) イントロンにコードされたアイソフォーム

別のCSRアイソフォームは、イントロンにコードされたアイソフォームである。イントロンにコードされたアイソフォームは、天然のイントロン融合タンパク質などの、アイソフォーム由来のイントロン配列またはその一部分を含む。イントロンにコードされたアイソフォームは、イントロンにコードされたアイソフォームと同じ遺伝子から産生したポリペプチドの野生型または優性型と相互作用することができる。イントロンにコードされたアイソフォームは、イントロンにコードされたアイソフォームと同じ遺伝子から産生したポリペプチドの野生型または優性型と相互作用する、シグナル伝達経路内の分子と相互作用することができる。イントロンにコードされたアイソフォームは、エクソンにコードされた配列との融合として発現または産生させることができる。イントロンにコードされたアイソフォームは、開始メチオニンなどの異種配列との融合として発現または産生させることができる。ストップコドンは、イントロンにコードされたアイソフォームがイントロン配列の内部またはその末端で終結されるように、コードしている核酸分子中で操作されていることができる。

【0191】

(d) エクソンの修飾によって作製したアイソフォーム

CSRアイソフォームは、CSRポリペプチドの野生型または優性型をコードしているRNAの対応するエクソンに対してエクソンの修飾を行うことによって作製することができる。エクソンの修飾には、エクソン切断、エクソン伸長、エクソン欠失およびエクソン挿入などの選択的スプライシングされたRNAの形態が含まれる。このような選択的スプライシングされたRNA分子は、追加のアミノ酸を含むことによって、および／またはCSRポリペプチドの野生型もしくは優性型中に存在するアミノ酸配列を欠いていることによって、CSRポリペプチドの野生型あるいは優性型とは異なるCSRアイソフォームをコードしていることができる。

【0192】

エクソン挿入とは、典型的にはポリペプチドの野生型または優性型をコードしているRNA中に存在しない少なくとも1つのエクソンを含む、選択的スプライシングされたRNA分子である。挿入されたエクソンは、挿入されたエクソンによってコードされている追加のアミノ酸を、RNA中に存在する他のエクソンに動作可能に連結させることができる。また、挿入されたエクソンは、ストップコドンの結果RNAにコードされたポリペプチドの終結がもたらされるように、1つまたは複数のストップコドンを含んでいることもできる。このようなストップコドンを含むエクソンを、ポリペプチドの野生型または優性型のポリペプチド終結に用いられるストップコドンを含むエクソンの上流に挿入した場合に

、短縮ポリペプチドを産生することができる。

【0193】

挿入されたエクソンは、エクソンが挿入された場合に、RNAが、挿入されたエクソンによってコードされている追加のアミノ酸を有するポリペプチドの野生型または優性型のアミノ酸配列を含むアイソフォームをコードしているように、オープンリーディングフレームを維持していることができる。挿入されるエクソンは、挿入されるエクソンによってコードされている追加のアミノ酸がアイソフォームのN末端、C末端または内部に連結されているように、それぞれ5'、3'またはRNA内部に挿入することができる。また、挿入されたエクソンは、ポリペプチドの野生型または優性型中のアミノ酸の配列の一部分のみを含むアイソフォームが産生されるように、それを挿入するRNAの読み枠を変化させることもできる。このようなアイソフォームは、挿入されたエクソンによってコードされているアミノ酸配列をさらに含んでいることができ、また、挿入されたエクソン中に含まれるストップコドンの結果は終結されることもできる。

10

【0194】

CSRアイソフォームは、エクソン欠失現象からも産生することができる。エクソン欠失とは、ポリペプチドの野生型または優性型をコードしているRNAと比較して少なくとも1つのエクソンを欠いている核酸分子が産生される、選択的RNAスプライシングの現象をいう。エクソンの欠失により、たとえばアミノ酸をコードしている配列を除去することによって、およびポリペプチドをコードしているRNAの読み枠を変えることによって、代替の大きさのポリペプチドを産生することができる。エクソン欠失によりコードされたポリペプチドから1つまたは複数のアミノ酸を除去することができ、そのようなアミノ酸は、RNA配列中におけるエクソンの位置に応じてポリペプチドのN末端、C末端またはその内部であることができる。また、RNA中におけるエクソンの欠失は、ポリペプチドの野生型または優性型中に存在しない1つもしくは複数のアミノ酸を含むアイソフォームが産生されるように、読み枠にシフトを生じさせることもできる。また、読み枠中のシフトは読み枠中にストップコドンをもたらす場合もあり、これにより、ポリペプチドの野生型または優性型とは異なる配列で終結されるアイソフォームが産生される。一例では、読み枠のシフトにより、ポリペプチドの野生型または優性型と比較して短縮されているアイソフォームが産生される。また、このような短縮アイソフォームは、ポリペプチドの野生型または優性型中には存在しないアミノ酸の配列を含んでいることもできる。

20

30

【0195】

また、CSRアイソフォームは、RNA中におけるエクソン伸長によっても産生することができる。エクソン伸長とは、ポリペプチドの野生型または優性型をコードしているRNA中の対応するエクソンよりも長い少なくとも1つのエクソン（エクソン中に含まれるヌクレオチド数が多い）を含む核酸分子を産生させる、選択的RNAスプライシングの現象をいう。エクソン伸長に含まれる追加の配列は、追加のアミノ酸をコードしていることができる、および／またはポリペプチドを終結させるストップコドンを含んでいることができる。フレーム内にストップコドンを含むエクソン挿入は、エクソン伸長の配列中で終結する短縮アイソフォームを産生させることができる。また、エクソン挿入はRNAの読み枠をシフトさせることもでき、これにより、ポリペプチドの野生型または優性型中に存在しない1つもしくは複数のアミノ酸を含むアイソフォーム、および／またはポリペプチドの野生型または優性型とは異なる配列で終結するアイソフォームが生じる。エクソン伸長は、ポリペプチドの野生型または優性型をコードしているRNAのイントロン中に含まれる配列を含んでいることができ、したがってイントロン融合タンパク質を産生することができる。

40

【0196】

また、CSRアイソフォームは、エクソン切断によっても産生される。エクソン切断とは、1つもしくは複数のエクソンがポリペプチドの野生型または優性型をコードしているRNA中の対応するエクソンよりも短い（ヌクレオチド数が少ない）ように1つもしくは複数のエクソンの短縮を含む、RNA分子である。エクソン切断を有するRNA分子は、

50

ポリペプチドの野生型または優性型と比較して短縮されているポリペプチドを産生させることができる。また、エクソン切断は、ポリペプチドの野生型または優性型中に存在しない1つもしくは複数のアミノ酸を含むアイソフォームが産生されるように、読み枠中にシフトを生じさせることもできる。また、読み枠中のシフトは読み枠中にストップコドンを生じさせる場合もあり、ポリペプチドの野生型または優性型とは異なる配列で終結されるアイソフォームが産生される。

【0197】

エクソンの修飾を含めた選択的スプライシングされたRNA分子により、ドメインまたは生物活性を低下させるもしくは除去するために十分なその一部分を欠いているCSRアイソフォームを産生することができる。たとえば、エクソンを修飾したRNA分子は、ドメインもしくはその一部分を欠いている短縮CSRポリペプチドをコードしていることができる。また、エクソンを修飾したRNA分子は、ドメインが、挿入したアミノ酸によって、および／またはポリペプチドの野生型または優性型中に存在しない1つもしくは複数のアミノ酸でドメインを中断する読み枠中のシフトによって中断されているポリペプチドをコードしていることもできる。

【0198】

C. 受容体チロシンキナーゼのアイソフォーム

本明細書中に提供するCSRアイソフォームには、受容体チロシンキナーゼイントロン融合タンパク質を含めた受容体チロシンキナーゼ(RTK)のアイソフォームが含まれる。受容体チロシンキナーゼ(RTK)とは、構造的に関連している成長因子受容体の大ファミリーである。RTKは、細胞成長、分化、代謝および細胞遊走を含めた細胞プロセスに参与している。また、RTKは、細胞増殖、分化および細胞運命の決定に参与していることも知られている。ファミリーのメンバーには、それだけには限定されないが、表皮成長因子(EGF)受容体、血小板由来成長因子(PDGF)受容体、線維芽細胞成長因子(FGF)受容体、インスリン様成長因子(IGF)受容体、神経成長因子(NGF)受容体、血管内皮成長因子(VEGF)受容体、エフリンに対する受容体(Ephと呼ぶ)、肝細胞成長因子(HGF)受容体(METと呼ぶ)、TEK/Tie-2(アンジオポイエチン-1に対する受容体)、ジスコイジンドメイン受容体(DDR)およびTyro3/Axlなどの他のものが含まれる。

【0199】

本明細書では、RTKのドメインまたはRTKの生物活性を除去するもしくは低下させるために十分なドメインの一部分を欠いているように、RTKのドメインをもう1つ修飾したRTKアイソフォームを提供する。また、短縮および／またはアミノ酸をもう1つ付加することなどによってRTK配列の1つもしくは複数のアミノ酸を修飾したRTKアイソフォームも提供する。追加のアミノ酸により、新しいドメインまたはその一部分を追加することができる。RTKアイソフォームは、それだけには限定されないが、二量体化、キナーゼ活性、シグナル伝達、リガンド結合、膜会合および膜局在化を含めた生物活性について改変することができる。また、RTKアイソフォームはRTKの生物活性も変調することができる。

【0200】

1. RTKのドメインおよび生物活性

RTKは、細胞外ドメイン、膜にまたがる(膜貫通)ドメインおよび細胞内チロシンキナーゼドメインを含めた保存されたドメイン構造を有する。細胞外ドメインは、ポリペプチド成長因子または細胞膜に会合した分子などのリガンドと結合することができる。一部のRTKは、同定したリガンドを有さないオーファン受容体として分類されている。一部のRTKは、リガンド結合なしで活性を有する構成的RTKとして分類されている。

【0201】

典型的には、RTKの二量体化により受容体の触媒チロシンキナーゼドメインが活性化され、次いでシグナル伝達における活性が活性化される。RTKはホモ二量体またはヘテロ二量体であることができる。たとえば、PDGFは、 α および β サブユニットからなる

ヘテロ二量体である。V E G F 受容体はホモ二量体である。E G F 受容体は、ヘテロ二量体またはホモ二量体のどちらかであることができる。別の例では、E r b B 3 は、リガンドであるヘレグリンの存在下で、E r b B 2 および E r b B 3 などの E r b B ファミリー (E G F R ファミリー) の他のメンバーとヘテロ二量体化する。多くの R T K は、二量体化した際にサブユニット間のリン酸転移などによって自己リン酸化する能力を有する。キナーゼドメインの自己リン酸化によりチロシンキナーゼドメインが活性状態に維持される。タンパク質の他の領域における自己リン酸化は、受容体と他の細胞タンパク質との相互作用に影響を与える場合がある。

【0202】

R T K はシグナル伝達経路において相互作用する。たとえば、R T K は、活性化された場合に他のシグナル伝達分子をリン酸化することができる。たとえば、E G F R は、増殖、脱分化、アポトーシス、細胞遊走および血管形成を含めたプロセスに関するシグナル伝達経路において相互作用する。E G F R ファミリーメンバーは、タンパク質：タンパク質相互作用を介してシグナル伝達分子を動員することができ、一部の相互作用はシグナル伝達分子と受容体上のチロシンリン酸化部位との特異的結合を含む。たとえば、G r b 2 / S o s 複合体は E G F R 上のホスホチロシン部位に結合することができ、これは立ち代って R a s / R a f / M A P K シグナル伝達カスケードを活性化し、さらにこれは細胞増殖、遊走および分化に影響を与える。他の例示的なシグナル伝達分子には、他の R T K、G ー共役型受容体、インテグリン、ホスホリパーゼ C、 $C a^{2+}$ / カルモジュリン依存性キナーゼ、転写活性化剤、サイトカインおよび他のキナーゼが含まれる。

【0203】

2. 受容体チロシンキナーゼのアイソフォーム

R T K アイソフォームは、受容体チロシンキナーゼのドメインまたはドメインの一部分を欠いている。したがって、R T K アイソフォームは、1 つまたは複数の生物活性においてその同族 R T K と異なる。さらに、R T K アイソフォームは、R T K と直接または間接的に相互作用することなどによって R T K の生物活性を変調することができる。生物活性には、それだけには限定されないが、二量体化、多量体化および複合体形成などのタンパク質-タンパク質相互作用、リガンドに対する特異性および / または親和性、細胞の局在化および再局在化、膜への固定、キナーゼ活性などの酵素活性、調節タンパク質、補因子、ならびにシグナル伝達経路におけるものなどの他のシグナル伝達分子を含めた調節分子に対する応答が含まれる。

【0204】

R T K アイソフォームの構造および活性

一実施形態では、R T K アイソフォームはキナーゼドメインが修飾されている。たとえば、R T K アイソフォームはキナーゼドメインまたはその一部分の欠失を含む。欠失はドメイン全体の欠失である必要はなく、ドメイン内の 1 つまたは複数のアミノ酸だけが欠失していることができる。欠失は、キナーゼドメインの N 末端、C 末端またはドメイン内部であることができる。別の例では、R T K アイソフォームはキナーゼドメイン中のアミノ酸の付加を含む。アミノ酸の付加は、ドメインの N 末端、C 末端またはキナーゼドメイン内部の任意の箇所であることができる。

【0205】

実施形態の一態様では、R T K アイソフォームのキナーゼ活性が変更されている。たとえば、R T K アイソフォームのキナーゼ活性が低下しているまたは排除されている。一例では、R T K アイソフォームのキナーゼ活性の基質特異性に変更されている。たとえば、R T K アイソフォームは自己リン酸化する能力を有するが、シグナル伝達経路中のポリペプチドなどの他のポリペプチドをリン酸化することはできない。別の例では、R T K アイソフォームは他のポリペプチドをリン酸化するが、自己リン酸化する能力を有さない。R T K アイソフォームのキナーゼ活性は、活性が亢進されていることができる。R T K アイソフォームのキナーゼ活性は、その調節において変更されることができる。たとえば、キナーゼ活性は構成的に活性であるか、または構成的に不活性である、たとえば、リガンド

の追加によって、受容体の二量体化によって、タンパク質：タンパク質相互作用などを介した複合体化によって、および／または自己リン酸化によって調節されない場合がある。

【0206】

一実施形態では、RTKアイソフォームは膜貫通ドメインが修飾されている。たとえば、RTKアイソフォームは膜貫通ドメインまたはその一部分の欠失を含む。欠失は、膜貫通ドメインのN末端、C末端またはドメイン内部であることができる。別の例では、RTKアイソフォームは膜貫通ドメイン中のアミノ酸の付加を含む。アミノ酸の付加は、ドメインのN末端、C末端または膜貫通ドメイン内部の任意の箇所であることができる。

【0207】

実施形態の一態様では、RTKアイソフォームの膜会合および／または局在化が変更されている。たとえば、RTKアイソフォームは、RTKの野生型または優性型が膜局在性であるのに対して可溶性タンパク質であることができる（たとえば膜局在性でない）。たとえば、RTKアイソフォームは、細胞外へ分泌されるか、または細胞質中もしくは細胞オルガネラ内部に局在することができる。RTKアイソフォームは、その膜局在化において変更されることができる。たとえば、RTKアイソフォームは細胞オルガネラの膜などの内部膜と会合することができるが、細胞質膜と会合することはできない。RTKアイソフォームは、膜会合したタンパク質の割合が変更されているように、膜とのその会合を低下させることができる；たとえば、タンパク質の一部は可溶性であり、一部は膜会合している。また、RTKアイソフォームは、RTKの野生型または優性型の配向と比較した、膜に対するもしくは膜内の配向において変更されていることができる。たとえば、ポリペプチドのいくつかを膜内に包埋することができる。ポリペプチドのいくつかは、細胞膜のどちら側とも会合することができる。たとえば、RTKの野生型または優性型と比較してRTKアイソフォームのより多くが細胞質内もしくは細胞外で見つかるように、配向を変更することができる。

【0208】

一実施形態では、RTKアイソフォームは、その二量体化活性が変更されている。たとえば、RTKアイソフォームはホモ二量体化するが（すなわちRTKアイソフォーム：RTKアイソフォーム複合体）、同じ遺伝子由来のRTKの野生型もしくは優性型とはヘテロ二量体化しないか、またはヘテロ二量体化が低下している。別の例では、RTKアイソフォームはそれ自身とホモ二量体化しないか、あるいはホモ二量体化活性が低下しているが、同じ遺伝子もしくは異なる遺伝子由来のRTKの野生型または優性型とヘテロ二量体化することができる。別の例では、RTKアイソフォームは、他の遺伝子由来のRTKとのヘテロ二量体化が低下しているが、同じ遺伝子由来のRTKとヘテロ二量体化する。

【0209】

一実施形態では、RTKアイソフォームは、そのシグナル伝達活性が変更されている。たとえば、RTKアイソフォームは、シグナル伝達経路中の他の細胞タンパク質または補因子とのその会合が変更されている。たとえば、RTKアイソフォームは、それだけには限定されないが、別のRTK、G-共役型受容体、インテグリン、ホスホリパーゼC、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性キナーゼ、転写活性化剤または調節剤、サイトカインおよび別のキナーゼとの相互作用などの相互作用が変更されている。別の例では、RTKアイソフォームはRTKのシグナル伝達を変更する。たとえば、RTKアイソフォームは、RTKと相互作用し、RTKによるシグナル伝達を阻害または刺激することなどによってシグナル伝達におけるその活性を変更する。

【0210】

一実施形態では、RTKアイソフォームは、2つ以上の生物活性が変更されている。たとえば、RTKアイソフォームは、キナーゼ活性および膜会合が変更されている。別の例では、RTKアイソフォームは、キナーゼ活性および二量体化が変更されている。さらに別の例では、RTKアイソフォームは、キナーゼ活性、二量体化および膜会合が変更されている。たとえば、RTKアイソフォームは、キナーゼドメインおよび膜貫通ドメインが修飾されている。別の例では、アミノ酸の付加または挿入は、キナーゼドメインおよび膜

貫通ドメインを中断する。別の実施形態では、R T Kアイソフォームは、ドメイン接合点またはドメインのアミノ酸直鎖状配列の外側で修飾されており、修飾により、キナーゼドメインもしくは膜貫通ドメインなどのドメインの三次元構造などの構造が変更される。

【0211】

R T KアイソフォームによるR T Kの変調

R T Kアイソフォームは、R T Kと直接もしくは間接的に相互作用することなどによってR T Kの生物活性を変調または変更することができる。生物活性には、それだけには限定されないが、二量体化、多量体化および複合体形成などのタンパク質-タンパク質相互作用、リガンドに対する特異性および／または親和性、細胞の局在化および再局在化、膜への固定、キナーゼ活性などの酵素活性、調節タンパク質、補因子、ならびにシグナル伝達経路におけるものなどの他のシグナル伝達分子を含めた調節分子に対する応答が含まれる。一実施形態では、R T KアイソフォームとR T Kとの相互作用は、R T Kの生物活性を阻害する。別の実施形態では、R T KアイソフォームとR T Kとの相互作用は、R T Kの生物活性を刺激する。

【0212】

たとえば、R T Kアイソフォームは、リガンド結合についてR T Kと競合する。R T Kアイソフォームは、遊離リガンドを除去することによってR T Kの活性を調節または変調する「リガンドスポンジ」として用いることができる。別の例では、R T Kアイソフォームは、たとえばトランス自己リン酸化を防止することによってR T Kとヘテロ二量体化または複合体形成させた場合に、負に作用するリガンドとして作用する。プロテインキナーゼドメイン、またはキナーゼ活性を変更するために十分なその一部分を欠いているR T Kアイソフォームは、トランス優性の様式でR T Kの活性化を阻害することができる。

【0213】

一実施形態では、R T Kアイソフォームは、R T Kの二量体化の競合的阻害剤として作用する。たとえば、R T KアイソフォームはR T Kと相互作用し、そのR T Kがホモ二量体化またはヘテロ二量体化することを防止する。受容体の二量体化を阻害するアイソフォームは、受容体と複合体形成して下流のシグナル伝達としての受容体活性化を阻害することなどによって、下流のシグナル伝達経路を変調することができる。また、R T Kアイソフォームは、シグナル伝達経路中の他のポリペプチドおよび補因子との相互作用についてR T Kと直接競合することによって、R T Kの競合的阻害剤としても作用する。

【0214】

D. T N F Rアイソフォーム

本明細書中に提供するC S Rアイソフォームには、腫瘍壊死因子受容体(T N F R)のアイソフォームが含まれる。T N F Rアイソフォームは、T N F R受容体のドメインまたはドメインの一部を欠いている。したがって、T N F Rアイソフォームは、1つまたは複数の生物活性においてその同族T N F Rと異なる。さらに、T N F Rアイソフォームは、T N F Rと直接または間接的に相互作用することなどによってT N F Rの生物活性を変調することができる。生物活性には、それだけには限定されないが、三量体化、多量体化および複合体形成などのタンパク質-タンパク質相互作用、リガンドに対する特異性および／または親和性、細胞の局在化および再局在化、膜への固定、調節タンパク質、補因子、ならびにシグナル伝達経路におけるものなどの他のシグナル伝達分子を含めた調節分子に対する応答が含まれる。

【0215】

1. T N F Rのドメインおよび生物活性

T N Fリガンドおよび受容体ファミリーは、細胞の分化、活性化、および生存度に関与するものを含めた様々なシグナル伝達経路を調節する。T N F Rは、特徴的な反復性かつ細胞外のシステインに富んだモチーフおよびT N F Rファミリーのメンバー間で異なる可変性の細胞内ドメインを有する。T N F R受容体ファミリーには、それだけには限定されないが、T N F R 1、T N F R 2、T N F R r p、低親和性の神経成長因子受容体、F a s抗原、C D 4 0、C D 2 7、C D 3 0、4-1 B B、O X 4 0、D R 3、D R 4、D R

10

20

30

40

50

5、およびヘルペスウイルス侵入媒介物質（HVEM）が含まれる。TNFRに対するリガンドには、TNF- α 、リンフォトキシン、神経成長因子、Fasリガンド、CD40リガンド、CD27リガンド、CD30リガンド、4-1BBリガンド、OX40リガンド、APO3リガンド、TRAILおよびLIGHTが含まれる。TNFRには、シグナル伝達に参与する、リガンド結合ドメインを含めた細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインが含まれる。これらの受容体には名称がある。たとえば、TNFR1はp55またはp60とも呼ばれ、TNFR2はp75またはp80とも呼ばれる。TNFRは、典型的には細胞表面で三量体化する三量体タンパク質である。三量体化はTNFRの生物活性に重要である。

【0216】

TNFRは、システインに富んだモチーフを有する特徴的な細胞外ドメインを有する。細胞外ドメインにはリガンド結合ドメインが含まれる。典型的には、それぞれのTNFRメンバーが個別のリガンドと結合する。TNFR1とTNFR2およびDR4とDR5などの少数の受容体は、重複するリガンド特異性を有する。また、TNFRは三量体化する。三量体化は、リガンドの相互作用によって誘導することができる。また、TNFRリガンドは三量体であることもできる。一部のTNFRは、タンパク質分解によりプロセッシングされて、受容体の分泌された型を産生することができる。また、分泌された型も三量体化し、リガンド結合、受容体の膜結合した型との相互作用、および受容体の膜結合した型の阻害などの特定の生物活性を保っている。

【0217】

TNFRは、シグナル伝達を始動することができる。たとえば、TNFR1は、アポトーシスに参与する細胞内経路を活性化させる。TNFR1は、TNFリガンドと結合した際に三量体化する。三量体化は、受容体のデスドメインの会合を誘導する。TRADD、TRAF-2、FADDおよびRIPなどのアダプタータンパク質も受容体と会合する。TRAF-2およびRIPの会合は、キナーゼカスケードを含めたNF- κ BおよびJNK/AP-1経路を活性化させる。FADDの会合は、カスパーゼカスケードおよびそれに次ぐアポトーシスを活性化させる。

【0218】

2. TNFRアイソフォームの構造および活性

一実施形態では、TNFRアイソフォームは、膜貫通ドメインが修飾されている。たとえば、TNFRアイソフォームは膜貫通ドメインまたはその一部分の欠失を含む。欠失は膜貫通ドメインのN末端、C末端またはドメイン内部であることができる。別の例では、TNFRアイソフォームは、膜貫通ドメイン中のアミノ酸の付加を含む。アミノ酸の付加は、ドメインのN末端、C末端または膜貫通ドメイン内部の任意の箇所であることができる。

【0219】

実施形態の一態様では、TNFRアイソフォームの膜会合および／または局在化が変更されている。たとえば、TNFRアイソフォームは、TNFRの野生型または優性型が膜局在性であるのに対して可溶性タンパク質であることができる（たとえば膜局在性でない）。たとえば、TNFRアイソフォームは、細胞外へ分泌されるか、または細胞質中もしくは細胞オルガネラ内部に局在することができる。TNFRアイソフォームは、その膜局在化において変更されることができる。たとえば、TNFRアイソフォームは細胞オルガネラの膜などの内部膜と会合することができるが、細胞質膜と会合することはできない。TNFRアイソフォームは、膜会合したタンパク質の割合が変更されているように、膜とのその会合を低下させることができる；たとえば、タンパク質の一部は可溶性であり、一部は膜会合している。また、TNFRアイソフォームは、TNFRの野生型または優性型の配向と比較した、膜に対するもしくは膜内の配向において変更されることができる。たとえば、ポリペプチドのいくつかを膜内に包埋することができる。ポリペプチドのいくつかは、細胞膜のどちら側とも会合することができる。たとえば、TNFRの野生型または優性型と比較してTNFRアイソフォームのより多くは細胞質内もしくは胞外で見つ

10

20

30

40

50

かるように、配向を変更することができる。

【0220】

一実施形態では、TNFRアイソフォームは細胞内ドメインが修飾されている。たとえば、TNFRアイソフォームは細胞内ドメインまたはその一部分の欠失を含む。欠失は、細胞内ドメインのN末端、C末端またはドメイン内部であることができる。別の例では、TNFRアイソフォームは細胞内ドメイン中のアミノ酸の付加を含む。アミノ酸の付加は、ドメインのN末端、C末端または細胞内ドメイン内部の任意の箇所であることができる。

【0221】

一実施形態では、TNFRアイソフォームは、その三量体化活性が変更されている。たとえば、TNFRアイソフォームはホモ三量体化するが（すなわちTNFRアイソフォーム：TNFRアイソフォーム複合体）、同じ遺伝子由来のTNFRの野生型もしくは優性型とはヘテロ三量体化しないか、またはヘテロ三量体化が低下している。別の例では、TNFRアイソフォームはそれ自身とホモ三量体化しないか、またはホモ三量体化活性が低下しているが、同じ遺伝子もしくは異なる遺伝子由来のTNFRの野生型または優性型とヘテロ三量体化することができる。一実施形態では、TNFRアイソフォームは、TNFR三量体化の競合的阻害剤として作用する。たとえば、TNFRはTNFRと相互作用し、そのTNFRが三量体化することを防止する。

【0222】

一実施形態では、TNFRアイソフォームは、そのシグナル伝達活性が変更されている。たとえば、TNFRアイソフォームは、シグナル伝達経路中の他の細胞タンパク質または補因子とのその会合が変更されている。たとえば、TNFRアイソフォームは、それだけには限定されないが、リガンドと、TRADD（TNFR結合デスドメイン）、TRAF-2、FADD（Fas結合デスドメイン）およびRIP（受容体相互作用タンパク質）などのアダプタータンパク質との相互作用などの相互作用が変更されている。別の例では、TNFRアイソフォームはTNFRのシグナル伝達を変更する。たとえば、TNFRアイソフォームは、TNFRと相互作用し、TNFRによるシグナル伝達を阻害または刺激することなどによってシグナル伝達におけるその活性を変更する。

【0223】

例示的な実施形態では、TNFRアイソフォームは、2つ以上の生物活性が変更されている。たとえば、TNFRアイソフォームは、シグナル伝達および膜会合が変更されている。別の例では、TNFRアイソフォームは、シグナル伝達および三量体化が変更されている。さらに別の例では、TNFRアイソフォームは、キナーゼ活性、三量体化および膜会合が変更されている。別の実施形態では、TNFRアイソフォームは、細胞内ドメインおよび膜貫通ドメインが修飾されている。たとえば、2つのドメイン、またはそれらドメインの一部分が欠失している。別の例では、アミノ酸の挿入または付加は、細胞内ドメインおよび膜貫通ドメインを中断する。別の実施形態では、TNFRアイソフォームは、ドメイン接合点またはドメインのアミノ酸直鎖状配列の外側で修飾されており、修飾により、細胞内ドメインもしくは膜貫通ドメインなどのドメインの三次元構造などの構造が変更される。

【0224】

TNFRアイソフォームによるTNFRの変調

TNFRアイソフォームは、TNFRと直接もしくは間接的に相互作用することなどによって、TNFRの生物活性を変調または変更することができる。生物活性には、それだけには限定されないが、三量体化、多量体化および複合体形成などのタンパク質-タンパク質相互作用、リガンドに対する特異性および／または親和性、細胞の局在化および再局在化、膜への固定、調節タンパク質、補因子、ならびにシグナル伝達経路におけるものなどの他のシグナル伝達分子を含めた調節分子に対する応答が含まれる。一実施形態では、TNFRアイソフォームとTNFRとの相互作用は、TNFRの生物活性を阻害する。別の実施形態では、TNFRアイソフォームとTNFRとの相互作用は、TNFRの生物活

10

20

30

40

50

性を刺激する。

【0225】

たとえば、TNFRアイソフォームは、リガンド結合についてTNFRと競合する。TNFRアイソフォームは、遊離リガンドを除去することによってTNFRの活性を調節または変調する「リガンドスポンジ」として用いることができる。別の例では、TNFRアイソフォームは、たとえば、シグナル伝達を防止することによって、および／またはアダプタータンパク質などのシグナル伝達経路のメンバーとの相互作用を阻害することによってTNFRと三量体化または複合体形成させた場合に、負に作用するリガンドとして作用する。一実施形態では、TNFRアイソフォームは、TNFR三量体化の競合的阻害剤として作用する。たとえば、TNFRアイソフォームはTNFRと相互作用し、そのTNFRが三量体化することを防止する。受容体の三量体化を阻害するアイソフォームは、受容体と複合体形成して下流のシグナル伝達としての受容体活性化を阻害することなどによって、下流のシグナル伝達経路を変調することができる。

10

【0226】

E. CSRアイソフォームを同定および作製する方法

CSRアイソフォームは、クローニング方法を配列アラインメントならびにドメイン地図作成および選択などの生物情報学的方法と組み合わせて用いた、天然に存在する遺伝子ならびに発現産物(RNA)の解析および同定によって作製することができる。

【0227】

本明細書では、発現された遺伝子配列のクローニングおよびゲノムDNA配列などの遺伝子配列とのアラインメントを利用してCSRアイソフォームを同定および単離する、本明細書中の方法を提供する。たとえば、受容体チロシンキナーゼなどの候補遺伝子を選択することによって、1つまたは複数のアイソフォームを単離することができる。cDNA分子またはcDNAの領域などの発現された配列が単離される。cDNAまたはcDNAの領域を増幅するためにプライマーを設計することができる。一例では、候補遺伝子のオープンリーディングフレームの開始コドンに重複または隣接するプライマーを設計し、また、オープンリーディングフレームのストップコドンに重複または隣接するプライマーを設計する。プライマーを、mRNAを用いた逆転写酵素PCR(RT-PCR)などのPCRで用いて、オープンリーディングフレームをコードしている核酸分子を増幅することができる。このような核酸分子の配列決定を行い、アイソフォームをコードしているものを同定することができる。一例では、予測される大きさ(野生型または優性型をコードしていると予測される大きさなど)から、様々な大きさ(たとえば分子質量)の核酸分子を候補アイソフォームとして選択する。その後、本明細書中に記載の方法などによってこのような核酸分子を解析し、指定した特性を有する、アイソフォームをコードしている分子をさらに選択することができる。

20

30

【0228】

得られた核酸配列を用いてコンピュータ解析を行い、候補アイソフォームをさらに選択する。たとえば、cDNA配列と選択された候補遺伝子のゲノム配列とのアラインメントを行う。このようなアラインメントは、手動で、またはスプライシング変異体を解析するためのコンピュータプログラムであるSIM4などの生物情報学的プログラムを用いることによって、行うことができる。正準のドナーアクセプタースプライシング部位(たとえばGT-AG)を有する配列が選択される。エクソン欠失、エクソン保持、エクソン伸長およびイントロン保持などの選択することができる選択的スプライシングされた産物を表す分子を選択することができる。

40

【0229】

また、単離した核酸分子の配列解析を用いても、野生型もしくは優性型と比較してドメインおよび／または生物学的機能を保持しているあるいは欠いているアイソフォームをさらに選択することができる。たとえば、単離した核酸分子によってコードされているアイソフォームを、本明細書中に記載のものなどの生物情報学的プログラムを用いて、タンパク質ドメインを同定するために解析することができる。その後、ドメインもしくはその一

50

部分を保持しているまたは欠いているアイソフォームを選択することができる。

【0230】

本方法の一実施形態では、膜貫通ドメインまたは膜局在化を欠くもしくは顕著に低下させるために十分なその一部分を欠いているアイソフォームを選択する。たとえば、膜貫通ドメインの前が短縮されているまたは膜貫通ドメインが短縮されているアイソフォームを選択する。また、膜貫通ドメインまたはその一部分を欠いており、かつその欠失しているドメインまたはドメインの一部分の代わりに動作可能に連結した1つもしくは複数のアミノ酸を有するアイソフォームを選択することもできる。このようなアイソフォームは、エクソン伸長、イントロン保持、エクソン欠失およびエクソン挿入などの選択的スプライシング現象の結果である場合がある。場合によっては、このような選択的スプライシングされたRNA分子は、RNAの読み枠を変更する、および／または野生型もしくは優性型をコードしているRNA中で見つからない配列を動作可能に連結する。また、キナーゼドメインまたはその一部分を欠いているアイソフォームを選択することもできる。キナーゼドメインまたはその一部分を欠いており、かつ膜貫通ドメインもしくはその一部分も欠いているアイソフォームを選択することができる。また、二量体化もしくは三量体化ドメインなどの多量体化ドメイン、および／またはシグナル伝達活性と相互作用し、それに関与する細胞内ドメインを欠いているアイソフォームも選択することができる。

10

【0231】

たとえば、候補RTKアイソフォームをコードしている核酸分子を、キナーゼドメイン、膜貫通ドメイン、細胞外ドメインまたはその一部分を欠いているアイソフォームについてさらに選択することができる。RTKアイソフォームをコードしており、RTKの野生型または優性型とは異なる生物活性を有する核酸分子を選択することができる。一例では、アイソフォームが膜局在性でなく、細胞から分泌されるように膜貫通ドメインを欠いているRTKアイソフォームを選択する。別の例では、膜貫通ドメインまたはその一部分を欠いているTNFRアイソフォームを同定および選択する。また、細胞内ドメインを欠いている、または細胞内ドメインおよび膜貫通ドメインを欠いているTNFRアイソフォームも選択することができる。

20

【0232】

アイソフォームの対立遺伝子変異体

特定のCSRアイソフォームとは1つもしくは複数のアミノ酸が異なる、CSRアイソフォーム配列の対立遺伝子変異体を作製または同定することができる。対立遺伝子変異は、集団または種のメンバー間で起こり、種間でも起こる。たとえば、アイソフォームは、1つの遺伝子の異なる対立遺伝子に由来することができる、それぞれの対立遺伝子は互いに1つまたは複数のアミノ酸の差異を有していることができる。このような対立遺伝子は、保存的および／または非保存的なアミノ酸の差異を有していることができる。また、対立遺伝子変異体には、個々の対象もしくは動物モデルまたは他の動物などの様々な対象から産生あるいは同定したアイソフォームも含まれる。アミノ酸の変化は、アイソフォームの生物活性の変調をもたらす場合がある。場合によっては、アミノ酸の差異は「サイレント」である、すなわち生物活性に検出可能な影響を与えないまたは事実上与えないことができる。また、アイソフォームの対立遺伝子変異体は、突然変異誘発によって作製することもできる。このような突然変異誘発は、ランダムまたは部位特異的であることができる。たとえば、選択的グリコシル化、アイソフォーム中の部位におけるグリコシル化の増加もしくは阻害を含めたアイソフォームのグリコシル化の変化を成すためにアミノ酸配列または潜在的なグリコシル化部位を変更する、対立遺伝子変異体アイソフォームを作製することができる。対立遺伝子変異体アイソフォームは、配列がアイソフォームと少なくとも90%同一であることができる。一般に、同じ種由来の対立遺伝子変異体アイソフォームは、アイソフォームと少なくとも95%、96%、97%、98%、99%同一であり、典型的には、対立遺伝子変異体はアイソフォームと98%、99%、99.5%同一である。

30

40

【0233】

50

F. 例示的なCSRアイソフォーム

本明細書中の方法を用いて、様々な遺伝子からCSRアイソフォームを作製することができる。1つの例示的な遺伝子群は受容体チロシンキナーゼである。受容体チロシンキナーゼ(RTK)とは、たとえばポリペプチド内における配列モチーフの構造的配置に基づいてファミリーに分類することができる、遺伝子およびコードされたポリペプチドの大きなコレクションである。たとえば、免疫グロブリン、フィブロネクチン、カドヘリン、表皮成長因子およびクリングル反復などの細胞外ドメイン中の構造モチーフを用いて、RTKを群に分類することができる。このような構造モチーフによる分類から16を超えるRTKファミリーが同定されており、それぞれが保存されたチロシンキナーゼドメインを有する。RTKの例には、それだけには限定されないが、エリスロポエチン産生肝細胞(EPH)受容体(エフリン受容体とも呼ばれる)、表皮成長因子(EGF)受容体、線維芽細胞成長因子(FGF)受容体、血小板由来成長因子(PDGF)受容体、血管内皮成長因子(VEGF)受容体、細胞接着RTK(CAK)、Tie/Tek受容体、肝細胞成長因子(HGF)受容体(METと呼ぶ)、TEK/Tie-2(アンジオポイエチン-1に対する受容体)、ジスコイジンドメイン受容体(DDR)、インスリン成長因子(IGF)受容体、インスリン受容体関連(IRR)受容体、およびTyro3/Axlなどの他のものが含まれる。RTKをコードしている遺伝子の例には、それだけには限定されないが、ErbB2、ErbB3、DDR1、DDR2、EGFR、EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5、EphB6、FGFR-1、FGFR-2、FGFR-3、FGFR-4、Flt1(VEGFR-1としても知られる)、VEGFR-2、VEGFR-3(VEGFR-Cとしても知られる)、MET、RON、PDGFR-A、PDGFR-B、CSF1R、Flt3、KIT、TIE-1およびTEK(TIE-2としても知られる)、ならびに上述のRTKをコードしているが記載していない遺伝子が含まれる。

【0234】

RTKは様々なシグナル伝達経路に関与している。RTKは、細胞増殖、脱分化、アポトーシス、細胞遊走および血管形成を含めた重要な細胞プロセスを調節する。RTKの活性化、ひいてはそれに次ぐシグナル伝達経路の活性化は、一般に、リガンド結合および自己リン酸化による受容体の活性化などによって、受容体の活性化に依存している。RTKは誤調節を受ける場合があり、これによりシグナル伝達の誤調節がもたらされる。このような誤調節はいくつかの疾患および状態に関連している。あるいは、特定のRTKが細胞上で発現され、これは発癌性形質転換などの細胞活性の変更をもたらす、またはそれに関与する。このような発現および/または誤調節は、それだけには限定されないが、新生物疾患などの異常細胞増殖に関与する疾患、再狭窄、前眼部疾患、心血管病、肥満症および様々な他のものを含めたいくつかの疾患ならびに状態に関与している。

【0235】

本明細書中に提供し、本明細書中に提供する方法によって作製したRTKアイソフォームを用いて、特定の細胞種または組織に内在するRTKなどのRTKの生物活性を変調することができる。RTKの生物活性を変調する能力により、誤調節されたRTKおよびRTKが関与する細胞経路の指示された調節の再調節が可能となる。RTKの生物活性の変調には、RTKとの複合体化などによってRTKアイソフォームがRTKと相互作用する直接の変調、RTKのホモ二量体化および/もしくはヘテロ二量体化の変調ならびに/またはRTKのリン酸化の阻害を含めたRTKのトランスリン酸化の変調が含まれる。また、RTKの変調には、RTKアイソフォームがRTKの生物活性に間接的な影響を与える、間接的な変調も含まれる。間接的な変調には、リガンド結合についてRTKと競合する、「リガンドスポンジ」として作用するアイソフォームが含まれる。また、間接的な変調には、アイソフォームとシグナル伝達経路中のシグナル伝達分子との相互作用が含まれ、したがって、このようなシグナル伝達分子とRTKとの相互作用と競合することなどによって活性が変調される。例示的なRTKアイソフォーム、ならびにRTK活性の標的化お

よび調節におけるこのようなR T Kアイソフォームの使用を以下に記載する。

【0236】

1. E G F R

E G F R（表皮成長因子受容体）とは、表皮細胞および様々な他の細胞種の増殖を刺激する小さな53個のアミノ酸タンパク質リガンドであるE G Fに結合する、170 k D aのタンパク質である。E G F受容体は上皮組織、間葉組織および神経組織中で広く発現され、増殖および分化において重要な役割を果たす。E G F受容体は、いくつかの機能的ドメインによって特徴づけられている。E G F Rタンパク質（配列番号252として記載したG e n B a n k 番号N P _ 0 0 5 2 1 9）は、アミノ酸57～168およびアミノ酸361～481の2つの受容体Lドメインによって特徴づけられている。受容体Lドメインは、二葉性のリガンド結合部位を構成する。典型的には受容体チロシンキナーゼのシグナル伝達機構および受容体の凝集に関与している、フリン様のシステインに富んだ領域は、E G F R中のアミノ酸184～338に見つけることができる。E G F Rの膜貫通ドメインはアミノ酸646～668にわたり、プロテインキナーゼドメインはアミノ酸712～968にわたる。

【0237】

E G F Rポリペプチドには、E G F Rの対立遺伝子変異体が含まれる。たとえば、対立遺伝子変異体は、配列番号252と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1つまたは複数のアミノ酸の変異が、E G F Rのプロテインキナーゼドメイン中に起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばGがCで置き換えられている位置719、またはたとえばLがRで置き換えられている位置858、またはたとえばLがQで置き換えられている位置861において、アミノ酸の変化を含んでいることができる。また、対立遺伝子変異は、たとえばRがKで置き換えられていることができる位置521（S N P 番号11543848）などで1つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることもできる。一例では、対立遺伝子変異体には、配列番号252と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化が含まれ、変異体は生物活性に変化を示す。プロテインキナーゼドメイン中に位置719、858、または861などで起こるアミノ酸の変化は、非小細胞肺癌に罹患している患者におけるゲフィチニブに対する応答と関連づけることができ、これは、腫瘍におけるE G F Rシグナル伝達経路の重要な役割を示しており、または、位置858などで起こるアミノ酸の変化は、E G F Rの自己リン酸化によって評価したE G Fに対する応答においてE G F R受容体の亢進された活性に関連づけることができる。上述の1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的なE G F R対立遺伝子変異体を、配列番号288として記載した。

【0238】

E G F受容体は、e r b B遺伝子（たとえばE r b B 2、E r b B 3、E r b B 4）およびH E R 遺伝子（たとえばH e r - 2）としても知られている、関連遺伝子のファミリーによってコードされている。E G F受容体ファミリーには4つのメンバー、すなわちE G F受容体（H E R - 1；E r b B 1）、ヒト表皮成長因子受容体-2（H E R - 2；E r b B 2）、H E R - 3（E r b B 3）およびH E R - 4（E r b B 4）が含まれる。E G F R / H E R - 1に対するリガンドはE G Fであり、H E R - 2、H E R - 3およびH E R - 4に対するリガンドはニューレグリン-1（N R G - 1）である。N R G - 1はH E R - 3またはH E R - 4のどちらかに優先的に結合し、その後、結合した受容体サブユニットがH E R - 2とヘテロ二量体化する。また、H E R - 4も、ホモ二量体化して活性のある受容体を形成する能力を有する。

【0239】

E r b Bファミリーの誤調節は、いくつかの異なる種類の癌に関連するとされている。たとえば、E G F Rの過剰発現は、それだけには限定されないが、食道癌、胃癌、膀胱癌および結腸癌、神経膠腫および髄膜腫、肺扁平上皮癌、ならびに卵巣癌、子宮頸癌および腎癌を含めたいくつかのヒトの腫瘍に関連づけられている。本明細書中に提供する方法を用いて、E G F受容体の誤調節を標的とし、再調節する治療剤として用いるためのR T K

アイソフォームおよび R T K アイソフォームを含む薬剤組成物を作製することができる。

【0240】

a. E r b B 2

E r b B 2 とは、E G F 受容体ファミリーのメンバーである。E r b B 2 タンパク質（配列番号 266 として記載した Gen Bank 番号 NP_004439）は、アミノ酸 52～173 およびアミノ酸 366～486 の 2 つの受容体 L ドメイン；アミノ酸 189～343 のフリン様のシステインに富んだ領域；アミノ酸 653～675 の膜貫通ドメイン；ならびにアミノ酸 720～976 のタンパク質キナーゼドメインによって特徴づけられている。高い親和性で結合するリガンドは、E r b B 2 について同定されていない。その代わりに、E r b B 3 または E r b B 4 は、リガンド（NRG-1）によって結合された場合に E r b B 2 とヘテロ二量体化して活性のある受容体の二量体を形成する。さらに、E r b B 2 は、リガンドが存在しない場合に構成的活性（ホモ二量体化およびキナーゼ活性）を示す。さらに、E r b B 2 の過剰発現は細胞の形質転換を行う能力を有する。E r b B 2 の過剰発現が、乳癌、子宮癌、胃癌および子宮内膜癌を含めた様々な癌において同定されている。したがって、E r b B 2 のホモ二量体を標的とすることにより、E r b B 2 のホモ二量体化を調節することができる。たとえば、E r b B 2 の R T K アイソフォームは、E r b B 2 の過剰発現を標的としてそれをダウンレギュレーションすることができる。さらに、E r b B 2 の R T K アイソフォームは、ヘテロ二量体化によって E r b B 3 および／または E r b B 4 を標的とすることができる。

10

【0241】

E r b B 2 タンパク質には、E r b B 2 の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号 266 と比較して 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1 つまたは複数のアミノ酸の変異は、E r b B 2 の膜貫通ドメイン中に起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえば I が V で置き換えられている位置 655 において、アミノ酸の変化を含んでいることができる。一例では、対立遺伝子変異体には配列番号 266 と比較して 1 つまたは複数のアミノ酸の変化が含まれ、変異体は生物活性に変化を示す。位置 655 など E r b B 2 膜貫通ドメイン中に起こるアミノ酸の変化は、前立腺癌、胃癌、または乳癌のリスクの上昇に関連づけることができる。上述の 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的な E r b B 2 対立遺伝子変異体を、配列番号 299 として記載した。

20

30

【0242】

本明細書では、配列番号 266 に記載のものなどの同族 E r b B 2 と比較して 1 つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている、例示的な E r b B 2 アイソフォームを提供する。これには、配列番号 96～98 および 108 に記載のポリペプチドなどの、膜貫通ドメインを欠いており、キナーゼドメインを欠いている例示的な E r b B 2 アイソフォームが含まれる。このようなアイソフォームは E r b B 2 の他のドメイン含んでいることができる。たとえば、配列番号 96 として記載した例示的な E r b B 2 アイソフォームは、アミノ酸 54～175 およびアミノ酸 368～488 の 2 つの受容体 L ドメイン、ならびにアミノ酸 191～345 のフリン様のシステインに富んだ領域によって特徴づけられている。配列番号 97 および 98 として記載した例示的な E r b B 2 アイソフォームは、アミノ酸 52～173 およびアミノ酸 366～486 の 2 つの受容体 L ドメイン、ならびにアミノ酸 189～343 のフリン様のシステインに富んだ領域によって特徴づけられている。配列番号 108 として記載した例示的な E r b B 2 アイソフォームは、アミノ酸 52～75 の受容体 L ドメインの一部分によって特徴づけられている。

40

【0243】

E r b B 2 アイソフォームは、E r b B 2 および／または E r b B 3 の過剰発現によって特徴づけられているものなどの E G F R 受容体の過剰発現によって特徴づけられている癌の治療などにおいて、R T K を変調するために用いることができる。E r b B 2 アイソフォームは、喘息を含めた、炎症および過剰増殖の維持において E G F R ファミリーメンバーに関与する自己免疫疾患の治療として用いることができる。また、E r b B 2 アイソ

50

フォームは、メネトリエ病、アルツハイマー病を含めた状態においてR T Kを標的とするために用いるか、またはモジュレーターとして、たとえば骨吸収の拮抗剤として用いることもできる。

【0244】

b. E r b B 3

E r b B 3も、神経生存の発生およびシナプス形成、アストロサイト分化ならびにミクログリアの活性化の調節に関与している、E G F受容体ファミリーのメンバーである。E r b B 3タンパク質（配列番号267として記載したG e n B a n k番号NP__001973）は、アミノ酸55～167およびアミノ酸353～474の2つの受容体Lドメイン；アミノ酸180～332のフリン様のシステインに富んだ領域；アミノ酸644～666の膜貫通ドメイン；ならびにアミノ酸709～965のプロテインキナーゼドメインによって特徴づけられている。E r b B 3に対するリガンドはN R G-1である。N R G-1はE r b B 3およびE r b B 4に結合することができるが、E r b B 3はE r b B 4よりも低い規模の親和性でN R G-1に結合する。E r b B 3はE G F Rファミリーの他のメンバーと比較してより低いチロシンキナーゼ活性を有する。これは、代替シグナル伝達分子、たとえばホスファチジルイノシトール-3キナーゼを動員する能力を有する。E r b B 3の過剰発現は、乳癌、肺癌および膀胱癌ならびに腺癌などのいくつかのヒトの癌に関連するとされている。

【0245】

E r b B 3アイソフォームは、E r b B 2および／またはE r b B 3の過剰発現によって特徴づけられているものなどのE G F R受容体の過剰発現によって特徴づけられている癌の治療などにおいて、R T Kを標的とするために用いることができる。E r b B 3アイソフォームはE r b B 3ホモ二量体を標的とすることができる。E r b B 3アイソフォームは、E r b B 3アイソフォームとE r b B 2とのヘテロ二量体化を介してE r b B 2を標的とすることができる。E r b B 3アイソフォームは、E G F R受容体に関与している疾患および状態の治療に用いることができる。たとえば、E r b B 3アイソフォームは、喘息を含めた、炎症および過剰増殖の維持においてE G F Rファミリーメンバーに関与する自己免疫疾患の治療として用いることができる。E r b B 3アイソフォームは、メネトリエ病、アルツハイマー病を含めた状態においてR T Kを標的とするために用いるか、またはモジュレーターとして、たとえば骨吸収の拮抗剤として用いることもできる。

【0246】

2. ジスコイジンドメイン受容体-D D R 1

ジスコイジンドメイン受容体（たとえばD D R-1）とは、細胞接着に役割を果たすと考えられているR T Kのファミリーである。D D R 1タンパク質（配列番号250として記載したG e n B a n k番号NP__054699）は、ジスコイジン（D S）ドメインとしても知られるアミノ酸46～182のF 5／8 C型ドメイン；アミノ酸417～439の膜貫通ドメイン；およびアミノ酸610～913のプロテインキナーゼドメインによって特徴づけられている。ジスコイジンドメインとは、細胞凝集に関与する炭水化物結合タンパク質であるキイロタマホコリカビ（*Dictyostelium discoideum*、粘菌）タンパク質ジスコイジン-1に相同的な、細胞外ドメイン中の独特の構造モチーフである。ジスコイジン様ドメインは、他のR T K中には見つからないが、細胞膜タンパク質と相互作用することが知られている他の細胞外分子中（たとえば凝固因子VおよびV I I I）では見つかる。

【0247】

D D R 1タンパク質には、D D R 1の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号250と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、D D R 1のF 5／8 C型またはジスコイジンドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばWがAで置き換えられていることができる位置53、またはたとえばDがAで置き換えられていることができる位置55、またはたとえばSがAで置き換えられていることができる位置66、またはた

たとえばDがAで置き換えられていることができる位置68、またはたとえばRがAで置き換えられていることができる位置105、またはたとえばHがAで置き換えられていることができる位置106、またはたとえばLがAで置き換えられていることができる位置110、またはたとえばKがAで置き換えられていることができる位置112、またはたとえばVがAで置き換えられていることができる位置173、またはたとえばMがAで置き換えられていることができる位置174、またはたとえばSがAで置き換えられていることができる位置175において、アミノ酸の変化を含んでいることができる。一例では、対立遺伝子変異体には、配列番号250と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化が含まれ、変異体は生物活性に変化を示す。位置105および175などでDDR1のジスコイジンドメイン中に起こるアミノ酸の変化は、コラーゲンに結合することができないことによるDDR1の活性化およびリン酸化の低下をもたらす場合がある。位置106、173、および174などでのDDR1のジスコイジンドメイン中の他のアミノ酸の変化は、DDR1がコラーゲンに結合する能力の顕著な低下をもたらす場合がある。上述の1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的なDDR1対立遺伝子変異体を、配列番号286として記載した。

10

【0248】

DDRは、胎児のおよび成人の器官ならびに組織中で広く発現されている。DDR1は主に脳、肺、腎臓および胃腸管の上皮細胞中で発現され、DDR2は脳、心臓、および筋肉中で発現される。また、DDRは脳の発生においても重要な役割を果たし得る。DDRチロシンキナーゼがヒトの癌に関連づけられている。たとえば、DDR1はコラーゲン（たとえばI～VI型）と結合してコラーゲン誘導性のマトリックスメタロプロテイナーゼ-1の活性化を媒介することができる。マトリックスメタロプロテイナーゼ-1は細胞外基質の分解に関与しており、これにより新生細胞の転移が可能となる。DDR-1の過剰発現は、乳癌、子宮癌および食道癌ならびに小児脳癌などの様々な中枢神経系新生物等の癌に関連づけられている。また、DDR1活性化も炎症反応に関連するとされている。

20

【0249】

例示的なDDRアイソフォームには、配列番号106、115および117に記載のDDR1アイソフォームが含まれる。これらの例示的なDDR1アイソフォームは、配列番号250に記載のものなどの同族DDR1と比較して、1つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。配列番号106、115、および117として記載した例示的なDDR1アイソフォームは、アミノ酸46～182のF5/8C型ドメインを含み、膜貫通およびプロテインキナーゼドメインを欠いている。

30

【0250】

本明細書中のDDR1アイソフォームを含めたDDR1アイソフォームは、DDR1ポリペプチド中对立遺伝子変異を含んでいることができる。たとえば、DDR1アイソフォームは、対立遺伝子変異体中に存在する1つまたは複数のアミノ酸を含んでいることができる。一例では、DDR1アイソフォームは、配列番号286に記載の1つまたは複数の対立遺伝子変異を含む。対立遺伝子変異の例には、それだけには限定されないが、配列番号286のアミノ酸53、55、66、68、105、106、110、113、173、174、または175に対応する位置でのアミノ酸の変異を含めた、F5/8C型およびジスコイジンドメインにおける変異体が含まれる。

40

【0251】

DDR-1アイソフォームを用いてDDR-1 RTKを変調することができる。たとえば、DDR-1アイソフォームを用いて、DDR-1の過剰発現ならびにまたはDDR-1が関与している疾患および状態の活性化をダウンレギュレーションすることができる。

【0252】

3. Eph受容体

Eph受容体（エリスロポエチン産生肝細胞受容体；エフリン受容体とも呼ばれる）は、最も大きな知られているRTKファミリーである。Eph受容体に対するリガンドはエ

50

フリン（E p h 受容体相互作用タンパク質）である。E p h およびエフリンの系には、少なくとも14のE p h 受容体チロシンキナーゼタンパク質および9つのエフリン膜リガンドが含まれる。E p h 受容体およびエフリン膜タンパク質は、疾患および発生において重要な役割を果たす（たとえば図1参照）。たとえば、細胞表面E p h とエフリンタンパク質との結合により、相互作用する細胞の細胞骨格特性、接着特性および運動特性を調節する二方向のシグナルがもたらされる。このようなシグナルを介して、E p h およびエフリンタンパク質は、胚葉を確立させる初期の胚細胞の運動、ならびに組織境界の形成および軸索の経路探索に関与している細胞運動に関与している。リガンドおよび受容体は膜結合した分子であり、シグナル伝達はいずれのタンパク質を介しても行われる。エフリンは、それが細胞膜に固定されている様式に基づいて2つのクラスに分類されている；A型リガンドはグリコシルホスファチジルイノシトール（G P I）結合によって細胞膜に連結されており、B型リガンドは膜貫通ドメインをコードしている。E p h 受容体には、それだけには限定されないが、E p h A 1、E p h A 2、E p h A 3、E p h A 4、E p h A 5、E p h A 6、E p h A 7、E p h A 8、E p h B 1、E p h B 2、E p h B 3、E p h B 4、E p h B 5、E p h B 6が含まれる。

10

【0253】

エフリン受容体は、細胞質チロシンキナーゼドメイン、保存されたシステインに富んだドメイン、2つのフィブロネクチンI I I型ドメインおよび免疫グロブリン様N末端リガンド結合ドメインによって特徴づけられている。さらに、膜貫通ドメイン付近の2つのチロシン残基は高度に保存されており、リガンド結合に応答してリン酸化され、酵素機能に重要であると考えられる。タンパク質-タンパク質相互作用他の部位も、不穏性 α モチーフおよび一部のE p h 受容体のC末端に位置するディスク状の大きな閉鎖結合モチーフであるシナプス後性の密度タンパク質によって媒介される。不穏性 α モチーフ（S A M）は、S H 2 含有タンパク質と、リン酸化されており、かつ多くの場合ホモ二量体化を媒介する保存されたチロシンとの結合に媒介される、細胞-細胞によるシグナル伝達の開始を媒介する。

20

【0254】

R T K のE p h ファミリーは、胚性パターン形成、神経標的化、血管発生および血管形成を含めた様々な細胞プロセスに関与している。特に血管形成における役割により、E p h 受容体は乳癌などのヒトの癌に関連するとされている。E p h A 受容体の誤調節も病的状態に関与している。たとえば、E p h A 受容体チロシンキナーゼのアップレギュレーションは、特定の眼疾患、関節リウマチおよび癌に一般的な血管内皮細胞成長因子（V E G F）誘導性血管形成を刺激する。E p h A 受容体拮抗剤として作用するアイソフォームなどのE p h A アイソフォームを用いて、不適切な血管形成を遮断または阻害することができる。E p h B 受容体は、結腸直腸癌などの癌に関連するとされている。また、E p h B 受容体は樹状突起棘の発生（興奮性シナプスに対する後シナプスの標的）においても役割を果たし、神経変性障害に結び付け得る。例示的なE p h A およびE p h B アイソフォームを、配列番号107、149、151、153、155、168、170、172、および174に記載した。

30

【0255】

a. E p h A 1

E p h A 1 とはA型E p h 受容体である。E p h A 1 タンパク質（配列番号253として記載したG e n B a n k 番号N P _ 0 0 5 2 2 3）は、アミノ酸27～204のエフリンリガンド結合ドメイン、アミノ酸333～431およびアミノ酸448～528の2つのフィブロネクチンI I I型ドメイン；アミノ酸548～570の膜貫通ドメイン；アミノ酸624～880のプロテインキナーゼドメイン、ならびにカルボキシ末端の2つのS A Mドメイン（アミノ酸911～975のS A M - 1 およびアミノ酸910～976のS A M - 2）によって特徴づけられている。

40

【0256】

E p h A 1 タンパク質には、E p h A 1 の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、配

50

列番号289に記載の対立遺伝子変異などのように、対立遺伝子変異体は、配列番号253と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。1つまたは複数のアミノ酸の変異は、たとえばAがVで置き換えられていることができる位置160アミノ酸の変化などで、たとえばEphA1のエフリンリガンド結合ドメイン中で起こることができる。

【0257】

A型Eph受容体は、GPIアンカーを介して細胞膜に連結されているA型エフリンに結合する。EphA1は、皮膚、成人の胸腺、腎臓および副腎皮質を含めた、分化した上皮細胞中で広く発現される。EphA1の過剰発現は、頭頸部癌を含めた様々なヒトの癌に関連するとされている。EphA1アイソフォームは、Eph受容体に関連するとされているこのような疾患および他の状態を標的とするために用いることができる。

10

【0258】

例示的なEphA1アイソフォームには、配列番号107、149、151、および153に記載のEphA1アイソフォームが含まれる。これらの例示的なEphA1アイソフォームは、配列番号253に記載のものなどの同族EphA1と比較して、1つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。配列番号149および153として記載した例示的なEphA1アイソフォームは、アミノ酸27～204のエフリンリガンド結合ドメインおよびアミノ酸333～431の2つのフィブロネクチンIII型ドメインのうちの1つを含む。配列番号149として記載したアイソフォームは、同族受容体と比較してフィブロネクチンIII型ドメイン、膜貫通ドメイン、プロテインキナーゼドメイン、および2つのSAMドメインを欠いている。配列番号151として記載した例示的なEphA1アイソフォームは、アミノ酸27～204のエフリンリガンド結合ドメインを含むが、フィブロネクチンIII型ドメイン、膜貫通ドメイン、プロテインキナーゼドメインおよびSAMドメインを含まない。配列番号107として記載した例示的なEphA1アイソフォームは、アミノ酸1～114のエフリンリガンド結合ドメインを含むが、フィブロネクチンIII型ドメイン、膜貫通ドメイン、プロテインキナーゼドメインおよびSAMドメインを含まない。

20

【0259】

本明細書中のEphA1アイソフォームを含めたEphA1アイソフォームは、EphA1ポリペプチド中对立遺伝子変異を含んでいることができる。たとえば、EphA1アイソフォームは、対立遺伝子変異体中に存在する1つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。一例では、EphA1アイソフォームには、配列番号289に記載の1つまたは複数の対立遺伝子変異が含まれる。対立遺伝子変異は、位置160などでエフリンリガンド結合ドメイン中に1つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。

30

【0260】

b. EphA2

EphA2はエフリン-A3、エフリン-A1、エフリン-A4、およびエフリン-A2に結合する。EphA2の発現は癌において頻繁に上昇しており、乳房、前立腺、非小細胞肺癌、結腸、腎臓、肺、卵巣、胃、子宮、および侵襲性黒色腫を含めた腫瘍組織において高度に発現されている。また、EphA2は、限定された発現パターンでシュワン細胞、原条および後脳中でも見つかっている。EphA2は、単にマーカーとして機能するだけではなく、悪性進行において積極的に参加することが示唆されている。EphA2の正常な細胞機能はよく理解されていないが、腫瘍に基づいたモデルにより、細胞成長、生存、遊走、および血管形成の調節におけるEphA2の潜在的な役割が示唆されている。

40

【0261】

配列番号254として記載したEphA2受容体(GenBank番号NP_004422)は、アミノ酸28～201のエフリンリガンド結合ドメイン、アミノ酸329～424およびアミノ酸436～519の2つのフィブロネクチンIII型ドメイン、アミノ酸536～558の膜貫通ドメイン、アミノ酸613～871のプロテインキナーゼドメイン；ならびにカルボキシ末端の2つのSAMドメイン(アミノ酸902～966のSA

50

M-1およびアミノ酸901～968のSAM-2)によって特徴づけられている。

【0262】

EphA2タンパク質には、EphA2の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号254として記載したアミノ酸配列に対応する位置と比較して、1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1つまたは複数のアミノ酸の変異がEphA2のエフリンリガンド結合ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばIがNで置き換えられていることができる位置94(SNP番号1058370)、またはたとえばIがFで置き換えられていることができる位置96(SNP番号1058371)、またはたとえばKがNで置き換えられていることができる位置99(SNP番号1058372)において、アミノ酸の変化を含んでいることができる。対立遺伝子変異のさらなる例は、フィブロネクチンIII型ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばPがTで置き換えられている位置350(SNP番号11543934)において、アミノ酸の変化を含んでいることができる。1つまたは複数のアミノ酸の変異は、プロテインキナーゼドメイン中においても起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばEがKで置き換えられていることができる位置825において、アミノ酸の変化を含んでいることができる。上述の1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的なEphA2対立遺伝子変異体を、配列番号290として記載した。

【0263】

例示的なEphA2アイソフォームは、配列番号254に記載のものなどの同族EphA2と比較して、1つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。配列番号168として記載した例示的なEphA2アイソフォームは、アミノ酸28～201のエフリンリガンド結合ドメイン、アミノ酸329～424のフィブロネクチンIII型ドメインおよびアミノ酸436～497の別のフィブロネクチンIII型ドメインの一部分を含む。配列番号168は膜貫通ドメイン、プロテインキナーゼドメイン、およびSAMドメインを含まない。本明細書中のEphA2アイソフォームを含めたEphA2アイソフォームは、EphA2ポリペプチド中の対立遺伝子変異を含んでいることができる。たとえば、EphA2アイソフォームは、対立遺伝子変異体中に存在する1つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。一例では、EphA2アイソフォームには、配列番号290に記載の1つまたは複数の対立遺伝子変異が含まれる。対立遺伝子変異は、配列番号254中、またはたとえばフィブロネクチンIII型ドメイン中、配列番号254中のアミノ酸350に対応する位置などで、アミノ酸位置94、96、もしくは99に対応する位置を含んでいることができる。

【0264】

c. EphA8

EphA8はA型Eph受容体である。A型Eph受容体は、GPIアンカーを介して細胞膜に連結しているA型エフリンに結合する。EphA8は、細胞遊走および細胞接着、ならびに軸索ガイダンスを含めた神経系の発生に関連するとされている。EphA8アイソフォームは、Eph受容体に関連するとされているこのような疾患および他の状態を標的とするために用いることができる。

【0265】

EphA8受容体(配列番号260として記載したGenBank番号NP_065387)は、アミノ酸31～204のエフリンリガンド結合ドメイン、アミノ酸329～425およびアミノ酸437～524の2つのフィブロネクチンIII型ドメイン、アミノ酸541～563の膜貫通ドメイン、635～892のプロテインキナーゼドメインならびに2つのSAMドメイン(アミノ酸931～992のSAM-1およびアミノ酸927～994のSAM-2)によって特徴づけられている。

【0266】

EphA8タンパク質には、EphA8の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号260として記載したアミノ酸配列に対応する位置と比較して、1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1つまたは複数のアミノ酸の変

異は、E p h A 8 のフィブロネクチン I I I 型ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえば V が M で置き換えられていることができる位置 4 4 4 (S N P 番号 2 2 9 5 0 2 1) において、アミノ酸の変化を含んでいることができる。対立遺伝子変異は、たとえば A が V で置き換えられていることができる位置 3 0 1 (S N P 番号 6 3 8 5 2 4) 、またはたとえば E が Q で置き換えられていることができる位置 6 1 2 (S N P 番号 9 9 9 7 6 5) においても起こることができる。上述の 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的な E p h A 8 対立遺伝子変異体を、配列番号 2 9 3 として記載した。

【0267】

d. E p h B 1

E p h B 1 は、エフリンー B 2 、エフリンー B 1 、エフリンー A 3 、エフリンー A 1 およびエフリンー B 3 に結合することが示されている。E p h B 1 は発生中のおよび成人の神経組織中で発現される。E p h B 1 シグナル伝達経路は、細胞付着、遊走および毛細管アセンブリ応答を含めた血管発生に関する応答に影響を与える。

【0268】

E p h B 1 タンパク質 (配列番号 2 6 1 として記載した G e n B a n k 番号 N P _ 0 0 4 4 3 2) は、アミノ酸 1 9 ~ 1 9 6 のエフリンリガンド結合ドメイン、アミノ酸 3 2 3 ~ 4 1 4 およびアミノ酸 4 3 4 ~ 5 1 8 の 2 つのフィブロネクチン I I I 型ドメイン、アミノ酸 5 4 1 ~ 5 6 3 の膜貫通ドメイン、アミノ酸 6 1 9 ~ 8 7 8 のプロテインキナーゼドメイン、ならびにカルボキシ末端の 2 つの S A M ドメイン (アミノ酸 9 0 9 ~ 9 7 3 の S A M - 1 およびアミノ酸 9 0 8 ~ 9 7 5 の S A M - 2) によって特徴づけられている。

【0269】

E p h B 1 タンパク質には E p h B 1 の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号 2 6 1 として記載したアミノ酸配列に対応する位置と比較して、1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1 つまたは複数のアミノ酸の変異は、E p h B 1 のエフリンリガンド結合ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえば T が S で置き換えられていることができる位置 8 7 (S N P 番号 1 0 4 2 7 9 4) 、またはたとえば G が R で置き換えられていることができる位置 1 5 2 (S N P 番号 1 0 4 2 7 9 3 において、アミノ酸の変化を含んでいることができる。アミノ酸の変化のさらなる例は、フィブロネクチン I I I 型ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえば R が G で置き換えられている位置 3 6 7 (S N P 番号 1 0 4 2 7 8 9) 、またはたとえば R が S で置き換えられている位置 4 8 5 (S N P 番号 1 0 4 2 7 8 8) において、アミノ酸の変化を含んでいることができる。また、1 つまたは複数のアミノ酸の変化は、プロテインキナーゼドメイン中でも起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえば V が I で置き換えられていることができる位置 8 1 3 (S N P 番号 1 0 4 2 7 8 6) 、またはたとえば M が T で置き換えられていることができる位置 8 4 7 (S N P 番号 1 0 4 2 7 8 5) において、アミノ酸の変化を含んでいることができる。アミノ酸の変化の別の例は、S A M ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえば R が W で置き換えられている位置 9 7 3 (S N P 番号 1 0 4 2 7 8 4) において、アミノ酸の変化を含んでいることができる。対立遺伝子変異は、たとえば T が R で置き換えられている位置 2 7 4 (S N P 番号 1 1 2 6 9 0 6) においても起こることができる。上述の 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的な E p h B 1 対立遺伝子変異体を、配列番号 2 9 4 として記載した。

【0270】

例示的な E p h B 1 アイソフォームは、配列番号 2 6 1 に記載のものなどの同族 E p h B 1 と比較して、1 つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。配列番号 1 5 5 として記載した例示的な E p h B 1 アイソフォームは、同族 E p h B 1 受容体 (たとえば配列番号 2 6 1) 比較して、アミノ酸 1 9 ~ 1 6 7 のエフリンリガンド結合ドメインの一部分を含んでおり、フィブロネクチン I I I 型ドメイン、膜貫通ドメイン、プロテインキナーゼドメイン、および S A M ドメインを欠いている。

【0271】

10

20

30

40

50

本明細書中の E p h B 1 アイソフォームを含めた E p h B 1 アイソフォームは、E p h B 1 ポリペプチド中に対立遺伝子変異を含んでいることができる。たとえば、E p h B 1 アイソフォームは、対立遺伝子変異体中に存在する 1 つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。一例では、E p h B 1 アイソフォームには、配列番号 2 9 4 に記載の 1 つまたは複数の対立遺伝子変異が含まれる。対立遺伝子変異は、配列番号 2 6 1 のアミノ酸位置 8 7 および 1 5 2 に対応する位置などで、エフリンリガンド結合ドメイン中に 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。

【0272】

e. E p h B 4

E p h B 4 受容体はエフリンー B 2 およびエフリンー B 1 タンパク質に結合する。エフリンー B タンパク質は、E p h 受容体と相互作用した際に二方向のシグナル伝達が起こることができるように、シグナルを伝達する。

【0273】

E p h B 4 受容体ポリペプチド（配列番号 2 6 4 として記載した G e n B a n k 番号 N P _ 0 0 4 4 3 5）は、アミノ酸 1 7 ~ 1 9 7 のエフリンリガンド結合ドメイン、アミノ酸 3 2 4 ~ 4 1 4 およびアミノ酸 4 3 4 ~ 5 1 9 の 2 つのフィブロネクチン I I I 型ドメイン、アミノ酸 5 4 1 ~ 5 6 3 の膜貫通ドメイン、6 1 5 ~ 8 7 4 の細胞質タンパク質キナーゼドメイン、ならびにカルボキシ末端の 2 つの S A M ドメイン（アミノ酸 9 0 5 ~ 9 6 9 の S A M - 1 およびアミノ酸 9 0 4 ~ 9 7 1 の S A M - 2）によって特徴づけられている。

【0274】

E p h B 4 タンパク質には、E p h B 4 の対立遺伝子変異体が含まれていることができる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号 2 6 4 と比較して 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1 つまたは複数のアミノ酸の変異は、E p h B 4 のフィブロネクチン I I I 型ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえば A が D で置き換えられていることができる位置 4 6 3（S N P 番号 7 4 5 7 2 4 5）、またはたとえば Y が D で置き換えられていることができる位置 4 7 1（S N P 番号 3 8 9 1 4 9 5）において、アミノ酸の変化を含んでいることができる。さらなるアミノ酸の変化は、S A M ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえば E が D で置き換えられていることができる位置 9 2 6（S N P 番号 1 0 5 6 9 9 7）において、アミノ酸の変化を含んでいることができる。上述の 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的な E p h B 4 対立遺伝子変異体を、配列番号 2 9 7 として記載した。

【0275】

例示的な E p h B 4 アイソフォームには、配列番号 1 7 0、1 7 2 および 1 7 4 に記載の E p h B 4 アイソフォームが含まれる。これらの例示的な E p h B 4 アイソフォームは、配列番号 2 6 4 に記載のものなどの同族 E p h B 4 と比較して、1 つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。配列番号 1 7 0 として記載した例示的な E p h B 4 アイソフォームは、アミノ酸 1 7 ~ 1 9 7 のエフリンリガンド結合ドメインを含む。配列番号 1 7 0 は、フィブロネクチン I I I 型ドメイン、膜貫通ドメイン、プロテインキナーゼドメイン、および S A M ドメインを含まない。配列番号 1 7 2 として記載した例示的な E p h B 4 アイソフォームは、アミノ酸 1 7 ~ 1 9 7 のエフリンリガンド結合ドメイン、アミノ酸 3 2 4 ~ 4 1 4 のフィブロネクチン I I I 型ドメインおよびアミノ酸 4 3 4 ~ 5 1 4 の別のフィブロネクチン I I I 型ドメインの一部分を含む。配列番号 1 7 2 は、膜貫通ドメイン、プロテインキナーゼドメイン、および S A M ドメインを含まない。配列番号 1 7 4 として記載した例示的な E p h B 4 アイソフォームは、アミノ酸 1 7 ~ 1 9 7 のエフリンリガンド結合ドメインおよびアミノ酸 3 2 4 ~ 4 1 3 のフィブロネクチン I I I 型ドメインの一部分を含む。配列番号 1 7 4 は、第 2 のフィブロネクチン I I I 型ドメイン、膜貫通ドメイン、プロテインキナーゼドメイン、および S A M ドメインを含まない。

【0276】

本明細書中の E p h B 4 アイソフォームを含めた本明細書中の E p h B 4 アイソフォー

10

20

30

40

50

ムは、E p h B 4 ポリペプチド中に対立遺伝子変異を含んでいることができる。たとえば、E p h B 4 アイソフォームは、対立遺伝子変異体中に存在する1つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。一例では、E p h B 4 アイソフォームには、配列番号297に記載の1つまたは複数の対立遺伝子変異が含まれる。対立遺伝子変異は、配列番号264のアミノ酸位置463または471に対応する位置などで、フィブロネクチン I I I 型ドメイン中に1つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。

【0277】

4. 線維芽細胞成長因子受容体

線維芽細胞成長因子受容体 (F G F R) ファミリーには F G F R - 1、F G F R - 2、F G F R - 3、F G F R - 4 および F G F R - 5 が含まれる。1つまたは複数の F G F 受容体に結合する能力を有する F G F タンパク質は少なくとも23種知られている。F G F 受容体は、3つのN末端 I g 様ドメイン (細胞外)、膜貫通ドメインおよびC末端のスプリットチロシンキナーゼドメイン (細胞質) によって構造的に特徴づけられている。F G F およびその受容体は、細胞増殖の刺激、血管形成および創傷治癒の促進、ならびに細胞運動性および分化の変調に関与している。F G F R は、様々なヒトの癌および眼の疾患に関連するとされている。

【0278】

a. F G F R - 1

F G F R - 1 F G F - 1、- 2、および - 4 に対して特異性を有しており、線維芽細胞、内皮細胞、特定の上皮細胞、血管平滑筋細胞、リンパ球、マクロファージ、および数々の腫瘍細胞を含めたいくつかの細胞種中で発現される。

【0279】

F G F R - 1 ポリペプチド (配列番号268として記載した G e n B a n k 番号 A A A 35835) は、3つの免疫グロブリン様ドメイン; アミノ酸35~119のドメイン1、アミノ酸156~246のドメイン2、およびアミノ酸253~357のドメイン3によって特徴づけられている。また、F G F R - 1 は、アミノ酸375~397の膜貫通ドメインおよびアミノ酸476~752のプロテインキナーゼドメインも有する。

【0280】

F G F R - 1 タンパク質には、F G F R - 1 の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号268として記載したアミノ酸配列に対応する位置と比較して、1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、F G F R - 1 の免疫グロブリンドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばGがDで置き換えられていることができる位置97、またはたとえばYがCで置き換えられていることができる位置99、またはたとえばAがSで置き換えられていることができる位置165、またはたとえばKがEで置き換えられていることができる位置190、またはたとえばSがGで置き換えられていることができる位置192、またはたとえばDがGで置き換えられていることができる位置198、またはたとえばCがYで置き換えられていることができる位置275において、アミノ酸の変化を含んでいることができる。さらなるアミノ酸の変化は、プロテインキナーゼドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばVがMで置き換えられていることができる位置605、またはたとえばWがRで置き換えられていることができる位置664、またはたとえばMがRで置き換えられていることができる位置717において、アミノ酸を含んでいることができる。1つもしくは複数のアミノ酸の変化は、たとえばRがSで置き換えられていることができる位置22、またはたとえばPがRで置き換えられていることができる位置250、またはたとえばPがSで置き換えられていることができる位置770、またはたとえばGがRで置き換えられていることができる位置816、またはたとえばRがCで置き換えられていることができる位置820でも起こることができる。一例では、対立遺伝子変異体には、配列番号268と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化が含まれ、変異体は生物活性に変化を示す。位置97、99、165、275、605、664、もしくは717などのF G F R - 1 の免疫グロブリンまたはプロテインキナーゼドメ

インのいずれかにアミノ酸の変化を含むポリペプチドは、機能の突然変異の損失として特徴づけることができる。同族受容体の文脈（配列番号268など）では、このような変化により常染色体性優性のカルマン症候群が引き起こされる。位置717などでプロテインキナーゼドメイン中に起こるアミノ酸の変化は、PLC γ の受容体との会合を損ない、FGF媒介性のホスホチジルイノシトールおよびCa²⁺の流動を阻害する場合があるが、このような変化はFGF媒介性の有糸分裂誘発に影響を与えない。位置250などでのさらなる対立遺伝子変異体は、ファイファー症候群などの常染色体性優性の骨格障害に関連づけることができる。上述の1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的なFGFR-1対立遺伝子変異体を、配列番号300として記載した。

【0281】

例示的なFGFR-1アイソフォームには、配列番号119および176に記載のFGFR-1アイソフォームが含まれる。これらの例示的なFGFR-1アイソフォームは、配列番号268に記載のものなどの同族FGFR-1と比較して、1つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。配列番号119として記載した例示的なFGFR-1アイソフォームは、アミノ酸67～157の免疫グロブリン様ドメイン2およびアミノ酸164～220の免疫グロブリン様ドメイン3の一部分を含む。配列番号176として記載した例示的なFGFR-1アイソフォームは、アミノ酸70～159の免疫グロブリン様ドメイン2およびアミノ酸166～268の免疫グロブリン様ドメイン3を含む。これらの例示的なアイソフォームは、同族FGFR-1ポリペプチド（たとえば配列番号268）と比較して、それぞれ膜貫通およびプロテインキナーゼドメインを欠いている。

【0282】

本明細書中のFGFR-1アイソフォームを含めたFGFR-1アイソフォームは、FGFR-1ポリペプチド中对立遺伝子変異を含んでいることができる。たとえば、FGFR-1アイソフォームは、対立遺伝子変異体中に存在する1つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。一例では、FGFR-1アイソフォームには、配列番号300に記載の1つまたは複数の対立遺伝子変異が含まれる。対立遺伝子変異体は、配列番号268のアミノ酸位置97、99、165、190、192、および198に対応する位置などで、免疫グロブリン様ドメイン中に1つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。さらなる対立遺伝子変異体は、配列番号268のアミノ酸位置22に対応する位置における1つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。

【0283】

b. FGF-2

FGFR-2は、線維芽細胞成長因子受容体ファミリーのメンバーである。FGFR-2に対するリガンドには、それだけには限定されないが、FGF-1（塩基性FGF）、FGF-2（酸性FGF）、FGF-4およびFGF-7などのいくつかのFGFタンパク質が含まれる。FGF受容体は、発生中における組織リモデリングの細胞-細胞の連絡および成人組織における細胞恒常性に関与している。FGFR-2の過剰発現、またはその突然変異は、乳房悪性腫瘍、膵臓悪性腫瘍、結腸直腸悪性腫瘍、膀胱悪性腫瘍および子宮頸悪性腫瘍を含めた様々なヒトの癌を含めた過剰増殖性疾患に関連づけられている。FGFR-2イントロン融合タンパク質などのFGFR-2アイソフォームは、癌を含めた、FGFR-2がアップレギュレーションされた状態の治療に用いることができる。

【0284】

FGFR-2タンパク質（配列番号269として記載したGenBank番号NP_000132）は、3つの免疫グロブリン様ドメイン；アミノ酸41～125のドメイン1、アミノ酸159～249のドメイン2、およびアミノ酸256～360のドメイン3によって特徴づけられている。また、FGFR-2は、アミノ酸378～400の膜貫通ドメインおよびアミノ酸481～757のプロテインキナーゼドメインも含む。

【0285】

FGFR-2タンパク質には、FGFR-2の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号269と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化を含

む。たとえば、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、F G F R-2の免疫グロブリンドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばYがCで置き換えられていることができる位置105、またはたとえばMがTで置き換えられていることができる位置162、またはたとえばAがFで置き換えられていることができる位置172、またはたとえばMがTで置き換えられていることができる位置186（SNP番号755793）、またはたとえばSがPで置き換えられていることができる位置267、またはたとえばFがVで置き換えられていることができる位置276、またはたとえばCがFで置き換えられていることができる位置278、またはたとえばYがCで置き換えられていることができる位置281、またはたとえばQがPで置き換えられていることができる位置289、またはたとえばWがCで置き換えられていることができる位置290、またはたとえばAがSで置き換えられていることができる位置315、またはたとえばGがRで置き換えられていることができる位置338、またはたとえばYがHで置き換えられていることができる位置340、またはたとえばTがPで置き換えられていることができる位置341、またはたとえばCがR、Y、S、F、もしくはWで置き換えられていることができる位置342、またはたとえばAがPもしくはGで置き換えられていることができる位置344、またはたとえばSがCで置き換えられていることができる位置347、またはたとえばSがCで置き換えられていることができる位置351、またはたとえばSがCで置き換えられていることができる位置354において、アミノ酸を含んでいることができる。アミノ酸の変化のさらなる例は、膜貫通ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばGがRで置き換えられていることができる位置384において、アミノ酸を含んでいることができる。また、さらなるアミノ酸の変化は、プロテインキナーゼドメイン中でも起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばNがHで置き換えられていることができる位置549、またはたとえばEがGで置き換えられていることができる位置565、またはたとえばKがRで置き換えられていることができる位置641、またはたとえばKがNで置き換えられていることができる位置659、またはたとえばGがEで置き換えられていることができる位置663、またはたとえばRがGで置き換えられていることができる位置678において、アミノ酸を含んでいることができる。対立遺伝子変異は、たとえばRがPで置き換えられていることができる位置6、またはたとえばTがIで置き換えられていることができる位置31、またはたとえばRがGで置き換えられていることができる位置152、またはたとえばSがWもしくはLで置き換えられていることができる位置252、またはたとえばPがSもしくはRで置き換えられていることができる位置253、またはたとえばSがCで置き換えられていることができる位置372、またはたとえばYがCで置き換えられていることができる位置375においても起こることができる。一例では、対立遺伝子変異体には、配列番号269と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化が含まれ、変異体は生物活性に変化を示す。免疫グロブリンドメイン中、位置105、172、267、276、278、281、289、290、315、338、340、341、342、344、347、351、354などで起こるアミノ酸の変化、またはプロテインキナーゼドメイン中、位置549、565、641、659、663、もしくは678など起こるアミノ酸の変化、あるいは位置252、253、もしくは375などでの他のアミノ酸の変化は、このようなアミノ酸の変化が配列番号269に記載のものなどの同族F G F R-2中に存在する場合、アペール症候群、クルゾン症候群、またはファイファー症候群を含めた症候性頭蓋骨早期癒合症に関連づけられている。上述の1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的なF G F R-2対立遺伝子変異体を、配列番号301として記載した。

【0286】

例示的なF G F R-2アイソフォームには、配列番号178、180、182および184に記載のF G F R-2アイソフォームが含まれる。これらの例示的なF G F R-2アイソフォームは、配列番号269に記載のものなどの同族F G F R-2と比較して、1つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。配列番号184として記載した例示的なF G F R-2アイソフォームは、3つの免疫グロブリン様ドメイン；アミノ酸41

10

20

30

40

50

～125のドメイン1、アミノ酸159～249のドメイン2およびアミノ酸256～360のドメイン3を含んでいるが、膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いている。配列番号180として記載した例示的なFGFR-2アイソフォームは、免疫グロブリン様ドメイン1、2およびドメイン3の一部分（それぞれアミノ酸41～125、159～249および256～313）を含んでいるが、膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインが欠失している。配列番号178として記載した例示的なFGFR-2アイソフォームは、アミノ酸41～125の免疫グロブリン様ドメイン1およびアミノ酸159～249のドメイン2を含んでいるが、免疫グロブリン様ドメイン3、ならびに膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いている。配列番号182として記載した例示的なFGFR-2アイソフォームは、アミノ酸44～134の免疫グロブリン様ドメイン2およびアミノ酸141～245のドメイン3を含むが、免疫グロブリン様ドメイン1、膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを含まない。

10

【0287】

本明細書中のFGFR-2アイソフォームを含めたFGFR-2アイソフォームは、FGFR-2ポリペプチド中に対立遺伝子変異を含んでいることができる。たとえば、FGFR-2アイソフォームは、対立遺伝子変異体中に存在する1つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。一例では、FGFR-2アイソフォームには、配列番号301に記載の1つまたは複数の対立遺伝子変異が含まれる。対立遺伝子変異は、位置105、162、172、186、267、276、278、281、289、290、315、338、340、341、342、344、347、351、または354などで、免疫グロブリンドメイン中に1つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。さらなる対立遺伝子変異は、位置6、31、152、252、または253などにおける1つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。

20

【0288】

c. FGFR-4

FGFR-4は、FGF受容体チロシンキナーゼファミリーのメンバーである。FGFR-4の調節は一部の癌細胞において改変されている。たとえば、一部の腺癌では、FGFR-4は、正常な線維芽細胞中での発現と比較してダウンレギュレーションされている。FGFR-4の代替形態が一部の腫瘍細胞中で発現される。たとえば、ptd-FGFR-4はFGFR-4細胞外ドメインの一部分を欠いているが、第3のIg様ドメイン、膜貫通ドメインおよびキナーゼドメインを含む。このアイソフォームは下垂体腫瘍中に見つかり、腫瘍形成性がある。FGFR-4アイソフォームは、FGFR-4が誤調節されている疾患および状態の治療に用いることができる。たとえば、FGFR-4アイソフォームは、ptd-FGFR-4などの腫瘍形成性FGFR-4アイソフォームのダウンレギュレーションを行うために用いることができる。

30

【0289】

FGFR-4タンパク質（配列番号271として記載したGenBank番号NP_002002）は、3つの免疫グロブリン様ドメイン；アミノ酸35～113のドメイン1、アミノ酸152～242のドメイン2、およびアミノ酸249～351のドメイン3によって特徴づけられている。また、FGFR-4は、アミノ酸370～386の膜貫通ドメインおよびアミノ酸467～743のプロテインキナーゼドメインも含む。

40

【0290】

FGFR-4タンパク質には、FGFR-4の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号271と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、FGFR-4の免疫グロブリンドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばSがRで置き換えられている位置275（SNP番号11954456）、またはたとえばDがVで置き換えられている位置297（SNP番号1057633）において、アミノ酸を含んでいることができる。さらなるアミノ酸の変化は、プロテインキナーゼドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばRがLで置き換えられていることができる位置616（

50

S N P 番号 2 3 0 1 3 4 4) でアミノ酸の変化を含んでいることができる。対立遺伝子変異は、たとえば V が I で置き換えられていることができる位置 1 0 (S N P 番号 1 9 6 6 2 6 5)、またはたとえば P が L で置き換えられていることができる位置 1 3 6 (S N P 番号 3 7 6 6 1 8)、またはたとえば G が R で置き換えられていることができる位置 3 8 8 (S N P 番号 3 5 1 8 5 5) においても起こることができる。上述の 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的な F G F R - 4 対立遺伝子変異体を、配列番号 3 0 3 として記載した。

【0291】

例示的な F G F R - 4 アイソフォームは、配列番号 2 7 1 に記載のものなどの同族 F G F R - 4 と比較して、1 つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。例示的な F G F R - 4 アイソフォームには、配列番号 9 1、1 0 9 および 1 2 1 に記載の F G F R - 4 アイソフォームが含まれる。配列番号 1 2 1 として記載した例示的な F G F R - 4 アイソフォームは、アミノ酸 3 5 ~ 1 1 3 の免疫グロブリン様ドメイン 1、アミノ酸 1 5 2 ~ 2 4 2 のドメイン 2、およびアミノ酸 2 4 9 ~ 3 5 1 のドメイン 3 を含んでいるが、膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いている。配列番号 1 0 9 として記載した例示的な F G F R - 4 アイソフォームは、免疫グロブリン様アミノ酸 6 2 ~ 1 5 4 のドメイン 2 およびアミノ酸 1 6 1 ~ 2 0 9 のドメイン 3 の一部分を含むが、免疫グロブリン様ドメイン 1、膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを含まない。配列番号 9 1 として記載した例示的な F G F R - 4 アイソフォームは、同族受容体 (たとえば配列番号 2 7 1) 中に存在する免疫グロブリン様ドメイン、膜貫通ドメインおよびプロ

【0292】

本明細書中の F G F R - 4 アイソフォームを含めた F G F R - 4 アイソフォームは、F G F R - 4 ポリペプチド中に対立遺伝子変異を含んでいることができる。たとえば、F G F R - 4 アイソフォームは、対立遺伝子変異体中に存在する 1 つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。一例では、F G F R - 4 アイソフォームには、配列番号 3 0 3 に記載の 1 つまたは複数の対立遺伝子変異が含まれる。対立遺伝子変異は、配列番号 2 7 1 の位置 2 7 5 または 2 9 7 に対応するアミノ酸などで、免疫グロブリン様ドメイン中に 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。さらなる対立遺伝子変異体は、配列番号 2 7 1 のアミノ酸位置 1 0 または 1 3 6 に対応するアミノ酸などで、1

【0293】

5. 血小板由来成長因子受容体

血小板由来成長因子受容体 (P D G F R) とは、2 つのサブユニット、 α および β を含むホモまたはヘテロ二量体である。受容体のサブユニットは、N 末端の 5 つの I g 様ドメイン、1 つの膜貫通ドメイン、および C 末端の 1 つのスプリットキナーゼドメインからなる。

【0294】

P D G F R - A タンパク質 (配列番号 2 7 5 として記載した G e n B a n k 番号 N P _ 0 0 6 1 9 7) は、3 つの免疫グロブリン様ドメイン; アミノ酸 4 2 ~ 1 0 2 のドメイン 1、アミノ酸 2 2 8 ~ 2 9 2 のドメイン 2、およびアミノ酸 3 1 9 ~ 4 1 2 のドメイン 3 によって特徴づけられている。また、P D G F R - A は、アミノ酸 5 2 7 ~ 5 4 9 の膜貫通ドメインおよびアミノ酸 5 9 3 ~ 9 5 3 のプロテインキナーゼドメインも含む。P D G F R - B タンパク質 (配列番号 2 7 6 として記載した G e n B a n k 番号 N P _ 0 0 2 6 0 0) は、アミノ酸 3 2 ~ 1 1 9 およびアミノ酸 2 1 3 ~ 3 1 1 の 2 つの免疫グロブリン様ドメイン、アミノ酸 5 3 4 ~ 5 5 6 の膜貫通ドメイン、ならびにアミノ酸 6 0 0 ~ 9 5 8 のプロテインキナーゼドメインによって特徴づけられている。

【0295】

P D G F 受容体には、対立遺伝子変異、たとえば P D G F R - B および P D G F R - A 対立遺伝子変異体が含まれていることができる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番

号275または276と比較して、1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、PDGFR-Bに関して、対立遺伝子変異は、たとえばIがFで置き換えられている位置29(SNP番号17110944)、またはたとえばIがTで置き換えられている位置194(SNP番号2229560)、またはたとえばPがSで置き換えられている位置345(SNP番号2229558)で、1つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。上述の1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的なPDGFR-B対立遺伝子変異体を、配列番号307として記載した。

【0296】

PDGF受容体およびリガンドは、血塊の形成、細胞外基質の合成、免疫細胞のアポトーシスの化学走性および胚の発生を含めた様々な細胞プロセスに関与している。PDGF受容体の過剰発現は、胃、膵臓、肺および前立腺を含めたいくつかのヒトの癌腫に関連づけられている。血小板由来成長因子受容体(PDGR)の活性化は、良性前立腺肥大症および前立腺癌ならびに他の癌種に関連している。また、PDGF-Rの活性化は、アテローム性動脈硬化症の発生における平滑筋の増殖にも関連している。また、PDGRは、網膜の後ろの線維芽細胞の増殖によって引き起こされ、網膜剥離を生じる一般的な医学的問題である増殖性硝子体網膜症の変調にも関連するとされている。その受容体と同様、PDGRリガンドはAおよび/またはB鎖のホモまたはヘテロ二量体である。 α -PDGF受容体は、PDGF-AまたはPDGF-Bのどちらかによって活性化することができる。 β -PDGF受容体はPDGF-B鎖のみによって活性化することができる。PDGFファミリーの2つのさらなるメンバー、PDGF-CおよびPDGF-Dも単離されている。

【0297】

例示的なPDGRアイソフォームには、配列番号111および147に記載のアイソフォームが含まれる。これらの例示的なPDGRアイソフォームは、配列番号276に記載のものなどの同族PDGRと比較して、1つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。配列番号111として記載した例示的なPDGR-Aアイソフォームは、アミノ酸41~102の1つの免疫グロブリン様ドメインによって特徴づけられているが、膜貫通ドメインまたはプロテインキナーゼドメインを含まない。配列番号147として記載した例示的なPDGR-Bアイソフォームは、アミノ酸32~119およびアミノ酸213~310の2つの免疫グロブリン様ドメインによって特徴づけられているが、膜貫通ドメインまたはプロテインキナーゼドメインを含まない。

【0298】

本明細書中のPDGRアイソフォームを含めたPDGRアイソフォームは、PDGRポリペプチド中に対立遺伝子変異を含んでいることができる。たとえば、PDGRアイソフォームは、対立遺伝子変異体中に存在する1つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。一例では、PDGRアイソフォームは、配列番号307に記載の1つまたは複数の対立遺伝子変異が含まれる。対立遺伝子変異には、配列番号276の位置29または194に対応するアミノ酸などで、1つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。

【0299】

PDGRアイソフォームは、増殖性硝子体網膜症、およびアテローム性動脈硬化症を含めた平滑筋の過剰増殖状態などの過剰増殖性疾患を含めた、PDGRが関与する疾患および状態を標的とするために用いることができる。

【0300】

Flt3(fms関連チロシンキナーゼ3)、CSF1R(コロニー刺激因子1受容体)およびKIT(c-kitの受容体)も、PDGR-RTKサブファミリーのメンバーである。CSF1Rタンパク質(配列番号249として記載したGenBank番号NP_005202)は、3つの免疫グロブリン様ドメイン;アミノ酸19~102のドメイン1、アミノ酸202~324のドメイン2、およびアミノ酸412~487のドメイン3によって特徴づけられている。また、CSF1Rは、アミノ酸515~537の膜貫

通ドメインおよびアミノ酸 582～910 のプロテインキナーゼドメインによっても特徴づけられている。CSF1R タンパク質には、CSF1R の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号 249 に記載のものなどの同族 CSF1R 受容体と比較して、1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1 つまたは複数のアミノ酸の変異は、CSF1R の免疫グロブリン様ドメイン 2 中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえば V が M で置き換えられていることができる、位置 279 (SNP 番号 3829986) での 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。または、対立遺伝子変異体は、たとえば H が R で置き換えられていることができる位置 362 (SNP 番号 10079250)、またはたとえば Y が C で置き換えられていることができる位置 969 (SNP 番号 1801271) において、アミノ酸を含んでいることができる。上述の 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的な CSF1R 対立遺伝子変異体を、配列番号 285 として記載した。

10

【0301】

配列番号 145 として記載した例示的な CSF1R アイソフォームは、免疫グロブリン様アミノ酸 19～102 のドメイン 1、アミノ酸 202～296 の部分的な免疫グロブリン様ドメイン 2 を含む。配列番号 145 は、Ig 様ドメイン 3、膜貫通ドメインまたはプロテインキナーゼドメインを含まない。本明細書中の CSF1R アイソフォームを含めた CSF1R アイソフォームは、CSF1R ポリペプチド中对立遺伝子変異を含んでいることができる。たとえば、CSF1R アイソフォームは、対立遺伝子変異体中に存在する 1 つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。一例では、CSF1R アイソフォームには、配列番号 285 に記載の 1 つまたは複数の対立遺伝子変異が含まれる。対立遺伝子変異は、位置 279 などで、免疫グロブリン様ドメイン 2 中に 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。また、対立遺伝子変異には、位置 362 などで、1 つまたは複数のアミノ酸の変化が含まれていることもできる。

20

【0302】

KIT 受容体 (配列番号 273 として記載した GenBank 番号 NP_000213) は、アミノ酸 210～336 の免疫グロブリン様ドメイン、アミノ酸 521～543 の膜貫通ドメイン、およびアミノ酸 589～924 のプロテインキナーゼドメインによって特徴づけられている。KIT 受容体には、KIT の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号 305 に記載のものなど、配列番号 273 と比較して 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1 つまたは複数のアミノ酸の変異は、KIT の膜貫通ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえば M が L もしくは V で置き換えられていることができる位置 541 (SNP 番号 3822214) において、1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。アミノ酸の変化のさらなる例は、プロテインキナーゼドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえば G が R で置き換えられていることができる位置 664、またはたとえば C が R で置き換えられていることができる位置 788、またはたとえば T が I で置き換えられていることができる位置 801、またはたとえば D が V、H、もしくは Y で置き換えられていることができる位置 816、またはたとえば D が V で置き換えられている位置 820、またはたとえば N が K もしくは Y で置き換えられていることができる位置 822、またはたとえば Y が D もしくは C で置き換えられていることができる位置 823、またはたとえば W が R で置き換えられていることができる位置 835、またはたとえば P が S で置き換えられていることができる位置 869、またはたとえば Y が F で置き換えられていることができる位置 900 において、1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。また、対立遺伝子変異体は、たとえば D が N で置き換えられている位置 52、またはたとえば C が R で置き換えられている位置 136、またはたとえば A が T で置き換えられている位置 178、またはたとえば W が R で置き換えられている位置 557 においても、1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。

30

40

【0303】

一例では、対立遺伝子変異体には、配列番号 273 と比較して 1 つまたは複数のアミノ

50

酸の変化が含まれ、変異体は生物活性に変化を示す。たとえば、対立遺伝子変異体は、位置 816、823、822、または 801などで、KITのプロテインキナーゼドメイン中に起こる1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。別の例では、1つまたは複数のアミノ酸の変化は、位置 900などで、プロテインキナーゼドメイン中に起こり、受容体のリン酸化の減少、CrkIIなどのアダプタータンパク質との会合、および活性化に関連している。受容体の野生型または優性型の文脈では、このような対立遺伝子変異は、疾患または状態、たとえば精巣精上皮腫、頭蓋内胚細胞腫、慢性骨髄性白血病、ヒト斑症および特発性骨髄線維症に関連している場合がある。

【0304】

配列番号 93として記載した例示的なKITアイソフォームは、アミノ酸 210～336の免疫グロブリン様ドメインを含むが、膜貫通ドメインまたはプロテインキナーゼドメインを含まない。本明細書中のKITアイソフォームを含めたKITアイソフォームは、KITポリペプチド中对立遺伝子変異を含んでいることができる。たとえば、KITアイソフォームは、対立遺伝子変異体中に存在する1つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。一例では、KITアイソフォームには、配列番号 305に記載の1つまたは複数の対立遺伝子変異が含まれる。対立遺伝子変異は、配列番号 273の位置 136または 178に対応するアミノ酸などで、1つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。

【0305】

Flt3受容体（配列番号 272として記載したGenBank番号 NP_004110）は、アミノ酸 78～161およびアミノ酸 257～345の免疫グロブリン様ドメイン、アミノ酸 542～564の膜貫通ドメイン、ならびにアミノ酸 610～943のチロシンキナーゼドメインによって特徴づけられている。Flt3タンパク質には、Flt3の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号 304に記載のものなど、配列番号 272と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、Flt3のチロシンキナーゼドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばDがY、H、もしくはFで置き換えられていることができる位置 835、またはたとえばIがSで置き換えられていることができる位置 836、またはたとえばNがIもしくはYで置き換えられていることができる位置 841、またはたとえばYがHで置き換えられていることができる位置 842において、アミノ酸を含んでいることができる。一例では、対立遺伝子変異体には、配列番号 272と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化が含まれ、変異体は生物活性に変化を示す。位置 835または 841などで、Flt3受容体のチロシンキナーゼドメイン中に起こる1つまたは複数のアミノ酸の変化は、Flt3リガンドの刺激が存在しない場合に、転写STAT5のシグナル伝達物質および活性化剤などの、Flt3の下流の標的の構成的活性化をもたらす場合がある。1つまたは複数のアミノ酸の変化は、位置 835、836、および 842などで、Flt3のチロシンキナーゼドメイン中に存在することができ、また、疾患または状態、たとえば小児および成人における脊髄形成異常症候群から急性骨髄白血病への進行と関連づけることができる。

【0306】

Flt3は、胎盤ならびに性腺、脳および造血細胞などの様々な成人組織中で発現される。Flt3は、性腺、脳および神経系における生物学的調節に関連している。Flt3は、小児AMLなどの小児癌の標的として示唆されている。KITは、赤血球細胞、間質細胞、肥満細胞および生殖細胞を含めた幅広い様々な細胞種の調節に関与している。KITは、消化管間質腫瘍を含めた様々な癌に関与している。Flt3、CSF1RおよびKITのRTKアイソフォームは、RTKに関与している疾患および状態の治療で用いることができる。

【0307】

6. MET（ヘパトサイト成長因子に対する受容体）

METとは、肝細胞成長因子（HGF）、すなわち細胞成長、形態形成および運動性を

制御する多機能性サイトカインに対する R T K である。主に間葉細胞によって産生されるパラ分泌因子である H G F は、迅速な膜のラフリング、微小突起の形成、および細胞の運動性の増加を含めた、分裂促進的ならびに形態形成的な変化を誘導する。M E T によるシグナル伝達は、腫瘍形成性を増加させ、細胞運動性を誘導し、i n v i t r o での侵襲性および i n v i v o での転移を亢進することができる。また、M E T シグナル伝達は、プロテアーゼおよびウロキナーゼの産生を増加させることもでき、これにより、腫瘍の転移の促進に重要な細胞外基質／基底膜の分解がもたらされる。

【0308】

M E T は、肝細胞中で高度に発現される R T K である。M E T は、2つのジスルフィドで連結されたサブユニット、すなわち 50 k D の α サブユニットおよび 145 k D の β サブユニットからなる。完全にプロセッシングされた M E T タンパク質では、 α サブユニットは細胞外にあり、 β サブユニットは細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびチロシンキナーゼドメインを有する。M E T に対するリガンドは肝細胞成長因子 (H G F) である。F G F および M E T によるシグナル伝達は、細胞成長、運動性および侵襲を含めた、肝細胞ならびに上皮細胞における分裂促進的な活性を刺激する。他の R T K と同様に、これらの特性は M E T を発癌性活性に関連づける。癌における役割に加えて、M E T は、マラリア感染症の発生において重要な因子であることも示されている。肝細胞をマラリアによる感染症に対して感受性をもたせるために M E T の活性化が必要であり、したがって、M E T はこの疾患の予防の主要な標的である。

【0309】

M E T 受容体 (配列番号 274 として記載した G e n B a n k 番号 N p _ 000236) は、アミノ酸 55 ~ 500 の S e m a ドメインによって特徴づけられている。S e m a ドメインは、肝細胞成長因子受容体に加えて、その一部が軸索ガイダンスの間に忌避性シグナルとして機能する、分泌された膜貫通タンパク質の大きなファミリーであるセマフォリン中に発生する。M E T 中では、S e m a ドメインは、リガンド結合に加えて受容体の二量体化に関与していることが示されている。また、M E T タンパク質は、アミノ酸 519 ~ 562 のプレキシンのシステインに富んだ反復、アミノ酸 563 ~ 655、アミノ酸 657 ~ 739 およびアミノ酸 742 ~ 836 の 3つの I P T / T I G ドメインによって特徴づけられている。I P T とは、プレキシンおよび転写因子に共有される免疫グロブリン様の折畳みの略である。T I G とは、転写因子中の免疫グロブリン様ドメイン (転写因子 I G) の略である。M E T 中の T I G ドメインは、細胞外基質と受容体シグナル伝達との間の相互作用の一部を媒介する役割を担っている可能性がある。また、M E T タンパク質は、アミノ酸 951 ~ 973 の膜貫通ドメインおよびアミノ酸 1078 ~ 1337 の細胞質タンパク質キナーゼドメインによっても特徴づけられている。

【0310】

M E T 受容体には、M E T の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号 274 と比較して 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1 つまたは複数のアミノ酸の変異は、M E T の S e m a ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえば K が R で置き換えられている位置 113、またはたとえば D が N で置き換えられている位置 114、またはたとえば V が A で置き換えられている位置 145、またはたとえば H が R で置き換えられている位置 148、またはたとえば T が P で置き換えられている位置 151、またはたとえば V が A で置き換えられている位置 158、またはたとえば E が D で置き換えられている位置 168、またはたとえば I が T で置き換えられている位置 193、またはたとえば V が L で置き換えられている位置 216、またはたとえば V が A で置き換えられている位置 237、またはたとえば T が A で置き換えられている位置 276、またはたとえば F が L で置き換えられている位置 314、またはたとえば L が P で置き換えられている位置 337、またはたとえば D が V で置き換えられている位置 340、またはたとえば N が D で置き換えられている位置 382、またはたとえば R が G で置き換えられている位置 400、またはたとえば H が R で置き換えられている位置 476、またはたとえば L が M で置き換えられている位置 481、またはたと

10

20

30

40

50

例えばDがGで置き換えられている位置500において、アミノ酸を含んでいることができる。さらなる例では、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、METのプレキシンのシステインに富んだ反復ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばHがYで置き換えられていることができる位置542において、アミノ酸を含んでいることができる。他の例では、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、METのIPT/TIGドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばLがSで置き換えられている位置622、またはたとえばFがSで置き換えられている位置720、またはたとえばAがTで置き換えられている位置729において、アミノ酸を含んでいることができる。さらなる例では、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、METのプロテインキナーゼドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばHがRで置き換えられている位置1094、またはたとえばNがYで置き換えられている位置1100、またはたとえばYがCで置き換えられている位置1230、またはたとえばYがDで置き換えられている位置1235、またはたとえばMがTで置き換えられている位置1250において、アミノ酸を含んでいることができる。また、対立遺伝子変異体は、たとえばVがAで置き換えられている位置37、またはたとえばMがTで置き換えられている位置39、またはたとえばQがRで置き換えられている位置42、またはたとえばYがHで置き換えられていることができる位置501、またはたとえばTがAで置き換えられていることができる位置511などにおいても、1つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。一例では、対立遺伝子変異体には、配列番号274と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化が含まれ、変異体は生物活性に変化を示す。上述の1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的なMET対立遺伝子変異体を、配列番号306として記載した。上述のものなどの、MET受容体のチロシンキナーゼドメイン中に起こるアミノ酸の変化は、METの調節不備の機能と関連づけることができる。たとえば、受容体の野生型または優性型の文脈では、MET受容体中の対立遺伝子の変化は、腫瘍の侵襲、血管形成、および転移の促進を含めたヒトの癌の発生に関連するとされている。

【0311】

本明細書中に提供するMETの例示的なアイソフォームは、配列番号274に記載のものなどの同族MET受容体と比較して、1つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。本明細書中に提供する例示的なMET受容体アイソフォーム（たとえば配列番号103、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、および214）は、膜貫通ドメインおよび／またはプロテインキナーゼドメインを欠いている。さらに、本明細書中に提供する例示的なMETアイソフォームは、MET受容体の野生型または優性型の1つもしくは複数のドメインを含む（たとえば配列番号274として記載）。たとえば、配列番号103、190、192、196、198、200、202、204、206、208、210、212、および214として記載したMET受容体アイソフォームは、すべて完全なSemadメインを含む。配列番号103、192、196、198、200、202、206、208、210、212、および214として記載したMETアイソフォームは、完全なプレキシンのシステインに富んだ反復ドメインを含む。MET受容体アイソフォームは、1つまたは複数のIPT/TIGドメインを含んでいることができる。たとえば、配列番号103、198、200、202、204、206、208、210、212、および214として記載したMET受容体アイソフォームは、少なくとも1つの完全なIPT/TIGドメインを含む。配列番号103、208、210、212、および214として記載したMET受容体アイソフォームはすべて、少なくとも2つの完全なIPT/TIGドメインを含む。配列番号103および212として記載したMET受容体アイソフォームは、3つの完全なIPT/TIGドメインを含む。本明細書中に提供するMET受容体アイソフォームには、とりわけ、MET受容体の野生型または優性型と比較してドメインの一部分しか含まないアイソフォームが含まれる（たとえば配列番号274として記載）。たとえば、配列番号186、188、および194として記載したMET受容体アイソフォームは、それぞれアミノ酸55～412、55～468、および55～400のS

10

20

30

40

50

e m a ドメインの一部分を含む。配列番号 1 9 6 として記載した M E T 受容体アイソフォームは、アミノ酸 5 6 3 ~ 6 2 1 の I P T / T I G ドメインの一部分を含む。配列番号 1 9 8、2 0 0 および 2 0 4 として記載した M E T 受容体アイソフォームは、1 つの完全な I P T / T I G ドメインに加えて、第 2 の I P T / T I G ドメイン（それぞれアミノ酸 6 5 7 ~ 6 6 4、6 5 7 ~ 7 1 9、および 6 2 9 ~ 6 7 2）の一部分を含む。配列番号 2 1 0 として記載した M E T 受容体アイソフォームは、2 つの完全な I P T / T I G ドメインに加えて、アミノ酸 7 4 2 ~ 8 2 3 の第 3 の I P T / T I G ドメインの一部分を含む。

【0 3 1 2】

本明細書中の M E T アイソフォームを含めた M E T アイソフォームは、M E T ポリペプチド中に対立遺伝子変異を含んでいることができる。たとえば、M E T アイソフォームは、対立遺伝子変異体中に存在する 1 つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。一例では、M E T アイソフォームには、配列番号 3 0 6 に記載の 1 つまたは複数の対立遺伝子変異が含まれる。対立遺伝子変異は、位置 1 1 3、1 1 4、1 4 5、1 4 8、1 5 1、1 5 8、1 6 8、1 9 3、2 1 6、2 3 7、2 7 6、3 1 4、3 3 7、3 4 0、3 8 2、4 0 0、4 7 6、4 8 1、4 8 1、または 5 0 0 など、S e m a ドメイン中に 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。対立遺伝子変異は、位置 5 4 2 など、プレキシンのシステインに富んだ反復ドメイン中においても起こることができる。さらなる対立遺伝子変異は、位置 6 2 2、7 2 0、または 7 2 9 など、I P T / T I G ドメイン中においても起こることができる。また、対立遺伝子変異には、位置 3 7、3 9、4 2、5 0 1、または 5 1 1 など、他のアミノ酸の変化が含まれていることも

【0 3 1 3】

M E T アイソフォームは、転移癌の治療または予防、および腫瘍増殖に必要な血管形成などの血管形成の阻害において用いることができる。M E T アイソフォームの治療的応用には、肺癌、悪性末梢神経鞘腫瘍（M P N S T）、結腸癌、胃癌、および皮膚の悪性黒色腫が含まれる。

【0 3 1 4】

また、M E T アイソフォームは、腫瘍細胞の侵襲性を予防するために、他の抗血管形成薬と組み合わせて用いることもできる。抗血管形成薬は腫瘍において低酸素状態を生じさせ、これにより、細胞を H G F 刺激に対して感作させることによって腫瘍細胞の侵襲を促進することができる。M E T アイソフォームは、抗血管形成薬を与えた場合に M E T の阻害またはダウンレギュレーションを行うことなどによって、M E T の生物活性を標的とし、それを変調することができ、したがって、腫瘍細胞の侵襲性が予防または阻害される。

【0 3 1 5】

また、M E T アイソフォームの治療的応用には、マラリアの予防も含まれる。マラリアの原因物質であるプラスモジウムは、哺乳動物への感染を開始するためにまず肝細胞に感染しなければならない。スポロゾイトはいくつかの肝細胞を、その形質膜を破ることによってそれを通して遊走し、その後、最終的にその 1 つで感染が確立される。スポロゾイトの遊走による肝細胞の創傷は肝細胞成長因子（H G F）の分泌を誘導し、これにより、肝細胞が感染に対して感受性を持つこととなる。感染は、分泌された H G F による H G F 受容体である M E T の活性化に依存する。マラリアの寄生虫は、M E T を、宿主細胞を感染に対して感受性を持たせるシグナルの媒介物質として利用する。H G F / M E T シグナル伝達は、肝細胞中における寄生虫の初期発生に必要な、宿主細胞のアクチン細胞骨格の再配置を誘導する。M E T アイソフォームは、M E T をダウンレギュレーションし、したがってマラリア寄生虫による M E T シグナル伝達の誘導を阻害または予防し、それによりマラリア感染症を阻害または予防するための治療剤として投与することができる。

【0 3 1 6】

R O N（r e c e p t e u r d ' o r i g i n e n a n t a i s；マクロファージ刺激 1 受容体としても知られる）とは、R T K の M E T サブファミリーの別のメンバーである。R O N に対するリガンドはマクロファージ刺激タンパク質（M S P）である。R O

Nは、上皮由来の細胞中で発現される。RONは、肺癌および結腸癌を含めた上皮癌において役割を果たす。RONおよびMETは卵巣癌において発現され、また、癌細胞に選択的利点を与えることによって癌の進行を促進することが示唆されている。また、RONは特定の結腸直腸癌中で過剰発現される。RON遺伝子中の生殖系列の突然変異はヒトの腫瘍化に関連づけられている。RONアイソフォームは、RONが過剰発現される疾患および状態においてRONの活性を変調することなどによって、RONを変調するために用いることができる。

【0317】

RONタンパク質（配列番号277として記載したGenBank番号NP_002438）は、アミノ酸58～507のSemaドメイン、アミノ酸526～568のプレキシンのシステインに富んだドメイン、3つのIPT/TIGドメイン（アミノ酸569～671、アミノ酸684～767、およびアミノ酸770～860）、アミノ酸960～982の膜貫通ドメインならびにアミノ酸1082～1341の細胞質タンパク質キナーゼドメインによって特徴づけられている。

【0318】

RON受容体には、RONの対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号308に記載のものなど、配列番号277と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、RONのSemaドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばGがSで置き換えられている位置113（SNP番号3733136）、またはたとえばGがAで置き換えられている位置209、またはたとえばQがRで置き換えられている位置322（SNP番号2230593）、またはたとえばNがSで置き換えられている位置440（SNP番号2230592）において、一塩基多型（SNP）を含んでいることができる。また、アミノ酸の変異は、たとえばRがQで置き換えられている位置523（SNP番号2230590）、またはたとえばVがMで置き換えられている位置946（SNP番号13078735）においても起こることができる。さらに、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、RONのプロテインキナーゼドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばGがSで置き換えられている位置1195（SNP番号7433231）、またはたとえばRがGで置き換えられている位置1335（SNP番号1062633）、またはたとえばDがVで置き換えられている位置1232、またはたとえばMがTで置き換えられている位置1254において、アミノ酸を含んでいることができる。一例では、対立遺伝子変異体には、配列番号277と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化が含まれ、変異体は生物活性に変化を示す。対立遺伝子変異体は、たとえば受容体の野生型または優性型の文脈では、疾患または状態に関連していることができる。たとえば、配列番号277の1232および1254に対応する位置などで、RONのチロシンキナーゼドメイン中に起こるアミノ酸の変化は、b-カテニンの細胞蓄積を引き起こすことによって発癌性の細胞形質転換および腫瘍発生に関連していることができ、ここで、b-カテニンのレベルの増加は癌に関連している。

【0319】

配列番号129、216、218および220は、例示的なRONアイソフォームを示す。例示的なRONアイソフォームは、配列番号277に記載のものなどの同族RONと比較して、1つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。たとえば、配列番号129、216、218および220として記載した例示的なRONアイソフォームは、膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いている。配列番号129として記載した例示的なRONアイソフォームは、アミノ酸58～495の切断されたSemaドメインによって特徴づけられている。配列番号129は、プレキシンのシステインに富んだドメインおよびIPT/TIGドメインを含まない。配列番号216として記載した例示的なRONアイソフォームも、アミノ酸58～410の切断されたSemaドメイン、アミノ酸420～462の完全なプレキシンのシステインに富んだドメイン、およびアミノ酸463～521のIPT/TIGドメインの一部分によって特徴づけられている

。配列番号220として記載した例示的なRONアイソフォームは、完全なSemaドメインおよびプレキシンのシステインに富んだドメイン、ならびにアミノ酸569～627のIPT/TIGドメインの一部を含む。配列番号218は、完全なSemaドメイン、プレキシンのシステインに富んだドメイン、および3つのIPT/TIGドメインを含む例示的なRONアイソフォームを示す。

【0320】

本明細書中のRONアイソフォームを含めたRONアイソフォームには、RONポリペプチド中の対立遺伝子変異も含まれていることができる。たとえば、RONアイソフォームは、対立遺伝子変異体中に存在する1つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。一例では、RONアイソフォームには、配列番号308に記載の1つまたは複数の対立遺伝子変異が含まれる。対立遺伝子変異体は、位置113、209、322、または440などで、Semaドメイン中に1つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。また、対立遺伝子変異体は、位置523などで、1つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。

【0321】

7. 血管内皮成長因子 (VEGF)

血管内皮成長因子 (VEGF) とは、8つのシステイン残基の保存されたパターンを有し、共通のVEGF受容体を共有する、密に関連する成長因子のファミリーである。VEGF受容体には、VEGFR-1 (Flt-1) VEGFR-2 (Flk-1/KDR)、およびVEGFR-3 (Flt-4) が含まれる。VEGF受容体に対するリガンドには、血管内皮成長因子-A (ヴァスキュロトロピン (vasculotropin, VAS)) または血管透過性因子 (VPF) としても知られる) VEGF-B、VEGF-C、VEGF-Dおよび胎盤性成長因子 (PlGF) が含まれる。VEGFタンパク質および受容体は、細胞遊走、増殖および管の形成を含めた血管形成の多くの側面において重要な役割を果たし、したがって、これらのタンパク質が多種の癌の病因に関連づけられる。Flt-1、Flk、およびFlt-4/KDRは、VEGFRファミリーメンバーをコードしている遺伝子である。

【0322】

VEGFRに関連する疾患および状態を標的化するための例示的なRTKアイソフォームには、配列番号99～102、110、123、125、127、224および226に記載のVEGFRアイソフォームが含まれる。このようなアイソフォームは、川崎病、関節リウマチ、糖尿病性網膜症、網膜症および乾癬などの急性炎症性疾患の治療、ならびに異常な血管形成の再調節において用いることができる。さらに、VEGFRアイソフォームは、乳癌を含めた癌の治療に用いることができる。

【0323】

a. VEGFR-1 (Flt-1)

Flt-1 (fms様チロシンキナーゼ-1) は、チロシンキナーゼのVEGF受容体ファミリーのメンバーである。Flt-1に対するリガンドには、VEGF-AおよびPlGF (胎盤性成長因子) が含まれる。Flt-1およびそのリガンドは血管形成に重要であるので、これらのタンパク質の調節不備は、固形腫瘍の増殖または転移、関節リウマチ、糖尿病性網膜症、網膜症および乾癬などの異常な血管形成から生じる様々な疾患に顕著な影響を与える。また、Flt-1は、微小血管の透過性亢進を伴った全身性血管炎である川崎病にも関連するとされている。

【0324】

配列番号282として記載したVEGFR-1ポリペプチド (GenBank番号NP_002010) は、4つの免疫グロブリン様ドメイン; アミノ酸231～337のドメイン1、332～427のドメイン2、アミノ酸558～656のドメイン3、およびアミノ酸661～749のドメイン4によって特徴づけられている。また、VEGFR-1は、アミノ酸764～780の膜貫通ドメインおよびアミノ酸827～1154のプロテインキナーゼドメインも含む。

【0325】

配列番号99～102、110および123は、例示的なVEGFR-1アイソフォームを示す。例示的なVEGFR-1アイソフォームは、配列番号282に記載のものなどの同族VEGFR-1と比較して、1つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。たとえば、例示的なVEGFR-1アイソフォームは、同族VEGFR-1（たとえば配列番号282）と比較して、膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いている。また、このようなアイソフォームは、追加のドメインまたは同族VEGFR-1のドメインの一部も欠いている。配列番号99、100および110として記載した例示的なVEGFR-1アイソフォームは、アミノ酸231～337およびアミノ酸332～427の2つの免疫グロブリン様ドメインを含むが、免疫グロブリン様ドメイン2および3を含まない。配列番号101として記載した例示的なVEGFR-1アイソフォームは、アミノ酸231～337の免疫グロブリン様ドメイン1およびアミノ酸332～394の免疫グロブリン様ドメイン2の一部を含む。配列番号102として記載した例示的なVEGFR-1アイソフォームは、アミノ酸231～331の1つの免疫グロブリン様ドメインの一部を含む。本明細書中のVEGFR-1アイソフォームを含めたVEGFR-1アイソフォームは、同族VEGFR-1ポリペプチド（たとえば、配列番号282）と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化などの、VEGFR-1ポリペプチド中に対立遺伝子変異を含んでいることができる。

10

【0326】

b. VEGFR-2 (KDR/F1k-1)

20

VEGFR-2 (KDR/F1k-1) は、チロシンキナーゼのVEGF受容体ファミリーのメンバーである。VEGFR-2に対するリガンドには、VEGFが含まれる。VEGFは、内皮および造血幹細胞上で発現されたその受容体、すなわちVEGFR-2およびVEGFR-1と相互作用し、それにより、新血管形成部位への動員を促進して血管再生プロセスを加速する。したがって、VEGFは数種の腫瘍中で見つかり、*in vitro*および*in vivo*において腫瘍血管形成活性を有する。VEGFとVEGFR-1との相互作用は細胞遊走を媒介し、一方で、VEGFとVEGFR-2との相互作用は細胞増殖を媒介する。VEGFR-2受容体は生理的および病理学的な血管発生においてVEGF活性を司っている主要なヒト受容体であり、VEGF-KDRシグナル伝達経路は抗血管形成剤および血管形成促進剤の開発における潜在的な標的である。

30

【0327】

VEGFR-2タンパク質（配列番号283として記載したGenBank番号NP_002244）は、3つの免疫グロブリン様ドメイン；アミノ酸224～325のドメイン1、アミノ酸333～418のドメイン2、およびアミノ酸666～766のドメイン3によって特徴づけられている。また、VEGFR-2は、アミノ酸763～785の膜貫通ドメインおよびアミノ酸834～1160のプロテインキナーゼドメインも含む。

【0328】

VEGFR-2タンパク質には、VEGFR-2の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号283と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、VEGFR-2の免疫グロブリン様ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばVがIで置き換えられていることができる位置297（SNP番号2305948）、またはたとえばRがKで置き換えられていることができる位置349（SNP番号1824302）、またはたとえばDがNで置き換えられていることができる位置392（SNP番号2034964）において、一塩基多型（SNP）を含んでいることができる。さらに、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、VEGFR-2のプロテインキナーゼドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばKがNで置き換えられている位置835（SNP番号1139775）、またはたとえばVがEで置き換えられている位置848（SNP番号1139776）、またはたとえばVがIで置き換えられている位置952（SNP番号13129474）において、アミノ酸を含んでいることができる。また、1つまた

40

50

は複数のアミノ酸の変化は、膜貫通ドメイン中でも起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえば A が T で置き換えられている位置 772 (SNP 番号 1062832) において、アミノ酸を含んでいることができる。また、アミノ酸の変異は、たとえば Q が H で置き換えられている位置 472 (SNP 番号 1870377)、またはたとえば R が G で置き換えられている位置 787 (SNP 番号 1139774)、またはたとえば P が S で置き換えられている位置 1147、またはたとえば P が I で置き換えられている位置 1210 (SNP 番号 11540507)、またはたとえば S が T で置き換えられている位置 1347 (SNP 番号 1139777) においても起こることができる。一例では、対立遺伝子変異体には、配列番号 283 と比較して 1 つまたは複数のアミノ酸の変化が含まれ、変異体は生物活性に変化を示す。対立遺伝子変異体は、たとえば受容体の野生型または優性型の文脈では、疾患または状態に関連していることができる。たとえば、本明細書中に記載の位置 1147 など、キナーゼドメイン中に起こるアミノ酸の変化は、若年性血管腫中に見つかるものなどの腫瘍に関連していることができる。上述の 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的な VEGFR-2 対立遺伝子変異体を、配列番号 313 として記載した。

10

【0329】

VEGFR-2 の例示的なアイソフォームには、配列番号 283 に記載のものなどの同族 VEGFR-2 と比較して、1 つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いているアイソフォームが含まれる。このようなアイソフォームには、膜貫通ドメインもプロテインキナーゼドメインも含まない、配列番号 224 に記載のアイソフォームが含まれる。配列番号 224 として記載した例示的な VEGFR-2 アイソフォームは、アミノ酸 224 ~ 325 の、アミノ酸 333 ~ 418 の免疫グロブリン様ドメイン、およびアミノ酸 666 ~ 691 の第 3 の免疫グロブリン様ドメインの一部分によって特徴づけられている。

20

【0330】

本明細書中の VEGFR-2 アイソフォームを含めた VEGFR-2 アイソフォームは、VEGFR-2 ポリペプチド中に対立遺伝子変異を含んでいることができる。たとえば、VEGFR-2 アイソフォームは、対立遺伝子変異体中に存在する 1 つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。一例では、VEGFR-2 アイソフォームには、配列番号 313 に記載の 1 つまたは複数の対立遺伝子変異が含まれる。対立遺伝子変異体は、位置 297、349、または 392 など、免疫グロブリン様ドメイン中に 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。また、対立遺伝子変異体は、位置 472 などにおいても、1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。

30

【0331】

c. VEGFR-3

VEGFR-3 は、リンパ内皮細胞中で優勢に発現される。VEGFR-3 シグナル伝達は、リンパ管の発生および維持に重要である。VEGFR-3 を発現しているマウスモデルを、VEGFR-3 アイソフォームの存在下におけるリンパ組織の発生および維持に対する効果を評価するために用いることができる。また、VEGFR-3 は血管内皮に対して効果を有する場合もある。

【0332】

VEGFR-3 ポリペプチド (配列番号 284 として記載した GenBank 番号 NP_002011) は、4 つの免疫グロブリン様ドメイン; アミノ酸 231 ~ 328 のドメイン 1、アミノ酸 349 ~ 398 のドメイン 2、アミノ酸 571 ~ 655 のドメイン 3 およびアミノ酸 677 ~ 766 のドメイン 4 によって特徴づけられている。また、VEGFR-3 は、アミノ酸 776 ~ 798 の膜貫通ドメインおよびアミノ酸 845 ~ 1169 のプロテインキナーゼドメインも含む。

40

【0333】

VEGFR-3 ポリペプチドには、VEGFR-3 の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号 284 と比較して 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1 つまたは複数のアミノ酸の変異は、VEGFR-3 のプロテイン

50

キナーゼドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばGがSで置き換えられていることができる位置854、またはたとえばQがHで置き換えられていることができる位置890（SNP番号448012）、またはたとえばAがPで置き換えられていることができる位置915、またはたとえばCがWで置き換えられていることができる位置916、またはたとえばGがRで置き換えられていることができる位置933、またはたとえばPがSで置き換えられていることができる位置954、またはたとえばPがLで置き換えられていることができる位置1008、またはたとえばRがWもしくはQで置き換えられていることができる位置1041、またはたとえばPがLで置き換えられていることができる位置1137、またはたとえばDがEで置き換えられていることができる位置1164（SNP番号1049080）において、一塩基多型（SNP）を含んでいることができる。また、アミノ酸の変異は、たとえばDがGで置き換えられている位置24、またはたとえばDがGで置き換えられている位置134、またはたとえばNがDで置き換えられていることができる位置149、またはたとえばTがAで置き換えられていることができる位置494（SNP番号307826）、またはたとえばRがCで置き換えられていることができる位置1189（SNP番号744282）においても起こることができる。一例では、対立遺伝子変異体には、配列番号284と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化が含まれ、変異体は生物活性に変化を示す。本明細書中に記載の位置854、915、916、933、1041、および1137での変化などの、チロシンキナーゼドメイン中に起こるアミノ酸の変化は、VEGFR-3シグナル伝達を妨害する場合がある。対立遺伝子変異体は、たとえば受容体の野生型または優性型の文脈では、疾患または状態に関連していることができる。たとえば、チロシンキナーゼドメイン中に起こるアミノ酸の変化は、原発性の先天性リンパ浮腫に関連していることができ；位置954でのアミノ酸の変化は、若年性血管腫などの腫瘍に関連していることができる。上述の1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的なVEGFR-3対立遺伝子変異体を、配列番号314として記載した。

【0334】

例示的なVEGFR-3アイソフォームは、配列番号284に記載のものなどの同族VEGFR-3と比較して、1つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。配列番号125、127および226は、膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いている例示的なVEGFR-3アイソフォームを示す。このようなアイソフォームは、VEGFR-3の他のドメインを含む。配列番号226として記載した例示的なVEGFR-3アイソフォームは、アミノ酸231～328の免疫グロブリン様ドメイン1、アミノ酸349～398のドメイン2、アミノ酸571～655のドメイン3、およびアミノ酸677～723のドメイン4の一部分によって特徴づけられている。配列番号127は、1つのアミノ酸231～272の免疫グロブリン様ドメインによって特徴づけられている。

【0335】

本明細書中のVEGFR-3アイソフォームを含めたVEGFR-3アイソフォームには、配列番号284に記載のものなどの同族VEGFR-3受容体と比較して、VEGFR-3ポリペプチド中の対立遺伝子変異も含まれていることができる。たとえば、VEGFR-3アイソフォームには、たとえば配列番号284の位置24、134、149または494に対応する位置で、配列番号314に記載のものなどの対立遺伝子変異体中に存在する1つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。

【0336】

8. TIE

Tie-1およびTie-2/TEK（免疫グロブリン様およびEGF様ドメインを有するチロシンキナーゼ）受容体は、免疫グロブリンおよび表皮成長因子相同ドメインを有する内皮RTKである。Tie/TEK受容体の標的化のための例示的なRTKアイソフォームには、配列番号104、105、112、113、131、133、135、137、139、141、143および222に記載のRTKアイソフォームが含まれる。こ

のようなR T Kアイソフォームは癌、眼疾患、および関節リウマチなどの疾患における抗血管形成治療を含めた、T i e / T e k受容体が関連するとされている疾患および状態の治療に用いることができる。T I E / T E Kアイソフォームを用いて治療することができる他の疾患および状態には、関節炎、リウマチ、および乾癬などの炎症性疾患、良性腫瘍および新生物発生前の状態、心血管形成、血友病性関節、強皮症、血管癒着、アテローム硬化斑血管新生、毛細血管拡張、および創傷肉芽形成が含まれる。T E K受容体アイソフォームのさらなる標的には、T E Kが過剰発現される疾患、たとえば慢性骨髄白血病が含まれる。

【0337】

a. T i e - 1

T i e - 1は、血管の成熟および安定化に必要であると考えられている血管発生および血管形成において重要な役割を果たす受容体チロシンキナーゼである。また、T i e - 1は、抗アポトーシス性の生存シグナルとしても作用する。T i e - 1の発現は内皮細胞および血管新生に関連しており、関連の受容体T E Kと物理的に会合する。T i e - 1は、様々な腫瘍ならびに肺および乳房を含めた転移中においても発現され、また、甲状腺の腫瘍化にも関与している。T i e - 1は、創傷治癒の間に強力に誘発される。T i e - 1の活性化を司っているリガンドは依然として同定されていない。

【0338】

配列番号279として記載したT i e - 1受容体（配列番号279として記載したG e n B a n k 番号N P _ 0 0 5 4 1 5）は、アミノ酸139～197およびアミノ酸365～428の2つの免疫グロブリンドメイン、アミノ酸224～255のE G Fドメイン、アミノ酸231～272のラミニンE G F様ドメイン、3つのフィブロネクチンI I I型ドメイン（アミノ酸446～533の、アミノ酸546～632、およびアミノ酸644～729）、アミノ酸764～786の膜貫通ドメイン、ならびに839～1107の細胞質タンパク質キナーゼドメインによって特徴づけられている。

【0339】

T i e - 1タンパク質には、T i e - 1の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号279と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、T i e - 1の免疫グロブリンドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばAがTで置き換えられていることができる位置142（S N P 番号11545380）において、一塩基多型（S N P）を含んでいることができる。また、アミノ酸の変異は、たとえばRがCで置き換えられている位置1109（S N P 番号6698998）においても起こることができる。上述の1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的なT i e - 1対立遺伝子変異体を、配列番号310として記載した。

【0340】

例示的なT i e - 1アイソフォームは、配列番号279に記載のものなどの同族T i e - 1と比較して、1つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。たとえば、本明細書中に提供する例示的なT i e - 1アイソフォームは、膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いている。このような例示的なT i e - 1アイソフォームには、配列番号113、135、137、139、141、143および222に記載のT i e - 1アイソフォームが含まれる。これらのアイソフォームは、T i e - 1受容体の他のドメインを含む。配列番号113および222として記載した例示的なT i e - 1アイソフォームは、アミノ酸139～197およびアミノ酸365～428の2つの免疫グロブリンドメイン、アミノ酸224～255のE G Fドメイン、アミノ酸231～272のラミニンE G F様ドメイン、ならびに3つのフィブロネクチンI I I型ドメイン（アミノ酸446～533の、アミノ酸546～632、およびアミノ酸644～729）によって特徴づけられている。配列番号137、141および143として記載した例示的なT i e - 1アイソフォームは、アミノ酸139～197の免疫グロブリンドメイン、アミノ酸224～255のE G Fドメインならびにアミノ酸231～272のラミニンE G F様

ドメインを含む。配列番号 135 および 139 として記載した例示的な Tie-1 アイソフォームは、免疫グロブリンドメインの少なくとも一部分を含む。

【0341】

本明細書中の Tie-1 アイソフォームを含めた Tie-1 アイソフォームは、Tie-1 ポリペプチド中に対立遺伝子変異を含んでいることができる。たとえば、Tie-1 アイソフォームは、同族 Tie-1 受容体（たとえば配列番号 279）と比較して、1つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。一例では、Tie-1 アイソフォームには、配列番号 310 に記載の 1つまたは複数の対立遺伝子変異が含まれる。たとえば、Tie-1 アイソフォームの対立遺伝子変異体は、位置 142 など、免疫グロブリンドメイン中にアミノ酸の変化を含んでいることができる。

10

【0342】

b. Tie-2 (TEK)

Tie-2/TEK に対する既知のリガンドには、アンジオポイエチン (Ang)-1 および Ang-2。これらの RTK は、胚の血管構造の発生において重要な役割を果たし、成人の内皮細胞中で発現され続ける。Tie-2/TEK は、血管内皮中でほぼ排他的に発現される RTK である。Tie-2/TEK の発現は、胚の血管構造の発生に重要である。Tie-2/TEK の過剰発現および/または突然変異は、病理性血管形成、したがって腫瘍増殖、ならびに骨髄白血病に関連づけられている。

【0343】

Tie-2/TEK タンパク質（配列番号 278 として記載した GenBank 番号 NP_000450）は、アミノ酸 219～268 のラミニン EGF 様ドメイン、3つのフィブロネクチン III 型ドメイン（アミノ酸 444～529 の、アミノ酸 543～626、およびアミノ酸 639～724）、アミノ酸 748～770 の膜貫通ドメイン、ならびにアミノ酸 824～1092 の細胞質タンパク質キナーゼドメインによって特徴づけられている。

20

【0344】

TEK タンパク質には、TEK の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号 278 と比較して 1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、TEK のフィブロネクチン III 型ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえば V が I で置き換えられていることができる位置 486（SNP 番号 1334811）、またはたとえば I が T で置き換えられていることができる位置 695、またはたとえば A が T で置き換えられていることができる位置 724（SNP 番号 4631561）において、一塩基多型（SNP）を含んでいることができる。また、対立遺伝子変異体は、TEK のプロテインキナーゼドメイン中でも起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえば R が W で置き換えられていることができる位置 849 において、アミノ酸を含んでいることができる。また、アミノ酸の変異は、たとえば P が Q で置き換えられていることができる位置 346 においても起こることができる。一例では、対立遺伝子変異体には、配列番号 278 と比較して 1つまたは複数のアミノ酸の変化が含まれ、変異体は生物活性に変化を示す。対立遺伝子変異体は、たとえば受容体の野生型または優性型の文脈では、疾患または状態に関連していることができる。たとえば、位置 849 など、TEK 受容体のキナーゼドメイン中に起こるアミノ酸の変化は、TEK の活性の増加による血管の異常形態形成に関連していることができる。上述の 1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的な TEK 対立遺伝子変異体を、配列番号 309 として記載した。

30

40

【0345】

例示的な Tie-2/TEK アイソフォームは、配列番号 278 に記載のものなどの同族 TEK と比較して、1つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。たとえば、配列番号 104、105、112、131 および 133 に記載の例示的な TEK アイソフォームは、膜貫通ドメインおよびキナーゼドメインを欠いている。Tie-2/TEK アイソフォームは、Tie-2/TEK 同族受容体の他のドメインを含んでいることが

50

できる。配列番号104として記載した例示的なTEKアイソフォームは、アミノ酸219～268のラミニンEGF様ドメインならびにアミノ酸401～486、アミノ酸500～580、およびアミノ酸593～678の3つのフィブロネクチンIII型ドメインを含む。配列番号105として記載した例示的なTEKアイソフォームは、アミノ酸219～268のラミニンEGF様ドメインならびにアミノ酸444～529、アミノ酸543～623、およびアミノ酸636～721の3つのフィブロネクチンIII型ドメインを含む。配列番号112として記載した例示的なTEKアイソフォームは、アミノ酸196～245のラミニンEGF様ドメインならびにアミノ酸378～463、アミノ酸477～557、およびアミノ酸570～655の3つのフィブロネクチンIII型ドメインを含む。配列番号131として記載した例示的なTEKアイソフォームは、アミノ酸219～268のラミニンEGF様ドメインを含むが、3つのフィブロネクチンIII型ドメインが欠失している。配列番号133として記載した例示的なTEKアイソフォームは、アミノ酸219～268のラミニンEGF様ドメインおよびアミノ酸444～497のフィブロネクチンIII型ドメインの一部を含む。

10

【0346】

本明細書中のTEKアイソフォームを含めたTEKアイソフォームは、TEKポリペプチド中に対立遺伝子変異を含んでいることができる。たとえば、TEKアイソフォームは、対立遺伝子変異体中に存在する1つまたは複数のアミノ酸の差異を含んでいることができる。一例では、TEKアイソフォームには、配列番号309に記載の1つまたは複数の対立遺伝子変異が含まれる。対立遺伝子変異体は、位置486または695などで、フィブロネクチンIII型ドメイン中に1つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。また、対立遺伝子変異体は、位置346などで、1つまたは複数のアミノ酸の変化を含んでいることができる。

20

【0347】

9. 腫瘍壊死因子受容体 (TNFR)

TNF (腫瘍壊死因子) リガンドおよび受容体ファミリーは、細胞の分化、活性化、および生存度に関与するものなどを含めた様々なシグナル伝達経路を調節する。TNFRは、特徴的な反復性かつ細胞外のシステインに富んだモチーフおよびTNFRファミリーのメンバー間で異なる可変性の細胞内ドメインを有する。TNFR受容体ファミリーには、それだけには限定されないが、TNFR1、TNFR2、TNFRrp、低親和性の神経成長因子受容体、Fas抗原、CD40、CD27、CD30、4-1BB、OX40、DR3、DR4、DR5、およびヘルペスウイルス侵入媒介物質 (HVEM) が含まれる。TNFRに対するリガンドには、TNF- α 、リンフォトキシン、神経成長因子、Fasリガンド、CD40リガンド、CD27リガンド、CD30リガンド、4-1BBリガンド、OX40リガンド、APO3リガンド、TRAILおよびLIGHTが含まれる。TNFRには、シグナル伝達に関与する、リガンド結合ドメインを含めた細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインが含まれる。さらに、TNFRは、典型的には細胞表面で三量体化する三量体タンパク質である。三量体化は、TNFRの生物活性に重要である。

30

【0348】

TNFは、炎症性疾患および感染症において主要な役割を果たす。TNFは、細胞表面上で発現された場合に細胞内シグナルを伝達することができる2つの受容体であるTNFR1およびTNFR2に結合する。TNFR1は、細胞アポトーシス、細胞毒性、線維芽細胞増殖、プロスタグランジンE2の合成およびクラミジア耐性に関与する生物学的シグナル伝達の主要な媒介物質である。TNFR2は、サーモサイト (thermocytte) の増殖、単核細胞に対するTNF依存性の増殖性応答、GM-CSF分泌の誘導、初期造血の阻害、およびアポトーシスの誘導による活性化したT細胞のダウンレギュレーションに関与している。TNFR1およびTNFR2も、可溶性の形態として、タンパク質分解的切断によって産生される (sTNFR)。TNFRレベルの上昇が炎症性疾患および感染症で見つかっている。

40

50

【0349】

TNF/TNFRは、多くのウイルスの標的である。ウイルスは、TNFなどの宿主サイトカインに結合してそれを隔離し、これにより、ウイルスが免疫系を逃れることが可能となる。多くのウイルスが、TNFに結合することによってTNFRを模倣するタンパク質、またはTNFRのウイルス相同体であるタンパク質をコードしている。ウイルスは、TNFの遺伝子活性および／または発現アップレギュレーションし、TNF/TNFRの効果を変調し、TNFRに結合することができる。本明細書中に記載のものなどのTNFRアイソフォームは、ウイルスTNFR相同体および模倣体を含めたTNFRを変調するために用いることができる。TNF/TNFRと相互作用し、TNFRアイソフォームの標的であるウイルスの例には、それだけには限定されないが、粘液腫ウイルス、ワクシニアウイルス、タナポックスウイルス、エプスタインバーウイルス、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス サイミリ、B型肝炎ウイルス、アフリカブタ熱ウイルスおよびパロウイルスを含めたDNAウイルス、ならびにヒト免疫不全ウイルス(HIV)、C型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、デングウイルスおよびエボラウイルスを含めたRNAウイルスが含まれる(たとえばHerbein他(2000)Proc Soc Exp Biol Med、223(3):241~57参照)。例示的なTNFRアイソフォームには、配列番号95に記載のものなどの、TNFR1のアイソフォームが含まれる。

10

【0350】

20

a. TNFR1

配列番号280として記載した例示的なTNFR1ポリペプチド(GenBank番号NP_001056)は、3つのTNFRc6ドメイン(アミノ酸44~81、アミノ酸84~125、およびアミノ酸127~166)、アミノ酸212~234の膜貫通ドメイン、ならびに細胞質テイル内のアミノ酸357~441のデスドメインによって特徴づけられている。TNFRc6ドメインとは、6つの保存されたシステインを含む反復に細分することができる、N末端領域のシステインに富んだドメインであり、これらのすべてが鎖間ジスルフィド結合に関与している。デスドメインはTNFR1受容体ファミリーに特徴的であり、アポトーシスの開始ならびにリガンド結合におけるNF-κBおよび他のシグナル伝達経路に関与している。

30

【0351】

TNFR1ポリペプチドには、TNFR1の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号280と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、TNFR2のc6ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばPがIで置き換えられていることができる位置75(SNP番号4149637)、またはたとえばRがQで置き換えられていることができる位置121(SNP番号4149584)において、一塩基多型(SNP)を含んでいることができる。また、アミノ酸の変異は、たとえばPがTで置き換えられていることができる位置305においても起こることができる。上述の1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的なTNFR1対立遺伝子変異体を、配列番号311として記載した。

40

【0352】

b. TNFR2

TNFR2(配列番号281として記載したGenBank番号NP_001057)は、アミノ酸40~75、アミノ酸78~118およびアミノ酸120~161の3つのTNFRc6ドメインならびにアミノ酸258~280の膜貫通ドメインによって特徴づけられている。TNFR2タンパク質には、TNFR2の対立遺伝子変異体が含まれる。一例では、対立遺伝子変異体は、配列番号281と比較して1つまたは複数のアミノ酸の変化を含む。たとえば、1つまたは複数のアミノ酸の変異は、膜貫通ドメイン中で起こることができる。対立遺伝子変異体は、たとえばQがRで置き換えられていることができる

50

位置 2 9 5 (SNP 番号 5 7 4 6 0 3 2) で、一塩基多型を含んでいることができる。また、アミノ酸の変異は、たとえば V が M で置き換えられていることができる位置 1 8 7 (SNP 番号 5 7 4 6 0 2 5)、またはたとえば M が R で置き換えられていることができる位置 1 9 6 (SNP 番号 1 0 6 1 6 2 2)、またはたとえば E が K で置き換えられていることができる位置 2 3 2 (SNP 番号 5 7 4 6 0 2 6)、またはたとえば A が T で置き換えられていることができる位置 2 3 6 (SNP 番号 5 7 4 6 0 2 7)、またはたとえば L が P で置き換えられていることができる位置 2 6 4 (SNP 番号 5 7 4 6 0 3 1) においても起こることができる。一例では、対立遺伝子変異体には、配列番号 2 8 1 と比較して 1 つまたは複数のアミノ酸の変化が含まれ、変異体は生物活性に変化を示す。対立遺伝子変異体は、たとえば受容体の野生型または優性型の文脈では、疾患または状態に関連していることができる。たとえば、位置 1 9 6 で起こるアミノ酸の変化は、たとえば、関節リウマチおよび急性移植片対宿主疾患などの自己免疫疾患ならびに多嚢胞性卵巣症候群および高アンドロゲン症に関連する疾患に関連していることができる。上述の 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含む例示的な TNFR2 対立遺伝子変異体を、配列番号 3 1 2 として記載した。

10

【0353】

例示的な TNFR2 アイソフォームは、配列番号 2 8 1 に記載のものなどの同族 TNFR2 と比較して、1 つもしくは複数のドメインまたはその一部を欠いている。配列番号 9 5 として記載した例示的な TNFR2 アイソフォームは、膜貫通ドメインを欠いている。さらに、このアイソフォームは、アミノ酸 4 0 ~ 7 5 およびアミノ酸 7 8 ~ 1 1 8 の TNFRc6 ドメインならびにアミノ酸 1 2 0 ~ 1 5 2 の第 3 の c6 ドメインの一部分によって特徴づけられている。

20

【0354】

G. CSR アイソフォームをコードしている核酸の産生方法および CSR アイソフォームポリペプチドの産生方法

CSR アイソフォームの核酸分子およびポリペプチドを作製するための例示的な方法を、本明細書中に提供する。このような方法には、PCR、合成遺伝子構築ならびに単離および／または合成した核酸断片の *in vitro* ライゲーションなどの、核酸分子の *in vitro* 合成方法が含まれる。また、CSR アイソフォーム核酸分子は、細胞から単離した RNA および DNA の PCR ならびにハイブリダイゼーションおよび／または発現スクリーニング方法による核酸分子ライブラリのスクリーニングを含めたクローニング方法によっても単離することができる。

30

【0355】

CSR アイソフォームポリペプチドは、*in vitro* および *in vivo* の合成方法を用いて CSR アイソフォーム核酸分子から作製することができる。CSR アイソフォームは、投与ならびに治療に必要なアイソフォームの所要の量および形態を産生することに適した、任意の生物中で発現させることができる。発現用宿主には、大腸菌、酵母、植物、昆虫細胞、ヒト細胞系およびトランスジェニック動物を含めた哺乳動物細胞などの原核生物ならびに真核生物が含まれる。また、CSR アイソフォームは、アイソフォームが組換えによって産生される細胞および生物、ならびにアイソフォームが選択的スプライシング現象によって産生されたゲノムにコードされたアイソフォームなどの組換え手段なしで合成される細胞および生物を含めた、それが発現される細胞および生物から単離することができる。

40

【0356】

1. 合成遺伝子およびポリペプチド

CSR アイソフォーム核酸分子およびポリペプチドは、合成遺伝子の合成を用いた、当業者に知られている方法によって合成することができる。このような方法では、アイソフォームをコードしている 1 つまたは複数の核酸分子を作製するために CSR アイソフォームのポリペプチドを「逆翻訳」する。その後、逆翻訳された核酸分子を、自動 DNA 合成技法などを用いて 1 つまたは複数の DNA 断片として合成する。その後、断片を動作可能

50

に連結させて、アイソフォームをコードしている核酸分子を形成する。また、核酸分子を、ベクター、転写および翻訳を調節するための調節配列ならびに他のポリペプチドをコードしている核酸分子などのさらなる核酸分子と結合させることもできる。また、アイソフォームをコードしている核酸分子は、放射標識を含めた追跡などのための標識、および蛍光部分と結合させることもできる。

【0357】

逆翻訳のプロセスでは、CSRアイソフォームなどの任意の目的ポリペプチドのヌクレオチド遺伝子配列を得るために遺伝暗号を用いる。遺伝暗号は縮重しており、64種のコドンが20個のアミノ酸および3個のストップコドンを特定する。このような縮重により核酸の設計および作製における柔軟性が可能となり、これにより、たとえば、核酸断片の連結およびそれぞれの合成断片内における独特の識別配列の配置を容易にするための、制限部位の付加が可能となる。また、遺伝暗号の縮重は、望ましくない制限部位、スプライシングドナーもしくはアクセプター部位、または効率的な翻訳に有害な可能性のある他のヌクレオチド配列を含めた、望ましくないヌクレオチド配列を回避するための核酸分子の設計も可能にする。さらに、生物は、場合によっては、特定のコドン使用頻度および／または確定したGC対ATヌクレオチドの比を好む。したがって、遺伝暗号の縮重により、特定の生物または生物群中での発現用にあつらえられた核酸分子の設計が可能となる。さらに、核酸分子は、配列の最適化（または非最適化）に基づいて、様々な発現レベル用に設計することができる。逆翻訳は、ポリペプチドをコードしているコドンを選択することによって行われる。このようなプロセスは、遺伝暗号の表およびポリペプチドを用いて、手動で行うことができる。あるいは、公的に利用可能なソフトウェアを含めたコンピュータプログラムを用いて、逆翻訳された核酸配列を作製することができる。

【0358】

逆翻訳された核酸分子を合成するためには、核酸合成のための当分野で利用可能な任意の方法を用いることができる。たとえば、CSRアイソフォームをコードしているヌクレオチド配列の断片に対応する個々のオリゴヌクレオチドを標準の自動方法によって合成し、アニーリングまたはハイブリダイゼーション反応中で混合する。このようなアニーリングによって合成されたこのようなオリゴヌクレオチドは、長さが一般に約100個のヌクレオチドである二重鎖を形成する相補配列上に形成された重複する一本鎖突出部を用いて、オリゴヌクレオチド由来の遺伝子の自己アセンブリをもたらす。二重鎖DNA中の一本のヌクレオチド「切れ目」は、ライゲーション、たとえばバクテリオファージT4 DNAリガーゼを用いたライゲーションを用いて閉じられる。その後、たとえば制限エンドヌクレアーゼリンカー配列を用いて、合成遺伝子をタンパク質の発現に適した様々な組換えDNAベクターのうちの任意の1つに挿入することができる。別の類似の方法では、一連の重複オリゴヌクレオチドは化学的なオリゴヌクレオチド合成方法によって調製する。これらのオリゴヌクレオチドのアニーリングは、ギャップを含むDNA構造をもたらす。DNAポリメラーゼIなどの酵素によって触媒されるDNA合成を用いてこれらのギャップを埋めることができ、二重鎖構造中に切れ目が存在する場合はライゲーションを用いてそれをすべて閉じる。PCRおよび／または他のDNA増幅技術を適用して、形成された直鎖状DNA二重鎖を増幅することができる。

【0359】

さらなるヌクレオチド配列は、ベクター、たとえばタンパク質発現ベクターまたはコアタンパク質をコードしているDNA配列を増幅するために設計されたベクター内にクローニングするために制限エンドヌクレアーゼ部位を含むリンカー配列を含めて、CSRアイソフォームをコードしている核酸分子と結合することができる。さらに、機能的DNA要素を特定するさらなるヌクレオチド配列を、アイソフォームをコードしている核酸分子に動作可能に連結させることができる。このような配列の例には、それだけには限定されないが、細胞内でのタンパク質の発現を促進するために設計されたプロモーター配列、およびタンパク質の分泌を促進するために設計された分泌配列が含まれる。また、タンパク質の結合領域を特定する配列などのさらなるヌクレオチド配列も、アイソフォームをコード

している核酸分子に連結させることができる。このような領域には、それだけには限定されないが、特異的標的細胞内へのアイソフォームの取込みを促進するための配列、または他の様式で合成遺伝子の薬物動態学を亢進する配列が含まれる。

【0360】

また、CSRアイソフォームは、自動化された合成ポリペプチドの合成を用いて合成することもできる。クローニングしたおよび／または *in silico* で作製したポリペプチドは、断片として合成し、その後化学的に連結させることができる。あるいは、アイソフォームを単一のポリペプチドとして合成することができる。その後、このようなポリペプチドを、本明細書中に記載のアッセイおよび治療的投与において用いることができる。

10

【0361】

2. CSRアイソフォームのクローニングおよび単離方法

CSRアイソフォームは、核酸分子クローニングおよび単離するための当分野で知られている任意の利用可能な方法を用いて、クローニングまたは単離することができる。このような方法には、核酸のPCR増幅、ならびに核酸ハイブリダイゼーションスクリーニング、抗体系スクリーニングおよび活性系スクリーニングを含めた、ライブラリのスクリーニングが含まれる。

【0362】

核酸の増幅方法を用いてアイソフォームコードしている核酸分子を単離することができる、たとえばポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 方法が含まれる。材料を含む核酸を出発物質として用いることができ、これから、アイソフォームをコードしている核酸分子を単離することができる。たとえば、DNAおよびmRNA調製物、細胞抽出物、組織抽出物、流体試料 (たとえば血液、血清、唾液)、健康な対象および／または疾患状態の対象由来の試料を、増幅方法で用いることができる。また、核酸ライブラリを出発物質源として用いることもできる。アイソフォームを増幅するためにプライマーを設計することができる。たとえば、それからアイソフォームが作製される発現された配列に基づいて、プライマーを設計することができる。プライマーは、アイソフォームのアミノ酸配列の逆翻訳に基づいて設計することができる。増幅によって作製した核酸分子は、配列決定を行って、アイソフォームをコードしていることを確認することができる。

20

【0363】

また、アイソフォームをコードしている核酸分子は、ライブラリのスクリーニングを用いて単離することもできる。たとえば、発現されたRNA転写物をcDNA分子として表す核酸ライブラリを、CSRアイソフォームをコードしている核酸分子またはその一部分とのハイブリダイゼーションによってスクリーニングすることができる。たとえば、CSR遺伝子由来のイントロン配列またはその一部分を用いて、相同配列へのハイブリダイゼーションに基づいて、イントロン保持を含む分子のスクリーニングを行うことができる。発現ライブラリのスクリーニングを用いて、CSRアイソフォームをコードしている核酸分子を単離することができる。たとえば、特異的アイソフォームまたはアイソフォームの一部分を認識する抗体を用いて、発現ライブラリのスクリーニングを行うことができる。CSRアイソフォームまたはアイソフォームに含まれる領域もしくはペプチドに特異的に結合する抗体を、得るおよび／または調製することができる。アイソフォームに特異的に結合する抗体を用いて、イントロン融合タンパク質などのアイソフォームをコードしている核酸分子を含む発現ライブラリのスクリーニングを行うことができる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体ならびにそれら由来の断片を含めた抗体の調製および単離方法は、当分野で周知である。組換え抗体および合成抗体の調製および単離方法も、当分野で周知である。たとえば、このような抗体は、固相ペプチド合成を用いて構築するか、またはヌクレオチドおよび候補ポリペプチドに特異的に結合する抗体の抗原結合部位のアミノ酸配列情報を用いて、組換えによって産生することができる。また、抗体は、可変重鎖および可変軽鎖、またはその抗原結合部分を含むコンビナトリアルライブラリのスクリーニングを行うことによっても得ることができる。ポリクローナル、モノクローナルおよ

30

40

50

び非天然の抗体の調製、単離ならびに使用方法は、たとえば、KontermannおよびDubel編（2001）「Antibody Engineering（抗体工学）」Springer Verlag；HowardおよびBethell編（2001）「Basic Methods in Antibody Production and Characterization（抗体の産生および特徴づけの基本的な方法）」CRC Press；ならびにO'BrienおよびAitkin編（2001）「Antibody Phage Display（抗体ファージディスプレイ）」Humana Pressに総説されている。また、このような抗体は、アイソフォームポリペプチドが存在するかどうかのスクリーニング、たとえば細胞、組織または抽出物中におけるCSRアイソフォームの発現の検出に用いることもできる。

10

【0364】

3. 合成アイソフォーム

アイソフォームの様々な合成型を提供する。それらには、とりわけ、アイソフォームまたはイントロンにコードされたその一部分が、直接もしくはリンカーを介して標的化剤などの別の薬剤に、またはCSRの活性が変調されるようにイントロンにコードされた部分もしくはアイソフォーム部分をCSRに提示または提供する分子に連結されているコンジュゲートが含まれる。他の合成型には、細胞外ドメイン部分およびイントロンにコードされた部分などのC末端部分が異なるアイソフォーム由来であるキメラが含まれる。また、ペプチド主鎖中の1つもしくは複数の結合がバイオイソスターまたは他の結合で置き換えられており、その結果生じるポリペプチドのペプチド模倣体が、改変されていない形態と比較してプロテアーゼ耐性などの特性が改善されている、「ペプチド模倣体」アイソフォームも提供する。

20

【0365】

a. アイソフォームコンジュゲート

また、CSRアイソフォームは、アイソフォームと別の薬剤とのコンジュゲートとして提供することもできる。コンジュゲートは、アイソフォームが相互作用する受容体および／またはアイソフォームを送達するための別の標的受容体を標的とするために用いることができる。このようなコンジュゲートには、CSRアイソフォームと標的薬剤および／または標的化剤との連結が含まれる。コンジュゲートは、化学的コンジュゲート形成を含めた任意の適切な方法によって、または、たとえば、リンカー領域を有するもしくは有さない、標的薬剤もしくは標的化剤をコードしているDNAが、RTKアイソフォームをコードしているDNAに動作可能に連結している融合タンパク質の発現によって、産生することができる。また、コンジュゲートは、化学的カップリングによって、典型的には成分中に存在するもしくは付加したシステイン残基間のジスルフィド結合によって、またはアミド結合もしくは他の適切な結合によって、産生することもできる。イオン結合または他の結合も企図される。

30

【0366】

CSRアイソフォームコンジュゲートを含む薬剤組成物を調製することができ、治療上有効な量のコンジュゲートを、たとえば生理的に許容される賦形剤中で投与することによって治療を行うことができる。また、CSRアイソフォームコンジュゲートは、CSRアイソフォームコンジュゲートを融合タンパク質としてコードしている核酸を含むベクターを送達することなどによるin vivo治療方法において用いることもできる。

40

【0367】

コンジュゲートは、直接またはリンカーを介して1つもしくは複数の標的薬剤に連結された、1つもしくは複数のCSRアイソフォームを含んでいることができる：（CSRアイソフォーム）n、（L）q、（標的薬剤）m；ここで、少なくとも1つのCSRアイソフォームは、直接または1つもしくは複数のリンカー（L）を介して少なくとも1つの標的薬剤に連結されている。また、このようなコンジュゲートは、治療用の標的細胞種などの標的に結合するために十分な、CSRアイソフォームの任意の一部分を用いて産生することもできる。コンジュゲートの要素間の任意の適切な会合、ならびに任意数の要素（た

50

だし、 n および m は1を超える整数であり、 q は0もしくは1を超える任意の整数である)が、その結果生じるコンジュゲートが標的としたCSRまたは標的細胞種と相互作用する限り、企図される。

【0368】

標的薬剤の例には、薬物、ならびに細胞表面においてまたは細胞表面を介して作用する毒素および細胞内で作用する毒素などの他の細胞毒性分子が含まれる。このような部分の例には、CSRアイソフォームとカップリングさせた場合に標的とすることができる、放射性核種、崩壊してたとえば電離 α 粒子もしくは β 粒子、またはX線もしくは γ 線を発する放射性原子が含まれる。他の例には、アイソフォームとカップリングさせることによって標的とすることができる化学療法剤が含まれる。たとえば、ゲルダナマイシンはプロテオソームを標的とする。アイソフォーム-ゲルダナマイシン分子を細胞内プロテオソームに向けさせ、標的アイソフォームを分解してプロテオソームの位置でゲルダナマイシンを遊離させることができる。他の毒性分子には、リシン、サポリンおよび巻貝または軟体動物門の他のメンバー由来の天然産物などの毒素が含まれる。標的薬剤とのコンジュゲートの別例は、たとえばタンパク質融合として抗体または抗体断片とカップリングされたCSRアイソフォームである。たとえば、好中球、天然キラー細胞、およびマクロファージにおいてキラーT細胞活性を誘導するために、アイソフォームを、特異的細胞表面マーカーに結合する抗体のFc断片とカップリングさせることができる。様々な毒素が当業者に周知である。

【0369】

コンジュゲートは、直接またはリンカーを介して1つもしくは複数の標的化剤に連結された、1つもしくは複数のCSRアイソフォームを含んでいることができる：(CSRアイソフォーム) n 、(L) q 、および(標的化剤) m ；ここで、少なくとも1つのCSRアイソフォームは、直接または1つもしくは複数のリンカー(L)を介して少なくとも1つの標的化剤に連結されている。コンジュゲートの要素間の任意の適切な会合、ならびに任意数の要素(ただし、 n および m は1を超える整数であり、 q は0もしくは1を超える任意の整数である)が、その結果生じるコンジュゲートが標的細胞種などの標的と相互作用する限り、企図される。

【0370】

標的化剤には、CSRアイソフォームを、標的、たとえば特定の組織または細胞種または器官の標的とする、任意の分子が含まれる。標的化剤の例には、細胞表面抗原、細胞表面受容体、タンパク質、脂質、ならびに細胞表面上または細胞膜内の炭水化物部分、細胞表面上でプロセッシングされた分子、分泌された分子および他の細胞外分子が含まれる。標的化剤として有用な分子には、それだけには限定されないが、有機化合物；無機化合物；金属錯体；受容体；酵素；抗体；タンパク質；核酸；ペプチド核酸；DNA；RNA；ポリヌクレオチド；オリゴヌクレオチド；オリゴ糖；脂質；リボタンパク質；アミノ酸；ペプチド；ポリペプチド；ペプチド模倣体；炭水化物；補因子；薬物；プロドラッグ；レクチン；糖；糖タンパク質；生体分子；巨大分子；バイオポリマー；ポリマー；および他のそのような生体物質が含まれる。標的化剤として有用な例示的な分子には、タンパク質性リガンドおよび小分子リガンドなどの受容体に対するリガンド、ならびに抗原結合タンパク質などの抗体および結合タンパク質が含まれる。

【0371】

あるいは、特定の受容体(または複数の受容体)と特異的に相互作用するCSRアイソフォームが標的化剤であり、これが毒素、薬物または核酸分子などの標的薬剤に連結されている。核酸分子は、標的細胞中で転写および／もしくは翻訳されることができるか、または調節核酸分子であることができる。

【0372】

CSRは、標的薬剤(もしくは標的化剤)に直接、またはリンカーを介して連結させることができる。リンカーにはペプチドリinkerおよび非ペプチドリinkerが含まれ、標的薬剤もしくは標的化剤がCSRアイソフォームに接近していることによって引き起こされ

10

20

30

40

50

る立体障害を軽減または低下させるため、および／あるいは特異性、毒性、溶解度、血清安定性および／もしくは細胞内利用能などのコンジュゲートの他の特性を増大または変更させるため、および／あるいはCSRアイソフォームと標的薬剤または標的化剤との結合の柔軟性を増加させるためなどの機能性について選択することができる。リンカーおよびコンジュゲート形成方法の例は当分野で知られている（たとえば国際公開第00/04926号パンフレット参照）。また、CSRはリボソームおよびカプセル封入された分子または包括した分子の送達を指示する他のそのような部分を用いて、標的とすることもできる。

【0373】

b. キメラおよび合成イントロン融合ポリペプチド

また、キメラおよび合成イントロン融合ポリペプチドも提供する。これらは、生じる分子が、炎症反応、血管形成、血管新生および／または細胞増殖に関与する経路に関わる任意のものを含めたCSR、具体的にはRTKの活性を変調するようにN末端で別のポリペプチドまたは他の分子に動作可能に連結したイントロン融合ポリペプチド由来のイントロンを含む。これらの合成「ポリペプチド」には、とりわけ、CSRの細胞外ドメイン由来のN末端がヘルスタチンのイントロン8（たとえば配列番号320～359参照）などのイントロン融合タンパク質のイントロンに連結されている、キメライントロン融合ポリペプチドが含まれる。例示的なヘルスタチンを配列番号320～359に記載した。以下の表3Aに配列を明らかにする。他のヘルスタチン変異体には、対立遺伝子変異体、特に細胞外ドメイン部分内に変異を有するものが含まれる。

【0374】

10

20

【表 3】

表3A

変異体	コードされた イントロン8	配列 番号 (ヌクレ オチド)	配列 番号 (アミノ 酸)
ヘルスタチン突出	AA: 341-419		320
イントロン8突出－瓶中の分子 (molecule in a bottle)			321
ヘルスタチン変異体 (AA342: Thr又はSer)	AA: 341-419		322
ヘルスタチン変異体 (AA345: Leu又はPro)	AA: 341-419		323
ヘルスタチン変異体 (AA346: Pro又はLeu)	AA: 341-419		324
ヘルスタチン変異体 (AA356: Leu又はGln)	AA: 341-419		325
ヘルスタチン変異体 (AA358: Met又はLeu)	AA: 341-419		326
ヘルスタチン変異体 (AA361: Gly、Asp、Ala、又はVal)	AA: 341-419		327
ヘルスタチン変異体 (AA376: Leu又はIle)	AA: 341-419		328
ヘルスタチン変異体 (AA394: Pro又はArg)	AA: 341-419		329
ヘルスタチン変異体 (AA404: Pro又はLeu)	AA: 341-419		330
ヘルスタチン変異体 (AA413: Asp又はAsn)	AA: 341-419		331
ヘルスタチン変異体 (AA357: Arg又はCys)	AA: 341-419		332
ヘルスタチン変異体 (AA371: Arg又はIle)	AA: 341-419		333
イントロン8変異体 (AA2: Thr又はSer)			334
イントロン8変異体 (AA5: Leu又はPro)			335
イントロン8変異体 (AA6: Pro又はLeu)			336
イントロン8変異体 (AA16: Leu又はGln)			337
イントロン8変異体 (AA18: Met又はLeu)			338
イントロン8変異体 (AA21: Gly、Asp、Ala、又はVal)			339
イントロン8変異体 (AA36: Leu又はIle)			340
イントロン8変異体 (AA54: Pro又はArg)			341
イントロン8変異体 (AA64: Pro又はLeu)			342
イントロン8変異体 (AA73: Asp又はAsn)			343
イントロン8変異体 (AA17: Arg又はCys)			344
イントロン8変異体 (AA31: Arg又はIle)			345
イントロン8突出－瓶中の分子		346	
イントロン8変異体 (nt4:n=T)		347	
イントロン8変異体 (nt14:n=C)		348	
イントロン8変異体 (nt17:n=T)		349	
イントロン8変異体 (nt47=A)		350	
イントロン8変異体 (nt54=A)		351	
イントロン8変異体 (nt62:n=C、T、A)		352	
イントロン8変異体 (nt106=A)		353	
イントロン8変異体 (nt161=G)		354	
イントロン8変異体 (nt191:n=T)		355	
イントロン8変異体 (nt217:C)		356	
イントロン8変異体 (nt17:n=Tおよびnt217:n=C)		357	
イントロン8変異体 (nt49:n=T)		358	
イントロン8変異体 (nt92:n=T)		359	

【0375】

N末端部分は、直接またはポリペプチドリンカーもしくは化学的リンカーなどのリンカーを介して、合成イントロン融合タンパク質のC末端（イントロンにコードされた部分）に連結させることができる。連結は、リンカーが存在しない場合またはリンカーがポリペ

プチドである場合は、融合タンパク質の組換え発現によって行うことができる。化学合成を用いることもできる。リンカーがポリペプチドでない場合は、化学的に連結させることができる。

【0376】

任意の適切なリンカーは、その結果生じる分子がCSRと相互作用し、その活性を変調する、典型的には阻害するように選択することができる。リンカーは、血清安定性、溶解度および／または細胞内濃度を上昇させるため、ならびに1つまたは複数のリンカーがN末端部分とイントロンにコードされた部分との間に挿入された場合の接近によって引き起こされる立体障害を低減させるためなどの、望ましい特性を付加するように選択することができる。その結果生じる分子は、炎症反応、血管新生、血管形成および細胞増殖に関与する経路に関わる任意のものを含めたCSR、特にRTKの活性を変調する能力を保持するように、設計または選択される。

10

【0377】

リンカーには、連結された部分の柔軟性または溶解度を増大させるペプチドおよび化学的リンカーなどの、化学的リンカーならびにペプチドリリンカーが含まれる。たとえば、リンカーは、以下に記載したものなどのヘテロ二官能性試薬を用いて挿入するか、または、ポリペプチドリリンカーをコードしているDNAを、N末端（および／またはC末端部分）をコードしているDNAに連結させて、その結果生じるキメラを発現させることによって連結させることができる。さらに、リンカーが存在しない場合は、N末端を直接、イントロンにコードされた部分に連結させることができる。一部の実施形態では、N末端部分を、イントロンにコードされた部分が受容体の活性と相互作用してそれを変調することを可能にする十分な立体障害およびかさをもたらす、非ペプチド部分で置き換えることができる。上述のように、N末端は、選択された1つもしくは複数のCSRがイントロンにコードされた部分の標的となるように、選択することもできる。

20

【0378】

例示的なリンカーには、それだけには限定されないが、(Gly4Ser)_n、(Ser4Gly)_nおよび(AlaAlaProAla)_n（配列番号319参照）[式中、nは1、2、3または4などの1～4である]が含まれ、たとえば以下である：

(1) NcoI末端を有するGly4Ser、配列番号315

CCATGGGCGG CGGCGGGCTCT GCCATGG

30

(2) NcoI末端を有する(Gly4Ser)₂、配列番号316

CCATGGGCGG CGGCGGGCTCT GGCGGGCGGGCG GCTCTGCGCAT GG

(3) NcoI末端を有する(Ser4Gly)₄、配列番号317

CCATGGCCCTC GTCGTCGTCG GGCTCGTCGTC GTCTCGGGCTC

GTCGTCGTCG GGCTCGTCGTC GTCTCGGGCGC CATGG

(4) NcoI末端を有する(Ser4Gly)₂、配列番号318

CCATGGCCCTC GTCGTCGTCG GGCTCGTCGTC GTCTCGGGCGC CATGG

40

(5) (AlaAlaProAla)_n [式中、nは1～4、たとえば2または3である]（配列番号319参照）

【0379】

c. ヘテロ二官能性架橋結合試薬

アミノ基とチオール基との間に共有結合を形成し、チオール基をタンパク質内に導入するために用いられる数々のヘテロ二官能性架橋結合試薬が当業者に知られている（たとえば、そのような試薬の調製および使用を記載しており、そのような試薬の市販の入手源を提供しているPIERCE CATALOG、Immunotechnology Catalog & Handbook、1992～1993を参照；また、たとえば、Cumber他（1992）Bioconjugate Chem.、3：397～401；

50

Thorpe 他 (1987) Cancer Res.、47:5924~5931; Gordon 他 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci.、84:308~312; Walden 他 (1986) J. Mol. Cell Immunol.、2:191~197; Carlsson 他 (1978) Biochem. J.、173:723~737; Mahan 他 (1987) Anal. Biochem.、162:163~170; Wawryznaczak 他 (1992) Br. J. Cancer、66:361~366; Fattom 他 (1992) Infection & Immun.、60:584~589 も参照)。このような試薬は、N 末端部分と C 末端のイントロンにコードされた部分との間、またはこれらの部分のそれぞれとリンカーとの間に共有結合を形成するために用い得る。このような試薬には、それだけには限定されないが、：N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP; ジスルフィドリンカー); スルホスクシンイミジル-6-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノエート (スルホ-LC-SPDP); スクシンイミジロキシカルボニル- α -メチルベンジルチオスルフェート (SMBT、ヒンダード二硫酸リンカー); スクシンイミジル-6-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノエート (LC-SPDP); スルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート (スルホ-SMCC); スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)ブチレート (SPDB; ヒンダードジスルフィド結合リンカー); スルホスクシンイミジル-2-(7-アジド-4-メチルクマリン-3-アセトアミド)エチル-1, 3'-ジチオプロピオネート (SAED); スルホスクシンイミジル-7-アジド-4-メチルクマリン-3-アセテート (SAMCA); スルホスクシンイミジル-6-[α -メチル- α -(2-ピリジルジチオ)トルアミド]-ヘキサノエート (スルホ-LC-SMPT); 1, 4-ジ-[3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ブタン (DPDPB); 4-スクシンイミジロキシカルボニル- α -メチル- α -(2-ピリジルチオ)トルエン (SMPT、ヒンダード二硫酸リンカー); スルホスクシンイミジル-6-[α -メチル- α -(2-ピリミジルジチオ)トルアミド]ヘキサノエート (スルホ-LC-SMPT); m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS); m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル (スルホ-MBS); N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート (SIAB; チオエーテルリンカー); スルホスクシンイミジル-(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート (スルホ-SIAB); スクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート (SMPB); スルホスクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート (スルホ-SMPB); アジドベンゾイルヒドラジド (ABH) が含まれる。これらのリンカーは、たとえば、柔軟性もしくは溶解度を上昇させるもの、または立体障害をもたらすもしくは排除するものなどのペプチドリンカーと組み合わせて用いることができる。ポリペプチド分子を別の分子に連結させるための、当業者に知られている任意の他のリンカーを用いることができる。一般的な特性は、生じる分子が(ヒトを含めた動物に投与するために)生体適合性を有し、また、生じる分子がCSRの活性を変調することである。

【0380】

4. 発現系

天然およびコンビナトリアルのイントロン融合タンパク質を含めたCSRアイソフォームは、in vivo 方法および in vitro 方法を含めた、当業者に知られている任意の方法によって產生することができる。CSRアイソフォームは、投与ならびに治療に必要なCSRアイソフォームの所要の量および形態を產生することに適した、任意の生物中で発現させることができる。発現用宿主には、大腸菌、酵母、植物、昆虫細胞、ヒト細胞系およびトランスジェニック動物を含めた哺乳動物細胞などの原核生物ならびに真核生物が含まれる。発現用宿主は、そのタンパク質産生レベルおよび発現されたタンパク質上に存在する翻訳後修飾の種類が異なっていることができる。発現用宿主の選択は、これらならびに規制および安全性の考慮、産生コスト、精製の必要性およびの方法などの他の要素に基づいて行うことができる。

10

20

30

40

50

【0381】

多くの発現ベクターが利用可能かつ当業者に知られており、CSRアイソフォームの発現に用いることができる。発現ベクターの選択は、宿主の発現系の選択に影響を受ける。一般に、発現ベクターには、転写プロモーター、ならびに任意選択でエンハンサー、翻訳シグナル、転写停止シグナル、および翻訳停止シグナルが含まれていることができる。安定した形質転換に用いられる発現ベクターは、典型的には、形質転換細胞の選択および維持を可能にする選択マーカーを有する。場合によっては、ベクターのコピー数を増幅するために複製起点を用いることができる。

【0382】

また、CSRアイソフォームは、タンパク質融合体として利用または発現させることもできる。たとえば、アイソフォームにさらなる機能性を付加するためにアイソフォーム融合体を作製することができる。アイソフォーム融合タンパク質の例には、それだけには限定されないが、シグナル配列、局在化などのためのタグ、たとえばhis₆タグもしくはmycタグ、または精製のためのタグ、たとえばGST融合、ならびにタンパク質の分泌および／または膜会合を指示するための配列の融合が含まれる。

【0383】

a. 原核生物での発現

原核生物、特に大腸菌は、CSRアイソフォームなどのタンパク質を大量に産生する系を提供する。大腸菌の形質転換は、当業者に周知の単純かつ迅速な技法である。大腸菌の発現ベクターは誘導性プロモーターを含んでいることができ、このようなプロモーターは、高いタンパク質発現レベルの誘導および宿主細胞にある程度の毒性を示すタンパク質の発現に有用である。誘導性プロモーターの例には、lacプロモーター、trpプロモーター、ハイブリッドtacプロモーター、T7およびSP6RNAプロモーターならびに温度調節されたλPLプロモーターが含まれる。

【0384】

アイソフォームは、大腸菌の細胞質環境中で発現させることができる。細胞質は還元性の環境であり、一部の分子にとって、これは不溶性の封入体の形成をもたらされる原因となる場合がある。ジチオスレイトールおよびβ-メルカプトエタノールなどの還元剤ならびにグアニジン-HClおよび尿素などの変性剤を用いて、タンパク質を再度溶解させることができる。代替手法は、酸化的環境ならびにシャペロン様およびジスルフィドイソメラーゼを提供し、可溶性タンパク質の産生をもたらすことができる、細菌のペリプラズム空隙におけるCSRアイソフォームの発現である。典型的には、リーダー配列を発現させるタンパク質と融合させ、これによりタンパク質がペリプラズムに向けられる。その後、リーダーは、ペリプラズム内のシグナルペプチダーゼによって取り除かれる。ペリプラズムを標的とするリーダー配列の例には、ペクチン酸リアーゼの遺伝子由来のpelBリーダーおよびアルカリホスファターゼ遺伝子由来のリーダーが含まれる。場合によっては、ペリプラズムでの発現により、発現されたタンパク質が培地中に漏れることが可能となる。タンパク質の分泌は、培養上清からの急速かつ単純な精製を可能にする。分泌されなかったタンパク質は、浸透圧溶解によってペリプラズムから得ることができる。細胞質での発現と同様に、場合によってはタンパク質が不溶性となる可能性があり、変性剤および還元剤を用いて可溶化および再折畳みを促進することができる。誘導および増殖の湿度も発現レベルおよび溶解度に影響を与える場合があり、典型的には25℃～37℃の温度を用いる。典型的には、細菌はグリコシル化されていないタンパク質を産生する。したがって、タンパク質が機能のためにグリコシル化を要する場合は、宿主細胞から精製したあとにグリコシル化をin vitroで付け足すことができる。

【0385】

b. 酵母

サッカロミセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセスポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ヤロウィアリポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、クルイヴェロミ

10

20

30

40

50

セスラクチス (*Kluyveromyces lactis*) およびピキアパストリス (*Pichia pastoris*) などの酵母は、CSRアイソフォームの産生に用いることができる周知の酵母発現用宿主である。酵母は、エピソーム複製ベクターを用いて、または相同組換えによる安定した染色体への組込みによって形質転換させることができる。典型的には、誘導性プロモーターを用いて遺伝子発現を調節する。このようなプロモーターの例には、GAL1、GAL7およびGAL5ならびにCUP1、AOX1などのメタロチオネインプロモーター、または他のピキアもしくは他の酵母プロモーターが含まれる。発現ベクターには、多くの場合、形質転換させたDNAを選択および維持するためのLEU2、TRP1、HIS3およびURA3などの選択マーカーが含まれる。酵母中で発現されたタンパク質は、多くの場合は可溶性である。Bipおよびタンパク質ジスルフィドイソメラーゼなどのシャペロニンとの同時発現は、発現レベルおよび溶解度を改善させる場合がある。さらに、酵母中で発現されたタンパク質は、サッカロミセスセレビシエ由来の酵母交配型 α -因子の分泌シグナルなどの分泌シグナルペプチド融合体、およびAgap交配接着受容体またはアルクスラアデニニボランス (*Arxula adenivorans*) のグルコアミラーゼなどの酵母細胞表面タンパク質との融合体を用いた分泌に向けることができる。発現されたポリペプチドが分泌経路を出る際に、融合した配列がその発現されたポリペプチドから除去されるように、Kex-2プロテアーゼの切断部位などのプロテアーゼ切断部位を設計することができる。また、酵母もAsn-X-Ser/Thrモチーフにおいてグリコシル化が可能である。

【0386】

c. 昆虫細胞

昆虫細胞、特にバキュロウイルス発現を用いたものは、CSRアイソフォームなどのポリペプチドの発現に有用である。昆虫細胞はタンパク質を高レベルで発現し、高等真核生物によって用いられる翻訳後修飾のほとんどを行うことができる。バキュロウイルスは宿主範囲が制限されており、これにより、安全性が向上し、真核発現における規制面の懸案事項が軽減される。典型的な発現ベクターは、バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターなど、高レベル発現用のプロモーターを用いる。一般的に用いられるバキュロウイルス系には、オートグラフィアカリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (AcNPV)、およびボンビクスモリ (*bombyx mori*) 核多角体病ウイルス (BmNPV) などのバキュロウイルス、ならびにスポドプテラフルジベルダ (*Spodoptera frugiperda*)、スーダレチアユニプンクタ (*Pseudaletia unipuncta*) (A7S) およびダナウスプレキシプス (*Danaus plexippus*) (DpN1) 由来のSf9などの昆虫細胞系が含まれる。高レベルの発現には、発現させる分子のヌクレオチド配列をウイルスのポリヘドリン開始コドンのすぐ下流に融合させる。哺乳動物分泌シグナルは昆虫細胞中で正確にプロセッシングされ、発現されたタンパク質を培地中に分泌させるために用いることができる。さらに、細胞系スーダレチアユニプンクタ (A7S) およびダナウスプレキシプス (DpN1) は、哺乳動物細胞系と類似したグリコシル化パターンを有するタンパク質を産生する。

【0387】

昆虫細胞における代替発現系は、安定に形質転換した細胞の使用である。シュニーダー (*Schnieder*) 2 (S2) ならびにKc細胞 (ドロスフィラメラノガスター (*Drosophila melanogaster*)) およびC7細胞 (エーデスアルボピクタス (*Aedes albopictus*)) などの細胞系を発現に用いることができる。ドロスフィラのメタロチオネインプロモーターは、カドミウムまたは銅を用いた重金属での誘導の存在下で、高い発現レベルを誘導することができる。発現ベクターは、典型的には、ネオマイシンおよびハイグロマイシンなどの選択マーカーを用いることによって維持される。

【0388】

d. 哺乳動物細胞

哺乳動物発現系を用いてC S Rアイソフォームを発現させることができる。発現構築物は、アデノウイルスなどのウイルス感染によって、またはリボソーム、リン酸カルシウム、D E A Eーデキストランならびに電気穿孔および微量注入などの物理的手段等の直接D N A移行によって、哺乳動物細胞に移行させることができる。哺乳動物細胞の発現ベクターには、典型的には、m R N A キャップ部位、T A T A ボックス、翻訳開始配列（コザックコンセンサス配列）およびポリアデニル化要素が含まれる。このようなベクターには、多くの場合、高いレベルの発現のために転写プロモーターエンハンサー、たとえばS V 4 0 プロモーターエンハンサー、ヒトサイトメガロウイルス（C M V）プロモーターおよびラウス肉腫ウイルス（R S V）の末端反復配列が含まれる。これらのプロモーターエンハンサーは、多くの細胞種中で活性がある。また、組織および細胞種のプロモーターおよびエンハンサー領域も、発現に用いることができる。例示的なプロモーター／エンハンサー領域には、それだけには限定されないが、エラスターゼI、インスリン、免疫グロブリン、マウス乳癌ウイルス、アルブミン、 α フェトプロテイン、 α 1抗トリプシン、 β グロビン、ミエリン塩基性タンパク質、ミオシン軽鎖2、および性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御などの遺伝子由来のものが含まれる。発現構築物と共に細胞を選択および維持するために選択マーカーを用いることができる。選択マーカー遺伝子の例には、それだけには限定されないが、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、アデノシンデアミナーゼ、キサントシングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸還元酵素およびチミジンキナーゼが含まれる。T C R γ および F c ϵ R I γ などの細胞表面シグナル伝達分子との融合により、細胞表面上に活性状態でのタンパク質の発現を指示することができる。

【0389】

多くの細胞系が哺乳動物の発現に利用可能であり、マウス、ラット、ヒト、サル、ニワトリおよびハムスター細胞が含まれる。例示的な細胞系には、それだけには限定されないがC H O、B a l b / 3 T 3、H e L a、M T 2、マウスN S 0（非分泌性）および他の骨髓腫細胞系、ハイブリドーマおよびヘテロハイブリドーマ細胞系、リンパ球、線維芽細胞、S p 2 / 0、C O S、N I H 3 T 3、H E K 2 9 3、2 9 3 S、2 B 8、ならびにH K B細胞が含まれる。また、無血清培地に適合させた細胞系も利用可能であり、これにより、分泌されたタンパク質を細胞培養培地から精製することが容易となる。その一例は無血清E B N A - 1細胞系である（P h a m他、（2003）B i o t e c h n o l . B i o e n g .、84：332～42）。

【0390】

e. 植物

トランスジェニック植物細胞および植物を用いてC S Rアイソフォームを発現させることができる。発現構築物は、典型的には、微粒子銃およびプロトプラストへのP E G - 媒介の移行などの直接D N A移行、ならびにアグロバクテリウム媒介の形質転換を用いて植物へ移行される。発現ベクターには、プロモーターおよびエンハンサー配列、転写停止要素ならびに翻訳制御要素が含まれていることができる。発現ベクターおよび形質転換技術は、通常、白イヌナズナおよびタバコなどの双子葉植物宿主と、トウモロコシおよびコメなどの単子葉植物宿主とで分けられる。発現に用いられる植物プロモーターの例には、カリフラワーモザイクウイルスプロモーター、ノパリンシンターゼプロモーター、リボービスホスフェートカルボキシラーゼプロモーターならびにユビキチンおよびU B Q 3 プロモーターが含まれる。ハイグロマイシン、ホスホマンノースイソメラーゼおよびネオマイシンホスホトランスフェラーゼなどの選択マーカーが、多くの場合、形質転換細胞の選択および維持を容易にするために用いられる。形質転換させた植物細胞を、細胞として、凝集体（カルス組織）または植物全体に再生して培養中に維持することができる。また、トランスジェニック植物細胞には、C S Rアイソフォームを産生するように遺伝子操作した藻が含まれていることもできる（たとえばM a y f i e l d他（2003）P N A S、100：438～442参照）。植物は哺乳動物細胞とは異なるグリコシル化パターンを有するので、これらの宿主中で産生されるC S Rアイソフォームの選択に影響が与えられる可

能性がある。

【0391】

5. 遺伝子操作したCSRアイソフォーム

CSRアイソフォームは、1つまたは複数の改変された特性を有するように設計および產生することができる。このような特性には、それだけには限定されないが、タンパク質半減期の増加などのタンパク質安定性の増加、熱および／または1つもしくは複数のプロテアーゼに対する耐性の増加が含まれる。たとえば、CSRアイソフォームを、*in vitro*および／または*in vivo*においてタンパク質安定性が増加するように改変することができる。*In vivo*の安定性には、血液、唾液、および／または消化液中での安定性など、特定の投与条件下でのタンパク質の安定性が含まれていることができる。

10

【0392】

a. 改変されたタンパク質

CSRアイソフォームは、タンパク質の改変について当分野で知られている任意の方法を用いて改変することができる。このような方法には、部位特異的突然変異誘発およびランダム突然変異誘発が含まれる。タンパク質安定性を増加させるために、非天然アミノ酸および／またはポリペプチドのアミノ酸間に非天然共有結合をCSRアイソフォーム内に導入することができる。このような改変されたCSRアイソフォームでは、アイソフォームの生物学的機能は未改変のアイソフォームと比較して変化していない可能性もある。本明細書中に提供し、当分野で知られている生物学的機能のためのアッセイなどのアッセイを用いて、改変したCSRアイソフォームの生物学的機能を評価することができる。

20

【0393】

b. ペプチド模倣体アイソフォーム。

また、ペプチド主鎖中の1つもしくは複数の結合（または他の結合（もしくは複数の結合））がバイオイソスターまたは他の結合によって置き換えられ、その結果生じるポリペプチド模倣体のプロテアーゼ耐性などの特性が未改変の形と比較して向上する、「ペプチド模倣体」アイソフォームも提供する。

【0394】

H. アイソフォームの活性もしくはCSR活性に対する影響を評価または監視するためのアッセイ

30

CSRアイソフォームは、受容体の完全長の野生型もしくは優性型と比較して、構造またはもう1つの活性の変更を示すことができる。さらに、CSRアイソフォームはCSRの活性を変更（変調）することができる。このようなアイソフォームすべてが候補治療剤である。

【0395】

アイソフォームが活性に差異を示す場合は、*in vitro*および*in vivo*アッセイを用いてCSRアイソフォームの監視またはスクリーニングを行うことができる。また、*in vitro*および*in vivo*アッセイを用いて、特定の受容体もしくは経路の活性を変調するものを選択または同定するためにCSRアイソフォームのスクリーニングを行うこともできる。このようなアッセイは当業者に周知である。当業者は、CSRもしくはCSRリガンドとの相互作用について特定のアイソフォームの試験を行う、および／またはCSRと比較した活性の任意の変化を評価するために試験を行うことができる。その一部を本明細書中に例示する。

40

【0396】

例示的な*in vitro*および*in vivo*アッセイを、RTKアイソフォームの活性をRTKの野生型または優性型の活性と比較するために本明細書中に提供する。多くのアッセイが他のCSRおよびCSRアイソフォームに適応可能である。さらに、CSRのキナーゼ活性および細胞増殖活性のアッセイなどの数々のアッセイが当業者に知られている。RTKアイソフォームおよびRTKの活性用のアッセイには、それだけには限定されないが、キナーゼアッセイ、ホモ二量体化およびヘテロ二量体化アッセイ、タンパク質

50

：タンパク質相互作用アッセイ、構造的アッセイ、細胞シグナル伝達アッセイならびに *in vivo* 表現型アッセイが含まれる。また、アッセイには、活性を観察および／もしくは測定することができる、または他の方法で評価することができる疾患モデルを含めた動物モデルの使用も含まれる。このようなアッセイにおける C S R アイソフォームの用量応答曲線は、生物活性の変調を評価するため、および投与する C S R アイソフォームの治療上有効な量を決定するために用いることができる。R T K アイソフォームおよび R T K のアッセイには、それだけには限定されないが、キナーゼアッセイ、ホモ二量体化およびヘテロ二量体化アッセイ、タンパク質：タンパク質相互作用アッセイ、構造的アッセイ、細胞シグナル伝達アッセイならびに *in vivo* 表現型アッセイが含まれる。T N F R のアッセイには、それだけには限定されないが、三量体化アッセイ、膜局在化アッセイなどの局在化アッセイ、タンパク質：タンパク質相互作用アッセイ、構造的アッセイ、細胞シグナル伝達アッセイおよび *in vivo* 表現型アッセイが含まれる。例示的なアッセイを以下に記載する。

10

【0397】

1. キナーゼアッセイ

キナーゼ活性は、直接および間接的に検出ならびにおよび／または測定することができる。たとえば、ホスホチロシンに対する抗体を用いて、R T K のリン酸化、R T K アイソフォーム、R T K：R T K アイソフォーム複合体ならびに他のタンパク質およびシグナル伝達分子のリン酸化を検出することができる。たとえば、R T K のチロシンキナーゼ活性の活性化は、R T K に対するリガンドの存在下で測定することができる。リン酸転移は、抗ホスホチロシン抗体によって検出することができる。リン酸転移は、R T K アイソフォームを存在させておよび存在させずに測定ならびに／または検出することができ、したがって、R T K アイソフォームが R T K のリン酸転移を変調する能力が測定される。手短に述べると、R T K アイソフォームを発現する細胞、または R T K アイソフォームに曝された細胞を、リガンドで処理する。細胞を溶解し、タンパク質抽出物（全細胞抽出物または分画した抽出物）をポリアクリルアミドゲルに載せ、電気泳動によって分離して、ウエスタンブロッティングで用いるものなどの膜に移す。また、抗 R T K 抗体を用いた免疫沈降も、ゲル電気泳動およびウエスタンブロッティングを行う前に R T K タンパク質を分画ならびに単離するために用いることができる。抗ホスホチロシン抗体を用いて膜のプロベイングを行ってリン酸化を検出することができ、また、抗 R T K 抗体を用いてプロベイングを行って全 R T K タンパク質を検出することができる。比較のために、R T K アイソフォームを発現しない細胞およびリガンドに曝されていない細胞などの対照細胞を同じ手順に供することができる。

20

30

【0398】

また、チロシンのリン酸化は、質量分析などによって直接測定することもできる。たとえば、R T K のリン酸化状態に対する R T K アイソフォームの効果を、無傷の細胞を様々な濃度の R T K アイソフォームで処理して R T K の活性化に対する効果を測定することなどによって、測定することができる。R T K は、免疫沈降によって単離することができ、質量分析による解析用のペプチド断片を産生するためにトリプシン処理することができる。ペプチドの質量分析は、タンパク質のチロシンリン酸化の程度を定量的に決定するためのよく確立された方法である。チロシンのリン酸化は、ホスホチロシンを含むペプチドイオンの質量を増加させ、このペプチドは質量分析によってリン酸化されていないペプチドから容易に分離することができる。

40

【0399】

たとえば、チロシン-1139およびチロシン-1248は、E r b B 2 R T K 中で自己リン酸化されていることが知られている。トリプシン処理したペプチドは、たとえば E x P A S y - P e p t i d e M a s s プログラムを用いることによって、ポリペプチドに基づいて経験的に決定または予測することができる。チロシン-1139およびチロシン-1248のリン酸化の程度は、これらのチロシンを含むペプチドの質量分析データから決定することができる。このようなアッセイを用いて、R T K アイソフォームの自己リ

50

ン酸化の程度および R T K アイソフォームが R T K のトランスリン酸化を行う能力を評価することができる。

【0400】

2. 複合体化

R T K および R T K アイソフォームの二量体化ならびに T N F R および T N F R アイソフォームの三量体化などの複合体化を、検出および／または測定することができる。たとえば、単離したポリペプチドを混合して、ゲル電気泳動およびウエスタンブロッティングに供することができる。また、C S R ならびに／または C S R アイソフォームを細胞および全細胞もしくは分画した抽出物などの細胞抽出物に加えることができ、ゲル電気泳動およびウエスタンブロッティングに供することができる。ポリペプチドを認識する抗体を用いて、単量体、二量体および他の複合体形成した型の存在を検出することができる。あるいは、標識した C S R および／または標識した C S R アイソフォームをアッセイで検出することができる。

10

【0401】

たとえば、このようなアッセイを用いて、R T K アイソフォームを存在させておおよび存在させずに、R T K のホモ二量体化または2つ以上の R T K のヘテロ二量体化を比較することができる。また、R T K アイソフォームのホモ二量体化、および／または R T K とヘテロ二量体化するその能力を評価するために、アッセイを行うこともできる。たとえば、E r b B 2 R T K アイソフォームを、E r b B 2、E r b B 3 および E r b B 4 とヘテロ二量体化するその能力について評価することができる。さらに、E r b B 2 R T K アイソフォームを、E r b B 2 が自己とホモ二量体化する能力を変調するその能力について、評価することができる。

20

【0402】

3. リガンド結合

一般に、C S R は1つまたは複数のリガンドに結合する。リガンド結合は受容体の活性を変調し、したがって、たとえばシグナル伝達経路のシグナル伝達を変調する。C S R アイソフォームのリガンド結合および C S R アイソフォームの存在下における C S R のリガンド結合を測定することができる。たとえば、放射標識したリガンドなどの標識したリガンドを、C S R アイソフォームを存在させてまたは存在させずに（対照）、精製したもしくは部分的に精製した C S R に加えることができる。免疫沈降および放射活性の測定を用いて、C S R アイソフォームが存在する場合および存在しない場合に C S R に結合したリガンドの量を定量することができる。また、C S R アイソフォームは、C S R アイソフォームを標識したリガンドと共にインキュベートし、たとえば対応する C S R の野生型または優性型によって結合された量と比較して C S R アイソフォームに結合された標識したリガンドの量を決定することなどによって、リガンド結合について評価することもできる。

30

【0403】

4. 細胞増殖アッセイ

いくつかの R T K、たとえば V E G F R が、細胞増殖に関与している。細胞増殖に対する R T K アイソフォームの効果を測定することができる。たとえば、リガンドを、R T K を発現する細胞に加えることができる。R T K アイソフォームは、リガンドを加えて細胞増殖に対する効果を測定する前、それと同時に、またはその後に、このような細胞に加えることができる。あるいは、R T K アイソフォームは、このような細胞モデル中で、たとえばアデノウイルスベクターを用いて発現させることができる。たとえば、V E G F R アイソフォームを、V E G F R を発現する内皮細胞に加える。アイソフォームを加えたあと、V E G F リガンドを加え、細胞を標準の増殖温度（たとえば 37℃）で数日間インキュベーションした。細胞をトリプシン処理し、トリパンブルーで染色し、生細胞を計数した。V E G F R アイソフォームおよび／またはリガンドに曝されていない細胞は、比較用の対照として用いる。他の適切な対照を用いることができる。

40

【0404】

5. 細胞疾患モデルアッセイ

50

疾患もしくは状態由来の細胞、または疾患もしくは状態を模倣するように変調させることができる細胞を用いて、C S Rアイソフォームの測定および／もしくは検出することができる。数々の動物モデルおよび *in vitro* 疾患モデルが当業者知られている。たとえば、C S Rアイソフォームを細胞に加えるか、または細胞中で発現させ、C S Rアイソフォームに曝していない、もしくはそれを発現しない細胞と比較して、表現型を測定または検出する。このようなアッセイは、細胞増殖、転移、炎症、血管形成、病原体感染症および骨吸収に対する効果を含めた効果を測定するために用いることができる。

【0405】

たとえばM E Tアイソフォームの効果を、このようなアッセイを用いて測定することができる。H e p G 2肝細胞などの肝細胞モデルを用いて、スポロゾイトによる培養中のマ
10
ラリアの感染力を監視することができる。M E TアイソフォームなどのR T Kアイソフォームを細胞に加えるか、および／または細胞中で発現させる。その後、感染の結果産生されるスポロゾイトのE E F（赤血球外型）を染色および計数することなどによって、マラリアスポロゾイトを用いたこのような細胞の感染を測定するC a r r o l l o他（2003）N a t Med、9（11）：1363～1369。R T Kアイソフォームの効果は、この結果を、曝されていない細胞またはR T Kアイソフォームを発現する細胞および／または未感染の細胞と比較することによって評価することができる。

【0406】

また、C S Rアイソフォームの効果は、血管形成において測定することができる。たとえば、ヒト臍静脈内皮細胞（H U V E C）などの内皮細胞による *in vitro*での細
20
管形成は、血管形成および血管形成に対する効果を測定するアッセイとして用いることができる。様々な量のC S Rアイソフォームを *in vitro*血管形成のアッセイに加えることは、血管形成のモジュレーターとしてのC S Rアイソフォームの有効性のスクリーニングに有用な方法である。

【0407】

破骨細胞培養物を用いることなどによってR T Kアイソフォームの有効性を測定するために、細胞培養物における骨吸収を測定することができる。破骨細胞とは、生物において骨を再吸収する造血系由来の高度に分化した細胞であり、*in vitro*で骨切片から骨を再吸収することができる。破骨細胞の細胞培養方法および破骨細胞培養物において骨吸収を測定する定量的技法は、当分野で記載されている。たとえば、単核細胞をヒト末梢
30
血から単離して培養することができる。C S Rアイソフォームの添加および／または発現を用いて、酒石酸耐性酸ホスファターゼに陽性である多核細胞ならびに再吸収された面積および骨切片から放出されたコラーゲン断片を測定することなどによって、破骨細胞の形成に対する効果を評価することができる。用量応答曲線を用いて、骨吸収の変調に必要なC S Rアイソフォームの治療上有効な量を決定することができる。

【0408】

6. 動物モデル

動物モデルを用いてC S Rアイソフォームの効果を評価することができる。一例では、疾患の動物モデルを研究して、C S Rアイソフォームの導入により疾患に影響が与えられるかどうかを決定することができる。たとえば、癌細胞増殖、遊走および侵襲性を含めた
40
腫瘍形成に対するC S Rアイソフォームの効果を測定することができる。このようなアッセイの1つでは、卵巣癌細胞などの癌細胞を、C S Rアイソフォームを発現するアデノウイルスで感染させる。一定の *in vitro* 培養期間ののち、細胞をトリプシン処理し、適切な緩衝液に懸濁させ、マウスに注射する（たとえば、B a l b / cヌードマウスなどモデルマウスの脇腹および肩に皮下注射する）。経時的に腫瘍増殖を監視する。比較のために、C S Rアイソフォームを発現しない対照細胞をマウスに注射することができる。他の細胞種および動物モデル、たとえばN I H 3 T 3細胞、ネズミ肺癌（L L C）細胞、原発性膵腺癌（P A N C - 1）細胞、T A K A - 1膵管細胞、ならびにC 5 7 B L / 6マウスおよびS C I Dマウスを用いて、同様のアッセイを行うことができる。さらなる例では、角膜マイクロポケットアッセイなどのアッセイを用いて眼球障害に対するC S Rアイ
50

ソフォームの効果を評価することができる。手短に述べると、アッセイの2～3日前に、C S Rアイソフォーム（または対照）を発現する細胞をマウスに注射によって与える。次いで、マウスに麻酔し、リガンドのペレットを眼の角膜マイクロポケット内に埋め込む。その後、たとえば埋込みの5日後に血管新生を測定する。その後、対照と比較した血管形成および眼の表現型に対するC S Rアイソフォームの効果を評価する。さらなる例では、I I型コラーゲン誘導性関節炎（C I A）のモデルにおけるC S Rアイソフォームの効果は、S C I Dマウスに、C S Rアイソフォームのc D N Aを含むレトロウイルスベクターで形質導入したD B A／1マウス由来の脾細胞または未変換の脾細胞を腹腔内注射することによって評価することができる。未変換の脾細胞を与えたマウスは11～13日以内に関節炎を発生し、これは、たとえば関節炎の臨床的、組織学的、または免疫学的（すなわち抗体レベル）パラメータによって評価される、関節炎の発生に対するC S Rアイソフォームを発現する脾細胞の効果を決定するための基準対照として用いることができる。

10

【0409】

疾患の動物モデルに対するC S Rアイソフォームの効果は、C S Rアイソフォームの精製した形または組換え型を投与することによってさらに評価することができる。たとえば、創傷治癒は、遺伝的に糖尿病性であるd b +／d b +マウスを利用して、創傷治癒障害のモデルで評価することができ、全層の切除創傷を糖尿病性マウスの背に与える。C S Rアイソフォームを用いて表面的または全身的に治療したあと、創縫合、創傷部位における炎症細胞の浸潤、炎症性サイトカインの発現について解析することによって創傷治癒を評価することができる。創傷治癒に対するC S Rアイソフォームの効果を経時的に評価することができ、その効果を、対照治療、たとえばベヒクルのみの対照を与えたマウスと比較することができる。さらなる例では、たとえば肺損傷の組織学的切片の解析およびブレオマイシン／シリカに誘導される肺中のヒドロキシプロリン含有量の増加に対する効果のアッセイを行うことによって評価した肺線維症が軽減されるかどうかを決定するために、ブレオマイシンまたはシリカによって誘発させた肺線維症のモデルに組換えC S Rアイソフォームを投与することができる。

20

【0410】

また、C S Rアイソフォームを欠く動物を用いてC S Rアイソフォームの生物活性を監視することもできる。たとえば、受容体タンパク質が早期に終結することを確実にするためにI R E S－L a c Zカセットの上流の適切な読み枠内に翻訳ストップコドンを導入した標的構築物を作製することによって、アイソフォームに特異的な破損を行うことができる。あるいは、L o x P／C r e組換え戦略を用いることができる。標的とした破損が確認されたあと、たとえば肺、肢、瞼、下垂体前葉腺、および脾臓などの様々な器官の発生を含めた、野生型マウスと比較した欠乏マウスの表現型を解析することによって、C S Rアイソフォームの欠乏の結果を確立することができる。さらに、特異的細胞集団の組織学または単離によってアポトーシスまたは細胞増殖などの他のパラメータを評価して、野生型C S RとC S Rアイソフォームを欠く動物または単離した細胞とを比較した場合に差が存在するかどうかを決定することができる。また、シグナル伝達カスケードの構成要素および下流遺伝子の発現を評価して、C S Rアイソフォームが存在しないことにより受容体のシグナル伝達および遺伝子発現に影響が与えられるかどうかを決定することもできる。

30

40

【0411】

I. C S RアイソフォームおよびC S Rアイソフォーム組成物の調製、配合ならびに投与

R T KおよびT N F RアイソフォームならびにR T KおよびT N F Rアイソフォーム組成物を含めたC S RアイソフォームならびにC S Rアイソフォーム組成物は、筋肉内、静脈内、皮内、腹腔内注射、皮下、硬膜外、経鼻、経口、直腸、表面的、吸入、頬側（たとえば舌下）、および経皮投与または任意の経路を含めた、当業者に知られている任意の経路による投与用に配合することができる。C S Rアイソフォームは、任意の都合のよい経路によって、たとえばインフュージョンまたはボラス注射によって、上皮または粘膜皮膚の裏層（たとえば口腔粘膜、直腸および腸管粘膜など）を通る吸収によって投与するこ

50

とができ、また、他の生物活性のある薬剤と共に、逐次的に、断続的にまたは同じ組成物中で投与することができる。投与は、治療の位置に応じて局所投与、表面投与または全身投与であることができる。治療を必要としている領域への局所投与は、たとえば、それだけには限定されないが、手術中の局所動注によって、たとえば手術後の創傷被覆材と共に表面塗布することによって、注射によって、カテーテルを用いて、坐薬を用いて、または植込錠を用いて行うことができる。また、投与には、徐放性配合物およびポンプを用いるものなど装置で制御する徐放系が含まれていることができる。任意の与えられた事例において最も適切な経路は、治療する疾患または状態の性質および重篤度に依存し、また、使用する具体的な組成物の性質にも依存する。

【0412】

10

様々な送達系が知られており、CSRアイソフォームを投与するために用いることができる。それには、それだけには限定されないが、リボソームへのカプセル封入、微粒子、マイクロカプセル、化合物を発現する能力を有する組換え細胞、受容体媒介エンドサイトーシス、およびレトロウイルス送達系などのCSRアイソフォームをコードしている核酸分子の送達が挙げられる。

【0413】

CSRアイソフォームを含む薬剤組成物を調製することができる。一般に、製薬上許容される組成物は、規制機関による認可を考慮して調製するか、または動物およびヒトでの使用について、一般に認識されている薬局方に従って調製した他のものである。薬剤組成物には、アイソフォームと一緒に投与する希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはベヒクルなどの担体が含まれていることができる。このような製薬担体は、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱物油、およびゴマ油など、石油、動物、野菜または合成由来のものを含めた、水および油などの無菌の液体であることができる。薬剤組成物を静脈内投与する場合、水が典型的な担体である。また、生理食塩水ならびにデキストロス水溶液およびグリセロール溶液も、液体担体として、特に注射剤用に用いることができる。組成物は、活性成分と共に、ラクトース、スクロース、リン酸二カルシウム、またはカルボキシメチルセルロースなどの希釈剤；ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウムおよびタルクなどの潤滑剤；ならびにデンプン、アカシアゼラチンゴム等の天然ゴム、グルコース、糖蜜、ポリビニルピロリジン、セルロースやその誘導体、ポビドン、クロスポビドンおよび当業者に知られている他のそのような結合剤などの結合剤を含んでいることができる。適切な製薬用賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、およびエタノールが含まれる。また、所望する場合は、組成物は少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤、たとえば、アセテート、クエン酸ナトリウム、シクロデキストリン誘導体、モノラウリン酸ソルビタン、酢酸トリエタノールアミンナトリウム、オレイン酸トリエタノールアミン、および他のそのような薬剤を含んでいることもできる。これらの組成物は、液剤、懸濁液、乳剤、錠剤、丸薬、カプセル、散剤、および持続放出配合物の形をとることができる。組成物は、トリグリセリドなどの従来の結合剤および担体を用いて、坐薬として配合することができる。経口製剤には、製薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム、および他のそのような薬剤などの標準の担体が含まれていることができる。適切な製薬担体の例は、E. W. Martinの「レミントンの製薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」に記載されている。このような組成物は、患者に正確に投与するための形態を提供するために、一般に精製した形の治療上有効な量の化合物を適切な量の担体と共に含む。配合物は、投与様式に適しているべきである。

20

30

40

【0414】

錠剤、カプセル、丸薬、散剤、顆粒、無菌的非経口液剤または懸濁液、および経口液剤または懸濁液、ならびに適切な量の化合物または製薬上許容されるその誘導体を含む油水

50

乳剤など、単位剤形でヒトおよび動物に投与するための配合物を提供する。製薬上かつ治療上活性のある化合物およびその誘導体を典型的に配合し、単位剤形または複数の剤形で投与する。それぞれの単位用量が、所望の治療効果を生じるために十分な所定量の治療上活性のある化合物を、所要の製薬担体、ベヒクルまたは希釈剤と共に含む。単位剤形の例には、アンプルおよびシリンジならびに個別にパッケージングした錠剤またはカプセルが含まれる。単位剤形は、少量単位でまたは複数の少量単位で投与することができる。複数剤形とは、区分した単位剤形で投与するための、単一の容器中に梱包した複数の同一の単位剤形をいう。複数剤形の例には、バイアル、錠剤もしくはカプセルの瓶またはポイントもしくはガロン単位の瓶が含まれる。したがって、複数剤形とは、梱包が区別されていない複数の単位用量である。

10

【0415】

0.005%～100%の範囲の活性成分を含み、バランスを無毒性の担体で構成した剤形または組成物を調製することができる。経口投与には、薬剤組成物は、結合剤（たとえば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンもしくはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（たとえば、ラクトース、結晶セルロースもしくはリン酸水素カルシウム）；潤滑剤（たとえば、ステアリン酸マグネシウム、タルクもしくはシリカ）；崩壊剤（たとえば、ジャガイモデンプンもしくはグリコール酸ナトリウムデンプン）；または湿潤剤（たとえば、ラウリル硫酸ナトリウム）などの製薬上許容される賦形剤を用いて、従来手段によって調製した、たとえば錠剤あるいはカプセルの形態をとることができる。錠剤は、当分野で周知の方法によってコーティングすることができる。

20

【0416】

また、薬剤調製物は、液体形態、たとえば、液剤、シロップもしくは懸濁液であるか、または使用前に水もしくは他の適切なベヒクルで再構成するための薬物製品として提供することもできる。このような液体調製物は、懸濁剤（たとえば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または水素化食用脂）；乳化剤（たとえば、レシチンまたはアカシア）；非水性ベヒクル（たとえば、アーモンド油、油状エステル、または分留した植物油）；および保存料（たとえば、メチルもしくはプロピル-p-ヒドロキシ安息香酸またはソルビン酸）などの製薬上許容される添加剤を用いて、従来手段によって調製することができる。

【0417】

直腸投与に適した配合物を単位用量の坐薬として提供することができる。これらは、活性化合物を1つまたは複数の従来の固体担体、たとえばカカオ脂と混合し、その後、生じた混合物を成型することによって調製することができる。

30

【0418】

皮膚または眼への表面塗布に適した配合物には、軟膏、クリーム、ローション、ペースト、ゲル、スプレー、エアロゾルおよび油が含まれる。例示的な担体には、ワセリン、ラノリン、ポリエチレングリコール、アルコール、およびこれらのうち2つ以上の組合せが含まれる。また、表面用配合物は、とりわけヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリ（アルキレングリコール）、ポリ／ヒドロキシアルキル、（メタ）アクリレートまたはポリ（メタ）アクリルアミドから選択される0.05～15、20、25重量%のシクナーを含んでいることができる。表面用配合物は、多くの場合、結膜嚢への滴下によってまたは軟膏として施用する。また、これは、眼、顔面洞、および外耳道の灌注または潤滑に用いることもできる。また、これは、眼球前房および他の箇所内に注射することもできる。また、液状の表面用配合物は、条片またはコンタクトレンズの形態で親水性の三次元ポリマーマトリックス中に存在することもでき、これから活性成分が放出される。

40

【0419】

吸入による投与には、本明細書中で用いるための化合物は、適切な噴霧剤、たとえば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切な気体と共に使用して、加圧バックまたは噴霧器からエアロ

50

ゾルスプレーを提供する形態で送達することができる。加圧エアロゾルの場合は、計量された量を送達するために弁を設けることによって単位用量を決定することができる。吸入器または注入器で用いるためのたとえばゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物とラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末基剤との粉末混合物を含むように配合することができる。

【0420】

頬側（舌下）投与に適した配合物には、たとえば、味付き基剤、通常はスクロースおよびアカシアまたはトラガカント中に活性化化合物を含むロゼンジ；ならびにゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアカシアなどの不活性基剤中に化合物を含むトローチが含まれる。

10

【0421】

C S Rアイソフォームの薬剤組成物は、注射、たとえばボーラス注射または持続注入による非経口投与用に配合することができる。注射用の配合物は、単位剤形で、たとえば、アンプルまたは複数用量の容器中で、保存料を加えて提示することができる。組成物は懸濁液、油状または水性ベヒクル中の液剤または乳剤であることができ、懸濁化剤、安定化剤および／または分散剤などの配合剤を含んでいることができる。あるいは、活性成分は、使用前に適切なベヒクル、たとえば無菌的かつ発熱物質を含まない水または他の溶媒で再構成するための散剤形態であることができる。

【0422】

経皮投与に適した配合物は、長期にわたってレシピエントの表皮と密接して保たれるように適応させた個別のパッチとして提示することができる。このようなパッチは、活性化化合物を、活性化化合物に関してたとえば0.1～0.2 Mの濃度の任意選択で緩衝した水溶液として、適切に含む。また、経皮投与に適した配合物は、イオン泳動によって送達することもでき（たとえばPharmaceutical Research、3（6）、318（1986）参照）、典型的には、活性化化合物の任意選択で緩衝した水溶液の形態をとる。

20

【0423】

また、薬剤組成物は、徐放性の手段および／または送達装置によって投与することもできる（たとえば、U. S. Patent Nos. 3, 536, 809；3, 598, 123；3, 630, 200；3, 845, 770；3, 847, 770；3, 916, 899；4, 008, 719；4, 687, 610；4, 769, 027；5, 059, 595；5, 073, 543；5, 120, 548；5, 354, 566；5, 591, 767；5, 639, 476；5, 674, 533および5, 733, 566を参照）。

30

【0424】

特定の実施形態では、リポソームおよび／またはナノ粒子もC S Rアイソフォーム投与に用い得る。リポソームは水性媒体中に分散させたリン脂質から形成され、多重膜の同心二重層の小胞を自発的に形成する（多重膜小胞（MLV）とも呼ぶ）。MLVは一般に25 nm～4 μmの直径を有する。MLVの超音波処理により、核に水溶液を含む、200～500. A N G. の範囲の直径を有する小さな単層小胞（SUV）の形成がもたらされる。

40

【0425】

リン脂質は、水に分散させた際に、水に対する脂質のモル比に応じてリポソーム以外の様々な構造を形成することができる。低い比では、リポソームが形成される。リポソームの物理的特徴は、pH、イオン強度および二価陽イオンの存在に依存する。リポソームはイオン性および極性物質に対して低い透過性を示すが、高温ではその透過性を顕著に変更させる相転移を受ける。相転移は、ゲル状態として知られる密に詰められた秩序ある構造から、流体状態として知られる緩く詰められた秩序の低い構造への変化を含む。これは特徴的な相転移温度で起こり、イオン、糖および薬物への透過性の増加をもたらす。

【0426】

リポソームは、マクロファージおよび好中球などの細網内皮系の食細胞によるエンドサ

50

イトーシス；非特異的な弱い疎水性もしくは静電的な力、または細胞表面成分との特異的相互作用のいずれかによる細胞表面への吸着；リポソーム内容物を細胞質中に同時放出することを伴った、リポソームの脂質二重層を形質膜内に挿入することによる形質細胞膜との融合；ならびにリポソーム内容物の会合をまったく伴わない、細胞膜もしくは細胞下膜へのリポソーム脂質の移行、またはその逆による、様々な機構を介して細胞と相互作用する。リポソームの配合を変動することによりどの機構が作動するかを変更することができるが、複数の機構が同時に作動することも可能である。一般に、ナノカプセルは化合物を安定かつ再現性のある様式で捕捉することができる。細胞内の高分子過負担による副作用を回避するために、このような超微粒子（ $0.1\mu\text{m}$ 付近の大きさ）は *in vivo* で分解されることができるポリマーを用いて設計すべきである。これらの要件を満たす生分解性ポリアルキルシアノアクリレートナノ粒子が本明細書中で用いるために企図され、このような粒子は容易に作製することができる。

10

【0427】

タンパク質分解性の分解ならびに抗原および免疫原性応答による免疫学的介入などの、CSRアイソフォームを分解性プロセスに曝すことを減らすための投与方法を用いることができる。このような方法の例には、治療部位における局所投与が含まれる。治療剤のペグ化は、タンパク質分解に対する耐性を増大させ、血漿半減期を増加させ、抗原性および免疫原性を低減させることが報告されている。ペグ化方法の例は、当分野で知られている（たとえば、LuおよびFelix、Int. J. Peptide Protein Res.、43：127～138、1994；LuおよびFelix、Peptide Res.、6：142～6、1993；Felix他、Int. J. Peptide Res.、46：253～64、1995；Benhar他、J. Biol. Chem.、269：13398～404、1994；Brumeanu他、J. Immunol.、154：3088～95、1995参照；また、Caliceti他（2003）Adv. Drug Deliv. Rev.、55（10）：1261～77ならびにMolineux（2003）Pharmacotherapy、23（8Pt2）：3S～8Sも参照）。また、ペグ化は、*in vivo*における核酸分子の送達に用いることができる。たとえば、アデノウイルスのペグ化は安定性および遺伝子導入性を増加させることができる（たとえばCheng他（2003）Pharm. Res. 20（9）：1444～51参照）。

20

30

【0428】

望ましい血液レベルは、血漿レベルによって確かめられるように活性剤を持続注入することによって維持することができる。担当医は、毒性、または骨髄、肝臓もしくは腎臓の機能不全により、どのようにおよびいつ治療を終結する、中断する、またはより低い用量に調整するかを理解しているであろうことに、留意されたい。逆に、担当医は、臨床反応が十分でない場合は（毒性がある副作用を除外する）、治療をどのようにおよびいつ、より高いレベルに調整するかも理解しているであろう。たとえば、経口、肺、非経口（筋肉内、腹腔内、静脈内（IV）もしくは皮下注射）、吸入（微粉配合物による）、経皮、経鼻、経膈、直腸、または舌下の投与経路によって投与し、それぞれの投与経路に適切な剤形で配合することができる（たとえば、国際PCT特許出願の国際公開第93/25221号パンフレットおよび国際公開第94/17784号パンフレット；ならびにEuropean Patent Application 613, 683参照）。

40

【0429】

CSRアイソフォームは、治療する患者に対して望ましくない副作用が存在しないように治療上有用な効果を発揮するために十分な量を、製薬上許容される担体中に含める。治療上有効な濃度は、化合物を本明細書中に提供するアッセイなどの既知の *in vitro* および *in vivo* 系で試験することによって、経験的に決定することができる。

【0430】

組成物中のCSRアイソフォームの濃度は、複合体の吸収速度、失活速度および排泄速度、複合体の物理化学的特徴、投薬スケジュール、投与量、ならびに当業者に知られてい

50

る他の因子に依存する。疾患または状態、たとえば癌、自己免疫疾患および感染症を治療するために投与するC S Rアイソフォームの量は、標準の臨床技法によって決定することができる。さらに、*in vitro*アッセイおよび動物モデルを用いて最適用量範囲の決定を支援することができる。経験的に決定することができる正確な用量は、投与経路および疾患の重篤度に依存する可能性がある。投与するための適切な用量範囲は、体重1 kgあたり約0.01 pg~1 mg/kg、より典型的には患者の体重1 kgあたり0.05 mg~200 mgのC S Rアイソフォームの範囲であることができる。

【0431】

C S Rアイソフォームは、一度に投与するか、または一定の時間の間隔をあけて投与する、いくつかのより少ない用量に分けることができる。C S Rアイソフォームは、治療期間、たとえば数時間、数日、数週間、または数カ月にわたる1つまたは複数の用量で投与することができる。場合によっては、連続投与が有用である。正確な用量および治療期間は治療する疾患と相関関係にあり、既知の試験プロトコルを用いて、または*in vivo*もしくは*in vitro*試験データから外挿することによって経験的に決定することができることを理解されたい。また、濃度および用量の値も、緩和させる状態の重篤度に応じて変動する可能性があることも留意されたい。さらに、任意の特定の対象について、個々の要求および投与を行う人もしくは組成物の投与を管理する人の専門的な判断に従って具体的な投薬レジメンを時間と共に調節すべきであり、また、本明細書中に記載した濃度範囲は例示的なもののみであり、組成物およびそれを含む組合せの範囲または使用を限定することを意図しないことを、理解されたい。

【0432】

J. C S Rアイソフォームの*in vivo*発現および遺伝子治療

C S Rアイソフォームは、核酸分子の発現によって細胞および組織に送達することができる。C S Rアイソフォームは、*ex vivo*技法および*in vivo*での直接発現を含めて、C S Rアイソフォームをコードしている核酸分子として投与することができる。

【0433】

1. 核酸の送達

核酸は、当業者に知られている任意の方法によって細胞および組織に送達することができる。

【0434】

a. エピソームベクターおよび組込みベクター

コードしている核酸分子の発現によるC S Rアイソフォームの投与方法には、組換えベクターの投与が含まれる。ベクターは、複製起点を含めることなどによってエピソームとして保持されるように設計するか、または細胞の染色体中に組み込まれるように設計することができる。

【0435】

また、C S Rアイソフォームは、非ウイルスベクターを用いた*ex vivo*遺伝子発現治療にも用いることができる。たとえば、C S Rアイソフォームを発現するよう細胞を操作することができ、これは、調節配列に動作可能に連結して、またはゲノム位置内で調節配列に動作可能に連結して配置されるように、C S Rアイソフォームをコードしている核酸をゲノム位置内に組み込むことなどによる。その後、このような細胞を、治療を必要としている患者などの対象に局所投与または全身投与することができる。

【0436】

ウイルスベクターには、たとえばアデノウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルスが含まれ、遺伝子治療用に設計された他のものを用いることができる。ベクターは、エピソームとして保持されるか、または治療する対象の染色体内に組み込まれることができる。C S Rアイソフォームはウイルスによって発現されることができ、これを、治療を必要としている対象に投与する。遺伝子治療に適したウイルスベクターには、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスおよび上述の他のウイルスが含

まれる。たとえば、アデノウイルス発現技術は当分野で周知であり、アデノウイルスの産生および投与方法も周知である。アデノウイルスの血清型は、たとえばアメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC、メリーランド州Rockville）から入手可能である。アデノウイルスをex vivoで用いることができ、たとえば、治療を必要としている患者から細胞を単離し、CSRアイソフォームを発現するアデノウイルスベクターを用いて形質導入する。適切な培養期間ののち、形質導入された細胞を、対象に局所投与および／または全身投与する。あるいは、対象の疾患もしくは状態の予防、治療または寛解に治療上有効な量を送達するために、CSRアイソフォームを発現するアデノウイルス粒子を単離して製薬上許容される担体中に配合する。典型的には、アデノウイルス粒子を対象の重量1 kgあたり粒子1個～ 10^{14} 個の範囲、一般に対象の重量1 kgあたり粒子 10^6 または 10^8 個～ 10^{12} 個の範囲の用量で送達する。一部の状況では、核酸源を、細胞表面膜タンパク質もしくは標的細胞に特異的な抗体または標的細胞上の受容体に対するリガンドなどの細胞を標的とする薬剤と共に提供することが望ましい。

10

【0437】

CSRアイソフォームをウイルスによって発現させ、そのウイルスを、治療を必要としている対象に投与することができる。遺伝子治療に適したウイルスベクターには、たとえば、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスが含まれる。アデノウイルス発現技術は当分野で周知であり、アデノウイルスの産生および投与方法も周知である。アデノウイルスの血清型は、たとえばアメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC、メリーランド州Rockville）から入手可能である。アデノウイルスをex vivoで用いることができ、たとえば、治療を必要としている患者から細胞を単離し、CSRアイソフォームを発現するアデノウイルスベクターを用いて形質導入する。適切な培養期間ののち、形質導入された細胞を、対象に局所投与および／または全身投与する。別例として、対象の疾患もしくは状態の予防、治療または寛解に治療上有効な量を送達するために、CSRアイソフォームを発現するアデノウイルス粒子を単離して製薬上許容される担体中に配合する。典型的には、アデノウイルス粒子を、対象の重量1 kgあたり粒子1個～ 10^{14} 個の範囲、一般に対象の重量1 kgあたり粒子 10^6 または 10^8 個～ 10^{12} 個の範囲の用量で送達する。一部の状況では、核酸源を、細胞表面膜タンパク質もしくは標的細胞に特異的な抗体または標的細胞上の受容体に対するリガンドなどの細胞を標的とする薬剤と共に提供することが望ましい。リボソームを用いる場合は、標的化ならびに／または取込みの促進のために、エンドサイトーシスに関連する細胞表面膜タンパク質と結合するタンパク質、たとえばキャプシドタンパク質もしくは特定の細胞種に向性を有するその断片、サイクリングにおいて内部移行を受けるタンパク質に対する抗体、および細胞内局在化を標的として細胞内半減期を亢進するタンパク質を用い得る。

20

30

【0438】

b. 人工染色体および他の非ウイルスベクターの送達方法

また、CSRアイソフォームを、非ウイルスベクターを用いたex vivo遺伝子発現治療で用いることもできる。たとえば、細胞を操作してCSRアイソフォームを発現するものを作製することができ、これは、調節配列に動作可能に連結して、またはゲノム位置内で調節配列に動作可能に連結して配置されるように、CSRアイソフォーム配列をゲノム位置内に組み込むことなどによる。その後、このような細胞を、治療を必要としている患者などの対象に局所投与または全身投与することができる。

40

【0439】

核酸分子を人工染色体および他の非ウイルスベクター内に導入することができる。人工染色体（たとえば、U. S. Patent No. 6, 077, 697およびPCT国際PCT出願の国際公開第02/097059号パンフレット参照）は、アイソフォームをコードしてそれを発現するように操作することができる。

【0440】

c. リボソームおよび他のカプセル封入された形態ならびに核酸を含む細胞の投与

50

核酸をリボソームなどのベヒクル中にカプセル封入するか、または細菌細胞、特に弱毒化した細菌などの細胞内に導入するもしくはウイルスベクター内に導入することができる。たとえば、リボソームを用いる場合は、標的化ならびに／または取込みの促進のために、エンドサイトーシスに関連する細胞表面膜タンパク質と結合するタンパク質、たとえばキャプシドタンパク質もしくは特定の細胞種に向性を有するその断片、サイクリングにおいて内部移行を受けるタンパク質に対する抗体、および細胞内局在化を標的として細胞内半減期を亢進するタンパク質を用い得る。

【0441】

2. *in vitro*および*ex vivo*送達

*ex vivo*および*in vivo*方法には、CSRアイソフォームをコードしている核酸分子を、適切なドナーまたは治療する対象由来である細胞内に導入する。CSRアイソフォームの*in vivo*発現は、さらなる分子の発現と連関している可能性がある。たとえば、CSRアイソフォームの発現は、操作したウイルス中などの細胞毒性がある産物の発現、または細胞毒性があるウイルス中で発現された細胞毒性産物と連関している可能性がある。このようなウイルスは、治療効果の標的である特定の細胞種を標的とすることができる。発現されたCSRアイソフォームは、ウイルスの細胞毒性を亢進するために用いることができる。

【0442】

CSRアイソフォームの*in vivo*発現には、CSRアイソフォームをコードしている核酸分子を、細胞に特異的なまたは組織に特異的なプロモーターなどの特異的調節配列に動作可能に連結させることが含まれていることができる。また、CSRアイソフォームは、標的細胞種および／もしくは組織中で特異的に感染ならびに／または複製されるベクターから発現させることもできる。誘導性プロモーターを用いてCSRアイソフォームの発現を選択的に調節することができる。

【0443】

治療目的のために核酸を導入することができる細胞には、それだけには限定されないが、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞；Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球などの血液細胞；様々な幹細胞または前駆細胞、具体的には造血幹細胞または前駆細胞、たとえば骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝臓、およびそれらの他の源から得た幹細胞などを含めた、治療する疾患または状態に適した任意の所望する利用可能な細胞種が包含される。また、腫瘍細胞もCSRアイソフォームの*in vivo*発現の標的細胞であることができる。また、アイソフォームの*in vivo*発現に用いる細胞には、患者の自己細胞も含まれる。このような細胞を患者から取り出し、CSRアイソフォームを発現させるための核酸を導入し、その後、注射または移植などによって患者に投与することができる。

【0444】

核酸を*in vitro*で哺乳動物細胞内に移行させるために適切な技術には、リボソームおよびカチオン性脂質の使用（たとえば、DOTMA、DOPEおよびDC-Chol）、電気穿孔、微量注入、細胞融合、DEAE-デキストラン、ならびにリン酸カルシウム沈降方法が含まれる。DNA送達方法を用いてCSRアイソフォームを*in vivo*で発現させることができる。このような方法には、電気穿孔、超音波、リン酸カルシウム送達を用いたものなどの局所送達および全身送達を含めた、核酸のリボソーム送達ならびに裸のDNAの送達が含まれる。他の技術には、微量注入、細胞融合、染色体媒介遺伝子導入、微小核体媒介遺伝子導入およびスフェロプラスト融合が含まれる。

【0445】

*ex vivo*治療では、治療する対象に適合性のあるドナーからの細胞または治療する対象の細胞を取り出し、核酸をこれら単離した細胞内に導入し、改変した細胞を対象に投与する。

【0446】

治療には、直接投与、たとえば多孔性膜内にカプセル封入したものなどが含まれ、これ

10

20

30

40

50

を患者に移植する（たとえばU. S. Pat. Nos. 4, 892, 538および5, 283, 187参照）。核酸を*in vitro*で哺乳動物細胞内に移行させるために適した技術には、リポソームおよびカチオン性脂質の使用（たとえば、DOTMA、DOPEおよびDC-Chol）、電気穿孔、微量注入、細胞融合、DEAE-デキストラン、ならびにリン酸カルシウム沈降方法が含まれる。DNA送達方法を用いてCSRアイソフォームを*in vivo*で発現させることができる。このような方法には、電気穿孔、超音波、リン酸カルシウム送達を用いたものなどの局所送達および全身送達を含めた、核酸のリポソーム送達ならびに裸のDNAの送達が含まれる。他の技術には、微量注入、細胞融合、染色体媒介遺伝子導入、微小核体媒介遺伝子導入およびスフェロプラスト融合が含まれる。

10

【0447】

CSRアイソフォームの*in vivo*発現は、さらなる分子の発現と関連している可能性がある。たとえば、CSRアイソフォームの発現は、操作したウイルス中などの細胞毒性がある産物の発現、または細胞毒性があるウイルス中で発現された細胞毒性産物と関連している可能性がある。このようなウイルスは、治療効果の標的である特定の細胞種を標的とすることができる。発現されたCSRアイソフォームは、ウイルスの細胞毒性を亢進するために用いることができる。

【0448】

CSRアイソフォームの*in vivo*発現には、CSRアイソフォームをコードしている核酸分子を、細胞に特異的なまたは組織に特異的なプロモーターなどの特異的調節配列に動作可能に連結させることが含まれていることができる。また、CSRアイソフォームは、標的細胞種および／もしくは組織中で特異的に感染ならびに／または複製されるベクターから発現させることもできる。誘導性プロモーターを用いてCSRアイソフォームの発現を選択的に調節することができる。

20

【0449】

3. 全身送達、局所送達および表面送達

裸の核酸としての核酸分子、またはベクター、人工染色体、リポソームおよび他のベヒクル中の核酸分子は、全身投与、表面的、局所的および他の投与経路によって対象に投与することができる。全身投与および*in vivo*投与する場合、核酸分子または核酸分子を含むベヒクルは、細胞を標的とすることができる。

30

【0450】

また、投与は、典型的には細胞もしくは組織を標的とするベクターまたは細胞の投与などによる、直接投与であることができる。たとえば、腫瘍細胞および増殖細胞を、CSRアイソフォームの*in vivo*発現の標的細胞とすることができる。また、アイソフォームの*in vivo*発現に用いる細胞には、患者の自己細胞も含まれる。このような細胞を患者から取り出し、CSRアイソフォームを発現させるための核酸を導入し、その後、注射または移植などによって患者に投与することができる。

【0451】

K. CSRおよび血管形成

CSRは、様々な経路に関わる経路に関与し、これにはとりわけ、血管形成、細胞増殖、炎症反応、および血管新生に関与するものが含まれる。血管形成とは、新しい血管が形成されるプロセスである。これは、健康な個体において創傷治癒の間などに、および異常状態において腫瘍中などで起こる。これは、たとえば、健康な身体において創傷治癒中に、および傷害または外傷後に組織へ血流を復活させるために起こる。血管形成は、増殖中の腫瘍塊を養うために血液細胞の増殖を要する腫瘍化の構成要素である。女性では、血管形成は、子宮の内層を再生するための毎月の生殖周期の間、排卵中に卵子を成熟させるため、および妊娠中に胎盤を作るためにも起こる。

40

【0452】

血管形成は、一連の「オン」および「オフ」スイッチによって制御される。主要な「オン」スイッチは血管形成刺激成長因子である。主要な「オフスイッチ」は血管形成阻害剤

50

である。血管形成成長因子が血管形成阻害剤よりも過剰に産生された場合、バランスは血管増殖に有利となる場合がある。阻害剤が刺激因子よりも過剰に存在する場合、血管形成が停止する。健康な身体は血管形成モジュレーターのバランスを保っている。いくつかの血管形成成長因子が知られている。これらには、たとえば、アンジオゲニン、アンジオポイエチン-1、D e l-1、酸性 (a F G F) および塩基性 (b F G F) 線維芽細胞成長因子、フォリスタチン、顆粒球コロニー刺激因子 (G-C S F)、肝細胞成長因子 (H G F)、散乱係数 (S F)、インターロイキン-8 (I L-8)、レプチン、ミッドカイン、胎盤性成長因子、血小板由来内皮細胞成長因子 (P D-E C G F)、血小板由来成長因子-B B (P D G F-B B)、プレイオトロフィン (P T N)、プログラニュリン、プロリフェリン、トランスフォーミング成長因子- α (T G F- α)、トランスフォーミング成長因子- β (T G F- β)、腫瘍壊死因子- α (T N F- α)、および血管内皮成長因子 (V E G F) / 血管透過性因子 (V P F) が含まれる。

10

【0453】

1. 血管形成および疾患

血管形成因子 (正および負) の細胞性受容体は、複数の疾患プロセス、たとえば血管形成成長因子のバランスが変更されたおよび/または血管形成の量もしくはタイミングが変更されている疾患ならびに状態において、介入点として作用することができる。たとえば、血液を腫瘍の病巣に供給する血管形成、炎症反応、および他の異常な血管形成関連状態などの一部の状況では、「多すぎる」血管形成は有害な場合がある。腫瘍の増殖、または慢性炎症における増殖部位は、一般に、その代謝要件を支持するために近隣の血管および血管内皮細胞の動員を要する。これは、組織中の酸素の拡散が制限されているからである。血管形成を要する例示的な状態には、それだけには限定されないが、病的骨髄中で血管数の増加が観察される固形腫瘍ならびにリンパ腫、急性白血病、および多発性骨髄腫などの血液学的悪性疾患が含まれる。

20

【0454】

原発性腫瘍の増殖および転移部位の形成の重大な要素は血管形成スイッチ、すなわち腫瘍または炎症部位が既に存在する宿主血管から新しい毛細血管の形成を促進する能力である。この文脈中で用いる血管形成スイッチとは、癌および関節リウマチなどの炎症性疾患の進行に必要な疾患関連の血管形成をいう。これは、最終的には疾患状態の組織の増殖を支持するために新しい血管の伸長をもたらす生理活性のカスケードを活性化させるスイッチである。新血管形成の刺激には、低酸素症、炎症、および疾患細胞の遺伝子発現を変更する癌遺伝子または腫瘍抑制因子における遺伝子病変が含まれる。

30

【0455】

また、血管形成は炎症性疾患においても役割を果たす。このような疾患は、腫瘍の病巣に類似した増殖性構成成分を有する。関節リウマチでは、この一成分は、パンスの形成をもたらす滑膜線維芽細胞の異常増殖によって特徴づけられている。パンスは、形質転換細胞のある程度の表現型特徴を有する滑膜線維芽細胞からなる。パンスが関節内で増殖するにつれて、多くの前血管形成シグナルが発現され、腫瘍の新血管形成要件と同じ要件が多く経験される。さらなる血液供給、すなわち新血管形成の必要性は重大である。同様に、多くの慢性炎症状態は、それを構成する細胞の一部が通常は形質転換細胞に起因する特徴を有し得る、増殖性構成成分も有する。

40

【0456】

過剰な血管形成に関与する状態の別例は、糖尿病性網膜症である (L i p 他、B r J O p h t h a l m o l o g y、88:1543、2004)。糖尿病性網膜症は血管形成、炎症性および増殖性の構成成分を有し、V E G F およびアンジオポイエチン-2 の過剰発現が一般的である。この過剰発現は疾患関連のリモデリングおよび血管の枝分かれに必要である可能性が高く、これは、疾患の増殖性構成成分を支持する。

【0457】

2. 血管形成

血管形成には、循環内皮細胞前駆体 (C E P) の動員、成長因子による新しい内皮細胞

50

(EC)の増殖の刺激、プロテアーゼによるECMの分解、ECの増殖、および炎症によって引き起こされる腫瘍部位または別の増殖部位であることができる標的への遊走を含めた数個のステップが含まれる。これは、最終的には新しい毛細管の形成をもたらす。このような血管は必ずしも構造が正常ではない。これらは無秩序な構造および血流を有している可能性がある。血管内皮成長因子(VEGF)およびアンジオポイエチンなどの血管形成調節因子の不釣り合いが原因で、腫瘍部位または炎症部位に供給する新しい血管は蛇行状かつ拡張しており、不均一な直径、過剰の枝分かれ、および短絡を有する。血流は変化しやすく、低酸素症およびアシドーシスの領域により、低酸素症によって誘導されるアポトーシス(多くの場合、p53の発現の損失による)に対して耐性を有する変異体ならびに前血管形成シグナルの生成の亢進の選択がもたらされる。疾患関連の血管壁は、数々の開口部、広がった内皮間接合点、および不連続の基底膜を有するか、または基底膜が存在しない。これは、これらの血管の血管透過性が高いことに貢献し、機能的なリンパ管/排泄法の欠如と一緒に、間質性高血圧を引き起こす。疾患関連の血管は、通常は組織の代謝要求に応答して血管作動性の制御を調節する、周皮細胞および平滑筋細胞などの血管周囲細胞を欠いている可能性がある。正常な血管とは異なり、腫瘍血管の血管内膜はECの均一な層ではなく、多くの場合、ECおよび腫瘍細胞のモザイクからなる。腫瘍細胞によって分泌されたECMによって裏打ちされている可能性がある、癌細胞由来の血管チャネルの概念を、血管模倣と呼ぶ。

10

【0458】

血管が迅速に急性炎症部位を浸潤する場合に、同様の状況が起こる。血管形成血管のECは、ECの0.01%のみが分裂している成人の血管中に見つかる静止状態のECとは異なる。腫瘍の血管形成の間、ECは増殖性が高く、成長因子受容体およびインテグリンなどの接着分子を含めた、活性内皮に特徴的ないくつかの形質膜タンパク質を発現する。腫瘍は、その血管化を促進するためにいくつかの機構を利用し、それぞれの事例において、この目的に適するように正常な血管形成プロセスを覆す。このため、内皮に関連した増殖性因子および構造的因子(新血管構造の枝分かれの増加を許容する)のどちらにおいても、癌または慢性炎症性疾患と同様に、疾患の病巣においても血管形成因子の産生の増加が起こる可能性が高い。

20

【0459】

3. 血管形成における細胞表面受容体

30

RTKを含めた細胞表面受容体およびそのリガンドは、血管形成の調節において役割を果たす(たとえば図1参照)。血管形成内皮は、静止内皮上では見つからないいくつかの受容体を発現する。これには、細胞外基質に結合して内皮細胞の接着、遊走、および侵襲を媒介する受容体チロシンキナーゼ(RTK)ならびにインテグリンが含まれる。

【0460】

また、内皮細胞(EC)は、多くの他の細胞種上に見つかるRTK(すなわちFGFおよびPDGF受容体)も発現する。活性化されたRTKによって媒介される機能には、内皮細胞の増殖、遊走、および生存の亢進、ならびに血管周囲細胞および血液に運ばれる循環内皮前駆体や造血幹細胞の腫瘍への動員の調節が含まれる。血管形成に関与しているCSRの一例はVEGFRである。VEGFR-1受容体およびVEGF-Aリガンドは、血管形成における細胞の増殖、遊走および分化に関与している。VEGF-Aは、RTK、VEGFR-1およびVEGFR-2への結合によって血管形成を調節する少なくとも4つのアイソフォームを有する、ヘパリン結合糖タンパク質である。これらのVEGF受容体は、すべてのEC、および造血細胞のサブセット上で発現される。VEGFR-2はECの増殖、遊走、および生存を調節し、一方で、VEGFR-1はECにおいてR1の拮抗剤として作用し得るが、胚形成中の血管芽細胞の分化においても役割を果たすことができる。

40

【0461】

さらなるシグナル伝達経路も血管形成に関与している。間質細胞によって産生されるアンジオポイエチン、Ang1はEC RTK TEKに結合し、密な漏れのない血管を形

50

成するためのECとECMならびに周皮細胞および平滑筋細胞などの血管周囲細胞との相互作用を促進する。PDGFおよび塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)はこれら血管周囲細胞の動員を補助する。成熟血管の静止状態および安定性を維持し、通常VEGFおよび炎症性サイトカインによって誘導される血管透過性を予防するためには、Ang1が必要である。

【0462】

間質細胞または炎症細胞によって分泌された、bFGF、トランスフォーミング成長因子- α 、TNF- α 、およびIL-8を含めた前血管形成サイトカイン、ケモカイン、および成長因子は、血管新生に重要な貢献を行う。正常な内皮とは対照的に、血管形成内皮は、ECの接着、遊走、および生存を媒介するECM結合タンパク質のインテグリンファミリーの特異的メンバーを過剰発現する。インテグリンは、ECの拡散および遊走を媒介し、VEGFおよびbFGFによって誘導される血管形成に必要であり、これは立ち代ってECのインテグリン発現のアップレギュレーションを行うことができる。EC接着分子をアップレギュレーションすることができる(すなわちVEGF、TNF- α による)。VEGFは、循環内皮細胞前駆体(CEP)および造血幹細胞(HSC)の腫瘍への流動ならびに動員を促進し、ここでこれらは共存し、新血管形成に協力すると考えられる。CEPはVEGFR-2を発現し、一方で、HSCはVEGFR-1、受容体、またはVEGFおよびPLGFを発現する。CEPおよびHSCはいずれも共通の前駆体、すなわち血管芽細胞に由来する。CEPはECへと分化すると考えられており、一方、HSC由来細胞(腫瘍関連マクロファージなど)の役割は、EC(VEGF、bFGF、アンジオポイエチン)の発芽および安定化に必要な血管形成因子を分泌する、ならびにMMPを活性化させてECMのリモデリングおよび成長因子の放出をもたらすことであり得る。マウス腫瘍モデルおよびヒトの癌では、数多くのCEPおよびVEGFR-1またはVEGFRを発現するHSCのサブセットを循環中に検出することができ、これは血清VEGFレベルの上昇と相関している可能性がある。

【0463】

4. 腫瘍および炎症性疾患

腫瘍は、宿主ECの増殖および腫瘍内への遊走を誘導する、内皮成長因子のVEGFファミリーなどの向性の血管形成因子を分泌する。腫瘍血管は、増殖および生存について正常なECよりもVEGFRシグナル伝達に依存的であると考えられる。正常および病理性の血管形成における発芽は、ECおよびそのリガンド上に発現された3つの膜貫通RTKファミリー、すなわち疾患部位の微小環境中で腫瘍細胞、炎症細胞、または間質細胞によって産生されるVEGF、アンジオポイエチン、およびエフリンによって調節される。腫瘍または炎症性疾患関連の血管形成は、微小環境からのシグナルに応答して増殖、遊走、浸潤、および分化する多くの異なる細胞種を含む、複雑なプロセスである。内皮細胞(EC)はVEGF、bFGF、Ang2、および他の前血管形成刺激に応答して宿主血管から発芽する。発芽は、VEGF/VEGFR-2、Ang2/TEK、およびインテグリン/細胞外基質(ECM)の相互作用によって刺激される。骨髓由来の循環内皮前駆体(CEP)は、VEGFに応答して腫瘍へと遊走し、ECへと分化する一方で、造血幹細胞は血管形成成長因子を分泌する腫瘍/疾患部位関連のマクロファージを含めた白血球へと分化し、ECMのリモデリングを行って結合された成長因子を放出するMMPを産生する。

【0464】

腫瘍細胞が無血管性領域中に生じるまたはそこに転移した場合、これらは、低酸素および栄養素の欠乏によって制限される大きさまで増殖する。他の局在増殖性疾患でも起こる可能性が高いこの状態は、血管形成因子を産生する細胞の選択をもたらす。腫瘍血管形成の主要な調節因子である低酸素は、転写因子低酸素誘導性因子(HIF)1の安定化を含むプロセスによって、VEGFをコードしている遺伝子(または複数の遺伝子)の転写誘導を引き起こす。正常酸素圧条件下では、EC HIF-1レベルは、VHL(フォンヒッペル-リンダウ)腫瘍抑制因子位置によってコードされているユビキチンE3-リガ

ーゼに調節される、プロテアソームに媒介される破壊によって低く維持される。しかし、低酸素条件下では、H I F-1 タンパク質はヒドロキシル化されず、V H Lとの会合が起こらない。したがって、H I F-1 レベルが上昇し、V E G Fを含めた標的遺伝子、一酸化窒素合成酵素（N O S）、およびA n g 2が誘導される。家族性および散発性の腎細胞癌で起こるV H L遺伝子の損失も、H I F-1 の安定化およびV E G Fの誘導をもたらす。乏しい血流が原因でほとんどの腫瘍が低酸素領域を有し、この領域内の腫瘍細胞はH I F-1 発現について陽性に染色される。これが、胚の発生、ならびに正常下（創傷治癒、黄体形成）および病的プロセス（腫瘍血管形成、関節リウマチなどの炎症状態）における血管形成中に起こる、分化中の内皮細胞から血管の新規形成をもたらす条件である。

【0465】

たとえば腫瘍の病巣を増殖させることまたは関節リウマチにおけるパニヌスの形成によって産生し得る疾患状態の細胞由来のV E G Fでは、宿主血管からの発芽を開始させるために、A n g 1 / T E K経路によって与えられた安定性を攪乱させなければならない。これは、活動的なリモデリングを受けているE CによるA n g 2の分泌によって起こる。A n g 2はT E Kに結合し、A n g 1の作用の競合的阻害剤である。A n g 2の影響下では、既存の血管がリモデリングシグナルに対してより応答性をもち、E Cのストローマおよび関連する血管周囲細胞への接着が低下し、V E G Fへの応答性が増える。したがって、宿主E Cを血管形成シグナルに対してより感度をもたせることによって血管構造を不安定化するために、A n g 2が新血管形成の初期段階に必要である。腫瘍のE CはA n g 2によって遮断されるので、A n g 1 / T E Kの相互作用による安定化は存在せず、腫瘍の血管は漏れが多く、易出血性であり、E Cと下に横たわるストローマとの会合が乏しい。発芽腫瘍のE Cは、膜貫通タンパク質エフリン-B 2およびその受容体、R T K E P Hを高レベルで発現し、そのシグナル伝達は血管のリモデリングの間、アンジオポイエチンと共に作動すると考えられる。胚の形成中では、E P H受容体は原始静脈の内皮上で発現され、一方で、膜貫通りガンドエフリン-B 2は原始動脈の細胞によって発現される。同様の表現を血管構造の分化およびパターン形成の規制に用い得る。

【0466】

また、腫瘍リンパ管の発生も、V E G F R-3ならびにそのリガンドV E G F-CおよびV E G F-Dなどの細胞表面受容体の発現に関連づけられている。上述のように、腫瘍内の間質圧力が高く、ほとんどのリンパ管が崩壊した機能的でない状態で存在し得るので、所属リンパ節への腫瘍細胞転移におけるこれらの血管の役割は依然として決定されていない。しかし、肺、前立腺、および結腸直腸癌を含めた原発性ヒト腫瘍におけるV E G F-Cのレベルは、所属リンパ節への転移と有意に相関しており、したがって、原発部位からリンパ節およびその先までの腫瘍細胞の出口を維持することによって、V E G F-C, D / R 3の発現が疾患の拡散に寄与し得ることが可能である。

【0467】

5. 細胞表面受容体ならびに血管形成病および血管形成状態の治療

血管形成、血管新生および／または細胞増殖の変調を用いて、血管形成が役割を果たす疾患および状態を治療することができる。たとえば、血管形成阻害剤は、その多くが腫瘍中の活性化された内皮に独特である、E Cの増殖、遊走、および／または生存に関与する重要な分子経路を標的化することによって、機能することができる。成長因子および接着依存性のシグナル伝達経路の阻害は、同時に腫瘍増殖の阻害を伴ったE Cのアポトーシスを誘発する可能性がある。腫瘍の血管構造を含むE Cは遺伝的に安定しており、腫瘍細胞と遺伝的变化を共有しない。したがって、E Cのアポトーシス経路は無傷である。腫瘍血管のそれぞれのE Cは多くの腫瘍細胞への栄養の供給を補助し、腫瘍の血管形成はいくつかの外来性前血管形成刺激に駆動されることができ、実験データから、単一の成長因子（たとえばV E G F）の遮断により腫瘍誘導性の血管増殖を阻害できることが示される。腫瘍血管は正常な血管とは明確に異なるので、正常な血管に影響を与えることなくこれらを選択的に破壊し得る。

【0468】

細胞表面受容体は血管形成の調節に関与しているので、これらを、血管形成に関与する疾患および状態の治療の治療的標的とすることができる。本明細書では、血管形成プロセスの1つまたは複数のステップを変調することができるC S Rアイソフォームを提供する。C S Rアイソフォームは、単独で、平行して、または他の組合せで投与することができる。たとえば、b F G Fによって誘発される血管形成は、C S Rアイソフォームなどb F G F Rの阻害剤によって遮断することができ、ひいてはこれがV E G F経路の活性化を阻害することができる。また、V E G F R経路をV E G F Rアイソフォームによって遮断することもできる。また、血管形成を変調するために、A n g / T E Kおよびエフリン / E P H経路を変調するC S Rアイソフォームを投与することもできる。V E G F R、b F G F、A n g 2、T N F - α 、T G F - α 、およびエフリン拮抗剤などの他の因子の活性の拮抗剤として作用するC S Rアイソフォームを、投与することができる。これらのリガンドおよびその受容体は、新しい内皮細胞の誘引、および / あるいは循環内皮前駆体 (C E P) からの分化または管の形成もしくは枝分かれの必要性のいずれかを阻害することによる、血管へのその構造的形質転換に必要である。したがって、これらの因子のうちの1つまたは複数の拮抗により、癌および炎症性疾患の発生および進行を阻害することができる。本明細書中に記載のように、このような疾患および状態の治療剤としてC S Rアイソフォームを投与することができる。

【0469】

L. C S Rアイソフォームを用いた例示的な治療および研究

本明細書では、C S Rアイソフォームを用いた疾患および状態の治療方法を提供する。R T KアイソフォームおよびT N F RアイソフォームなどのC S Rアイソフォームを、本明細書中に記載のものを含めた様々な疾患および状態の治療で用いることができる。治療は、適切な経路でポリペプチドの配合物を投与することによって行うことができる、これは、標的送達のためもしくはリボソームなどの送達ベヒクル中にカプセル封入して、ポリペプチドとして組成物中で提供することができ、また標的化剤と連結させることができる。あるいは、ポリペプチドをコードしている核酸を裸の核酸として、またはベクター、特に遺伝子治療ベクター中で投与することができる。遺伝子治療は、当業者に知られている任意の方法によって行うことができる。遺伝子治療は、核酸またはベクターを直接投与することによってi n v i v oで行うことができる。たとえば、核酸を全身送達、局所送達、表面送達、または任意の適切な経路によって送達することができる。ベクターまたは核酸は、ウイルスもしくはリボソームなどの送達ベヒクル中に標的化剤を含めることによって標的とするか、または抗体などの標的化剤にコンジュゲートさせることができる。ベクターまたは核酸は、細胞を対象または適切なドナーから取り出し、ベクターまたは核酸を細胞内に導入し、その後、改変した細胞を対象内に導入することによって、e x v i v oで細胞に導入することができる。

【0470】

本明細書中に提供するC S Rアイソフォームは、様々な障害、特に増殖性、免疫性および炎症性の障害の治療に用いることができる。治療には、それだけには限定されないが、眼球疾患、アテローム性動脈硬化症、癌および血管損傷、アルツハイマー病を含めた神経変性疾患、アテローム性動脈硬化症を含めた炎症性疾患および状態、癌を含めた細胞増殖に関連する疾患および状態、および平滑筋細胞関連状態、ならびに様々な自己免疫疾患を含めた、血管形成関連病およびその状態の治療が含まれる。例示的な治療および前臨床研究が、R T KおよびT N F Rアイソフォームを用いた処置および治療について記載されている。このような記載は例示的であることのみを意図し、特定のR T KまたはT N F Rアイソフォームに限定されない。具体的な治療および用量は当業者が決定することができる。治療の評価における検討事項には、治療する疾患、疾患の重篤度および経過、分子を予防目的または治療目的のどちらのために投与するのか、以前の治療、患者の病歴および治療に対する応答、ならびに担当医の指示が含まれる。

【0471】

1. 血管形成関連状態

それだけには限定されないが、VEGFR、PDGFR、TIE/TEK、EGFR、およびEphAを含めたRTKアイソフォーム、ならびにTNFR1およびTNFR2を含めたTNFRアイソフォームは、血管新生を伴う眼球疾患を含めた、眼球の疾患および状態などの血管形成に関連する疾患ならびに状態の治療に用いることができる。眼球の血管新生病は、網膜または角膜などの眼の構造中への新しい血管侵襲によって特徴づけられている。これは失明の最も一般的な原因であり、約20種の眼疾患に関与している。年齢関連性の黄斑変性症では、関連するウイルス性の問題は、網膜色素上皮における維管束組織の増殖を伴ったブルッフ膜中の欠陥を介した脈絡毛細血管の内植によって引き起こされる。また、血管形成の損傷は、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、角膜移植拒絶、血管新生緑内障および水晶体後線維増殖症にも関連している。角膜血管新生に関連する他の疾患には、それだけには限定されないが、流行性角結膜炎、ビタミンA欠乏症、コンタクトレンズの過剰装着、アトピー性角膜炎、上輪部結膜炎、翼状片乾乾性角膜炎、シェーグレン、酒さ性ざ瘡、フリクテン症、梅毒、マイコバクテリア感染症、脂質の変性、化学熱傷、細菌性潰瘍、真菌性潰瘍、単純ヘルペス感染症、帯状疱疹感染症、原虫感染症、カポジ肉腫、モーレン潰瘍、テリエン周辺変性症、周辺角質溶解、関節リウマチ、全身性ループス、多発性動脈炎、外傷、ウェゲナーサルコイドーシス、強膜炎、スティーブンスジョンソン病、類天疱瘡放射状角膜切開、および角膜移植拒絶が含まれる。網膜／脈絡の血管新生に関連する疾患には、それだけには限定されないが、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、鎌状赤血球貧血、サルコイド、梅毒、弾性線維性偽黄色腫、バジェット病、静脈閉塞、動脈閉塞、頸動脈閉塞性疾患、慢性ブドウ膜炎／硝子体炎、マイコバクテリア感染症、ライム病、全身性エリテマトーデス、未熟児網膜症、イールズ病、ベーチェット病、網膜炎または脈絡膜炎を引き起こす感染症、推定眼ヒストプラスマ症、ベスト病、近視、視窩、スタルガルト病、扁平部炎、慢性網膜剥離、過粘稠度症候群、トキソプラズマ症、外傷およびレーザー後合併症が含まれる。他の疾患には、それだけには限定されないが、ルベオーシス（隅角の血管新生）に関連する疾患、および増殖性硝子体網膜症のすべての形態を含めた、維管束組織または線維組織の異常な増殖によって引き起こされる疾患が含まれる。

10

20

【0472】

眼球疾患の治療などにおける血管形成に対するRTKおよびTNFRアイソフォームの治療効果は、動物モデル、たとえば本明細書中に記載のものなどの角膜移植において評価することができる。たとえば、RTKなどにおける血管形成の変調は、ヌードマウスにおける類表皮A431腫瘍およびヌードマウスに移植した、VEGFまたはPIGFで形質導入したラットC6神経膠腫などの、ヌードマウスモデルで評価することができる。CSRアイソフォームは、タンパク質として局所注射または全身注射することができる。あるいは、CSRアイソフォームを発現する細胞を局所的にまたは腫瘍から離れた部位に接種することができる。腫瘍は、対照で処置したモデルおよびCSRアイソフォームで処置したモデル間で比較を行って、血管化の乏しい蒼白な腫瘍、壊死、増殖の低下および腫瘍細胞アポトーシスの増加を含めた、腫瘍の阻害の表現型を観察することができる。このような治療の1つでは、Flt-1アイソフォームを用いて眼球疾患を治療し、このようなモデルにおいて評価する。

30

【0473】

TIE/TEKアイソフォームを用いて治療することができる眼球障害の例は、それだけには限定されないが、糖尿病性網膜症（糖尿病の主要な合併症）、未熟児網膜症（高頻度で慢性の視覚問題をもたらし、失明のリスクが高いこの荒廃的な眼状態は、未熟児の介護における重篤な合併症である）、血管新生緑内障、網膜芽細胞腫、水晶体後線維増殖症、ルベオーシス、ブドウ膜炎、黄斑変性症、および角膜移植血管新生を含めた、眼球の血管新生によって特徴づけられている眼疾患である。他の眼の炎症性疾患、眼球腫瘍、および脈絡または虹彩の血管新生に関連する疾患も、TIE/TEKアイソフォームを用いて治療することができる。

40

【0474】

また、PDGFRアイソフォームも増殖性硝子体網膜症の治療に用いることができる。

50

たとえば、PDGFRアイソフォームをコードしている核酸分子を含む、レトロウイルスベクターなどの発現ベクターを構築する。この発現ベクターを含むウサギ結膜線維芽細胞(RCF)を、レトロウイルスベクターなどには形質移入によって、またはプラスミドもしくは染色体に基づいたベクターなどには形質転換によって産生する。PDGFRアイソフォームの発現は、PDGFRアイソフォームを認識する抗体の使用ならびにペプチドタグ(たとえばmycタグ)および対応する抗体の使用を含めた、当分野で知られている手段によって、細胞中で監視することができる。RCFを眼の硝子体部分に注射する。たとえば、ウサギ動物モデルでは、約 1×10^5 RCFを、気体硝子体切除(gas vitrectomy)によって注射する。PDGFRアイソフォームを発現するレトロウイルスの $\sim 2 \times 10^7$ CFUを同じ日に注射する。疾患症状の減衰などの増殖性硝子体網膜症に対する効果は、たとえば手術の2～4週間後に観察することができる。

10

【0475】

EphAアイソフォームを用いて、眼疾患などにおいて誤調節されたおよび／もしくは不適切な血管形成を有する疾患または状態を治療することができる。たとえば、EphAアイソフォームを、マウス角膜モデルなどの動物モデルにおいて、エフリンA-1誘導性の血管形成に対する効果について評価することができる。エフリンA-1を単独でまたはEphAアイソフォームタンパク質と共に含むヒドロペレットを、マウスの角膜に移植する。移植後の日に視覚的な観察を行い、EphAアイソフォームの阻害または血管形成の低下を観察する。VEGFRアイソフォームについて記載したものなどの抗血管形成治療および方法がEphAアイソフォームに適応可能である。

20

【0476】

2. 血管形成関連アテローム性動脈硬化症

RTKアイソフォーム、たとえばVEGFR Flt-1およびTIE/TEKアイソフォームを用いて、アテローム性動脈硬化性斑の血管新生などの、アテローム性動脈硬化症に関連する血管形成状態を治療することができる。血管の管腔内に形成された斑は、血管形成刺激活性を有することが示されている。ヒト冠状動脈アテローム硬化性の病変におけるVEGFの発現は、ヒト冠状動脈アテローム性動脈硬化症の進行に関連している。

【0477】

動物モデルを用いて、アテローム性動脈硬化症の治療においてRTKアイソフォームを評価することができる。アポリポタンパク質-E欠乏マウス(ApoE^{-/-})はアテローム性動脈硬化症を罹患しやすい。このようなマウスは、RTKアイソフォーム、たとえばFlt-1イントロン融合タンパク質などのVEGFRアイソフォームを、5、10および20週齢から開始して5週間などの一定期間の間注射することによって治療する。アイソフォームで処置したマウスにおけるアテローム硬化性病変の低下を観察するために、大動脈起始部の病変を、対照ApoE^{-/-}マウスとアイソフォームで処置したApoE^{-/-}マウスとの間で評価する。

30

【0478】

3. さらに血管形成関連治療

VEGFRアイソフォーム、たとえばFlt1アイソフォームなどのRTKアイソフォーム、ならびにEphAアイソフォームも、関節リウマチ(RA)などにおいて存在する、滑膜細胞の増殖、炎症細胞の浸潤、軟骨の破壊およびパンスの形成などの血管形成ならびに炎症性関連の状態の治療に用いることができる。マウスで誘導した多関節関節炎などの、II型コラーゲン誘導性関節炎の自己免疫モデルを、ヒトRAのモデルとして用いることができる。タンパク質の局所注射などによってVEGFRアイソフォームで治療したマウスを、足の膨張、紅班および強直症を含めた関節炎の症状の低下について観察することができる。また、滑膜血管形成および滑膜炎の低下も観察することができる。

40

【0479】

VEGFRアイソフォームを用いた治療が受け入れられる他の血管形成関連状態には、血管腫が含まれる。小児期に最も頻繁に起こる血管形成病の1つが血管腫である。ほとんどの症例で、腫瘍は良性であり、介入なしに消失する。より重篤な症例では、腫瘍は大き

50

な空洞性かつ浸潤性のある型に進行し、臨床的合併症を生じる。血管腫の全身性形態である血管腫症は、死亡率が高い。現在用いられている治療剤では治療することができない、または治療が困難な血管腫の症例が数多く存在する。

【0480】

VEGFRアイソフォームを、オスラー・ウェーバー・ランドー病、または遺伝性易出血性毛細血管拡張などの、血管形成が損傷の原因であるそのような疾患および状態の治療に用いることができる。これは、複数の小さな血管腫、すなわち血液またはリンパ管の腫瘍によって特徴づけられている、遺伝する疾患である。血管腫は皮膚および粘膜中に見つかり、多くの場合、鼻出血（鼻血）または消化管出血および場合によっては胚または肝臓の動静脈瘻を伴う。また、望ましくない血管透過性によって特徴づけられている疾患および障害も、VEGFRアイソフォームによって治療することができる。これには、脳腫瘍に関連する浮腫、悪性疾患に関連する腹水、メーグス症候群、肺炎症、ネフローゼ症候群、心外膜液および胸水が含まれる。

【0481】

また、血管形成は、再生および創傷治癒などの正常な生理的プロセスにも関与している。血管形成は排卵の重要なステップであり、受精後の胞胚の着床にも重要なステップである。VEGFRアイソフォームによる血管形成の変調を用いて、排卵を遮断するまたは胞胚の着床を予防するために無月経を誘発することができる。VEGFRアイソフォームも手術手順で用いることができる。たとえば、創傷治癒では、過剰の修復または線維増殖が手術手順の有害な副作用となる場合があり、これは血管形成によって引き起こされるまたは悪化する場合がある。癒着は手術の頻繁な合併症であり、小腸閉塞などの問題をもたらす。

【0482】

PDGFRアイソフォームを、動脈手術などにおける動脈傷害後の新生内膜形成の調節に用いることができる。たとえば、PDGFR-Bアイソフォームを用いて、新生内膜形成に関与しているものなどのPDGF-BB誘導性の細胞増殖を調節することができる。PDGFRアイソフォームは、たとえば、バルーン損傷の雄鶏大腿動脈モデルにおいて評価することができる。PDGFRアイソフォームを発現するアデノウイルスベクターを構築し、動脈モデルに*in vivo*で形質導入した。新生内膜関連の血栓症を形質導入した動脈で評価して、対照と比較した場合の低下を観察した。

【0483】

血管形成関連病およびその状態の治療に有用なRTKアイソフォームは、抗血管形成薬、VEGFRリガンドの変調を含めてRTK関連経路において他のシグナル伝達分子と相互作用する分子などとの併用療法で用いることもできる。たとえば、既知の抗リウマチ薬であるブシラミン（BUC）は、その作用機構に滑膜細胞によるVEGF産生の阻害を含むことが示された。BUCの抗リウマチ効果は、滑膜細胞によるVEGF産生の阻害による、関節炎滑膜における血管形成および滑膜増殖の抑制に媒介される。このような薬物とVEGFRアイソフォームとの併用療法により、治療の複数の作用機構および作用部位を可能とすることができる。

【0484】

4. 癌

EGFR、TIE/TEK、VEGFRおよびFGFRのアイソフォームなどのRTKアイソフォームを癌の治療に用いることができる。それだけには限定されないが、ErBB2およびErBB3アイソフォームなどのEGFR RTKアイソフォーム、Flt1アイソフォームなどのVEGFRアイソフォーム、FGFR-4アイソフォームなどのFGFRアイソフォーム、ならびにEphA1アイソフォームを含めたRTKアイソフォームを、癌の治療に用いることができる。本発明で治療する癌の例には、それだけには限定されないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病またはリンパ性悪性疾患が含まれる。このような癌のさらなる例には、扁平細胞癌（たとえば上皮扁平細胞癌）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌および肺扁平上皮癌を含めた肺癌、腹膜癌、肝細胞癌、

10

20

30

40

50

消化管癌を含めた消化管 (g a s t r i c) 癌または胃 (s t o m a c h) 癌、膵臓癌、膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌もしくは子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌 (k i d n e y) または腎臓 (r e n a l) 癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、ならびに頭頸部癌が含まれる。併用療法は、抗ホルモン性化合物、心保護剤、ならびに化学療法剤および増殖阻害剤などの抗癌剤を含めた E G F R アイソフォームと共に用いることができる。

【0485】

E G F R アイソフォームを用いて治療可能な癌は、一般に、E G F R 受容体または E G F リガンドが相互作用する受容体を発現する癌である。このような癌は当業者に知られており、および／または E G F R の発現を検出するための当分野で知られている任意の手段によって同定することができる。E r b B 2 発現の利用可能な診断的／予後的アッセイの例には、H E R C E P T E S T . R T M . (D a k o) が含まれる。パラフィンに包埋した腫瘍生検の組織切片を I H C アッセイに供し、E r b B 2 タンパク質の染色強度基準を認容した。閾値よりも低いスコアが認められた腫瘍は、E r b B 2 を過剰発現していないと特徴づけることができ、一方で、閾値を超えるまたは閾値に等しいスコアを有する腫瘍は、E r b B 2 を過剰発現していると特徴づけることができる。治療の一例では、E r b B 2 を過剰発現する腫瘍を、E r b B 2 アイソフォームなどの E G F R アイソフォームを用いた治療の候補として評価する。

【0486】

本明細書中に提供するアイソフォームを癌の治療に用いることができる。たとえば、T I E / T E K アイソフォームを、腫瘍関連の血管形成を変調することなどによる癌の治療に用いることができる。血管化は、癌の増殖および拡散の調節に関与している。たとえば、血管形成および血管新生の阻害により、固体腫瘍の増殖および拡大が阻害される。T E K などの T i e / T e k 受容体は、正常組織および癌組織において血管発生に影響を与えることが示されている。T I E / T E K アイソフォームは、腫瘍血管形成の阻害剤として用いることができる。T I E / T E K アイソフォームは、細胞中でのタンパク質の発現などによって産生される。たとえば、T I E / T E K アイソフォームの分泌された型を細胞中で発現させ、培地から収穫することができる。タンパク質は、当分野で知られている生化学的手段によって、ならびに T I E / T E K アイソフォームもしくはその一部分に対して産生させた抗体などの抗体精製を用いることによって、またはタグを付加した T I E / T E K アイソフォームおよび対応する抗体を用いることによって、精製あるいは部分的に精製することができる。血管形成の効果は、動物モデルにおいて、ラット角膜を、手術によってラット角膜のマイクロポケット内に移植したヒドロンベレット中の馴化培地として、またはウィンドウチャンバに投与した精製したタンパク質 (たとえば 100 μg / 用量) として配合した T I E / T E K アイソフォームを用いて処理することなどによって監視することができる。たとえば、無血管角膜を有する F 3 4 4 ラットなどのラットモデルを、腫瘍細胞馴化培地と組み合わせて、または血管形成を誘導するために腫瘍の断片を眼のウィンドウチャンバ内に移植することによって、用いることができる。腫瘍細胞馴化培地によって誘導された血管形成の阻害を検出するために、角膜を組織学的に検査することができる。また、T I E / T E K アイソフォームを用いて、原発性および転移性の肉腫および癌腫を含めた固形腫瘍などの悪性状態ならびに転移状態を治療することもできる。

【0487】

F G F R - 4 アイソフォームを用いて、癌、たとえば下垂体腫瘍を治療することができる。動物モデルを用いて、ヒト下垂体腫瘍進行の進行を模倣することができる。たとえば、トランスジェニックマウス内で発現された F G F R の N 末端が短縮された型、p t d - F G F R - 4 は、持続的かつ巨大な過形成が存在しない下垂体腺種の形成を含めて、下垂体の腫瘍形成を再現している (E z z a t 他 (2002) J . C l i n . I n v e s t . 、109: 69~78)。F G F R - 4 アイソフォームを p t d - F G F R - 4 マウスに投与することができ、下垂体の構築および腫瘍進行の経過を対照マウスと比較する。

【0488】

5. アルツハイマー病

E G F Rアイソフォームなどの受容体アイソフォームも、炎症性状態ならびにアルツハイマー病および関連状態などのこのような応答を含む他の状態の治療に用いることができる。突然変異アミロイド前駆体タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスおよび家族性常染色体性優性関連P S 1を発現するマウスならびに両方のタンパク質（P S 1 M 1 4 6 L / A P P K 6 7 0 N : M 6 7 1 L）を発現するマウスを含めて、様々なヒトアルツハイマー病用のマウスモデルが利用可能である。アルツハイマー病のモデルは、E r b Bアイソフォームの注射などによって治療する。斑の発生は、染色および抗体免疫反応アッセイを用いて、海馬、嗅内皮質、および大脳皮質中での神経斑の観察などによって評価することができる。

10

【0489】

6. 平滑筋増殖に関連する疾患および状態

E r b BアイソフォームなどのE G F Rアイソフォームを含めたC S Rアイソフォームを、ヒトなどの哺乳動物における平滑筋細胞増殖に関与する様々な疾患および状態の治療に用いることができる。一例は、血管平滑筋細胞（V S M C）の増殖を含み、血管狭窄症などの内膜の過形成、血管形成術もしくは手術またはステント移植から生じる再狭窄、アテローム性動脈硬化症および高血圧をもたらす、心疾患の治療である。このような状態では、様々な細胞および放出されたサイトカインが自己分泌、パラ分泌または接触分泌の様式で互いに作用し、これにより、培地中のその正常な位置から損傷した内膜へのV S M Cの遊走がもたらされる。遊走したV S M Cは過剰に増殖し、内膜の肥厚をもたらす、これは狭窄症または血管の閉塞をもたらす。この問題は、血小板の凝集および病変部位での堆積により度合が強まる。多機能性セリンプロテアーゼである α -トロンビンが血管損傷部位で濃縮されており、V S M Cの増殖を刺激する。この受容体が活性化されたのち、V S M CはP D G F - A A、H B - E G FおよびT G Fを含めた様々な自己分泌成長因子を産生および分泌する。E G F Rは、最終的に線維芽細胞およびV S M Cの遊走ならびに増殖をもたらすシグナル伝達カスケード、ならびに内皮細胞に分裂促進的な様々な因子を分泌させるV S M Cの刺激および内皮細胞における化学走性応答の誘導に関与している。E G F Rアイソフォームを用いた治療を用いて、このようなシグナル伝達および応答を変調することができる。

20

【0490】

E r b B 2およびE r b B 3アイソフォームなどのE G F Rアイソフォームを用いて、E r b B 2およびE r b B 3などのE G F Rが、尿路下部に影響を与える閉塞性症候群に応答して起こる膀胱壁の肥厚などの膀胱のS M Cを変調する状態を治療することができる。E G F Rアイソフォームを、膀胱平滑筋細胞の増殖の制御、結果的には尿路閉塞性症候群の予防または治療に用いることができる。

30

【0491】

E G F Rアイソフォームを用いて、平滑筋細胞増殖に関与する根本的な病理学を有する閉塞性気道疾患を治療することができる。一例は、気道の炎症および気管支収縮に現れる喘息である。E G Fは、ヒト気道S M Cの増殖を刺激することが示されており、閉塞性気道疾患において気道S M Cの病理学的増殖に関与する因子の1つである可能性が高い。E G F Rアイソフォームは、E G F Rによる、E G Fに対する効果および応答を変調するために用いることができる。

40

【0492】

7. 炎症性疾患

T N F RアイソフォームなどのC S Rアイソフォームは、中枢神経系疾患（C N S）、自己免疫疾患、喘息におけるものなどの気道過敏症状態、関節リウマチおよび炎症性腸疾患を含めた炎症性疾患の治療に用いることができる。

【0493】

T N F α およびL Tは炎症誘発性サイトカインであり、多発性硬化症などの疾患および状態の炎症反応における重大な媒介物質である。T N F α およびL T - α は、リンパ球お

50

よびマクロファージを浸潤することによって産生され、また、さらに活性化されたCNS実質細胞、ミクログリア細胞および星細胞によって産生される。MS患者では、TNF- α は血清および脳脊髄液中で過剰に産生されている。病変中では、TNF- α およびTNFRが大規模に発現される。TNF α およびLT- α は原発性オリゴデンドロサイトの選択的毒性を誘発させることができ、CNS組織においてミエリン損傷を誘発させる。したがって、これら2つのサイトカインは脱髄に関連するとされている。

【0494】

実験的自己免疫脳脊髄炎(EAE)は、多発性硬化症(MS)のモデルとして役割を果たすことができる(たとえばProberth他(2000)Brain、123:2005~2019参照)。EAEは、ミエリンならびにミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質およびミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)などのミエリン成分を用いて免疫化を行うことによって、いくつかの遺伝的に感受性のある種において誘発させることができる。たとえば、MOG誘導性EAEは、炎症の病理組織学的三徴候の慢性的かつ再発性の臨床疾患経過、反応性グリオシス、および大きなコンフルエントな脱ミエリン化された斑の掲形成を含めたヒトMSの本質的な特徴を再現している。さらなるMSモデルには、非自己免疫媒介のMSのモデルである、TNF α を過剰発現するトランスジェニックマウスが含まれる。トランスジェニックマウスはTNF α を局所的にグリア細胞中で発現するように操作されている。ヒトおよびネズミのTNF α はMS様の症状を始動させる。TNFRアイソフォームは、EAE動物モデルにおいて評価することができる。アイソフォームを注射などによって投与し、症状の経過および進行を対照動物と比較して監視する。

10

20

【0495】

TNF α などのサイトカインは、気道平滑筋の収縮特性にも関与している。TNFR1およびTNFR2は、気道平滑筋における生物学的影響の変調に役割を果たしている。TNFR2はカルシウム恒常性を変調し、したがって気道平滑筋の応答性亢進を変調する。TNFR1は、気道平滑筋におけるTNF α の効果を変調する。気道平滑筋の応答は、カルバコールを用いて誘発させたネズミの気管輪において評価することができる。TNF α が存在する場合および存在しない場合におけるカルバコール誘導性収縮などの効果を監視することができる。気道平滑筋に対するアイソフォームの効果を評価するために、TNFRアイソフォームを気管輪に加えることができる。

30

【0496】

TNF α /TNFRは、関節リウマチ(RA)などの疾患において炎症を変調する(Edwards他(2003)Adv Drug Deliv. Rev.、55(10):1315~36)。TNFR1アイソフォームを含めたTNFRアイソフォームを用いて、RAを治療することができる。たとえば、TNFRアイソフォームを局所注射または全身注射することができる。アイソフォームは、毎日または週1回投薬することができる。PEG化したTNFRアイソフォームは、免疫原性を低下させるために用いることができる。RA治療用の霊長類モデルが利用可能である。TNFRアイソフォーム治療を評価するために、柔らかい関節および膨張した関節の応答をTNFRアイソフォームで治療した対象ならびに対照において監視することができる。

40

【0497】

8. 併用療法

疾患および状態を治療するために、RTKアイソフォームなどのCSRアイソフォームを、互いにならびに他の既存の薬物および治療剤と組み合わせて用いることができる。たとえば、本明細書中に記載のように、いくつかのRTKアイソフォームを用いて血管形成関連状態および疾患ならびに／または対照腫瘍増殖を治療することができる。このような治療は、抗血管形成薬および／もしくは抗腫瘍形成薬ならびに／または治療剤と併せて行うことができる。抗血管形成薬および抗腫瘍形成薬ならびに併用療法に有用な治療の例には、チロシンキナーゼ阻害剤、ならびにそれだけには限定されないが4-アミノピロロ[2,3-d]ピリミジン(たとえばU. S. Pat. No. 5,639,757参照)、

50

キナゾリン化合物および組成物（たとえばU. S. Pat. No. 5, 792, 771）を含めたチロシンキナーゼシグナル伝達を変調する能力を有する分子が含まれる。併用療法において有用な他の化合物には、アンジオスタチン4, 9（11）ーステロイドおよびC21ー含酸化ステロイドなどのステロイド、アンジオスタチン、エンドスタチン、バスキュロスタチン（vasculostatin）、キャンスタチン（canstatin）およびマスピン、アンジオポイエチン、細菌性多糖CM101ならびに抗体LM609（U. S. Pat. No. 5, 753, 230）、トロンボスポンジン（TSP-1）、血小板因子4（PF4）、インターフェロン、メタロプロテイナーゼ阻害剤、AGM-1470/TNP-470、サリドマイド、およびカルボキシアミドトリアゾール（CAI）を含めた薬物、ヘパリンまたはヘパリン断片が存在する場合などのコルチゾン、抗侵襲性因子、レチノイン酸およびパクリタキセル（本明細書中に参考として組み込まれているU. S. Pat. No. 5, 716, 981）、サメ軟骨抽出物、陰イオン性ポリアミドもしくはポリ尿素オリゴマー、オキシインドール誘導体、エストラジオール誘導体およびチアゾロピリジミン誘導体が含まれる。

10

【0498】

EGFRを過剰発現する癌の治療を含めた癌の治療には、抗癌剤、化学療法剤および増殖阻害剤との併用療法が含まれていることができ、様々な化学療法剤のカクテルの同時投与が含まれる。化学療法剤の例には、タキサン（パクリタキセルおよびドキシタキセルなど）およびアントラサイクリン抗生物質が含まれる。このような化学療法剤の調製および投薬スケジュールは、製造者の指示に従って、または当業者によって経験的に決定されるように使用し得る。このような化学療法の調製および投薬スケジュールは、化学療法サービス（Chemotherapy Service）、M. C. Perry編、Williams & Wilkins、メリーランド州Baltimore（1992）にも記載されている。

20

【0499】

さらなる化合物を、RTKアイソフォームと共に併用療法において用いることができる。抗ホルモン化合物を、EGFRアイソフォームと共になど、併用療法で用いることができる。このような化合物の例には、タモキシフェンなどの抗エストロゲン化合物；オナプリストンなどの抗プロゲステロンおよびフルタミエオなどの抗アンドロゲンが、このような分子について知られている用量で含まれる。また、心保護剤（治療に関連している可能性のある心筋機能不全を予防または軽減させるため）または1つもしくは複数のサイトカインも同時投与することも有用な可能性がある。上記治療レジームに加えて、患者は手術による癌細胞の除去および／または放射線療法を受ける場合がある。

30

【0500】

アジュバントおよび他の免疫変調剤は、癌の治療において、たとえば腫瘍細胞に対する免疫応答を増大させるために、CSRアイソフォームと組み合わせて用いることができる。併用療法は治療の有効性を増大させることができ、場合によっては、組合せが治療の個別の相加効果よりも有効であるように相乗効果が生じる。アジュバントの例には、それだけには限定されないが、細菌DNA、弱毒化マイコバクテリア細胞の核酸画分（BCG；バチルスーカルメットーゲラン）、BCGゲノム由来の合成オリゴヌクレオチド、およびCpGモチーフを含む合成オリゴヌクレオチド（CpG ODN；Wooldridge他（1997）Blood、89：2994～2998）、レバミゾール、水酸化アルミニウム（ミョウバン）、BCG、フロイトの不完全アジュバント（IFA）、QS-21（植物由来の免疫賦活剤）、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、およびジニトロフェニル（DNP）が含まれる。免疫変調剤の例には、それだけには限定されないが、インターロイキン（たとえば、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、およびIL-1RA）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球ーマクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、オンコスタチンM、エリスロポエチン、白血病阻害因子（LIF）、イン

40

50

ターフェロン、B7. 1 (CD80としても知られる)、B7. 2 (B70、CD86としても知られる)、TNFファミリーメンバー (TNF- α 、TNF- β 、LT- β 、CD40リガンド、Fasリガンド、CD27リガンド、CD30リガンド、4-1BBL、Trail)、MIFなどのサイトカイン、インターフェロン、IL-2およびIL-12などのサイトカイン；ならびにメトトレキサートおよびクロラムブシルなどの化学療法剤が含まれる。

【0501】

9. 前臨床研究

モデル動物の研究を、候補治療剤であるRTKアイソフォームの前臨床評価で用いることができる。評価することができるパラメータには、それだけには限定されないが、有効性濃度応答、安全性、薬物動態学、種間スケーリングおよび組織分布が含まれる。モデル動物の研究には、本明細書中に記載のものなどのアッセイおよび当業者に知られているアッセイが含まれる。動物モデルを用いて、その後に臨床試験およびRTKアイソフォームを用いた治療を設計するためにヒト用量に外挿することができるデータを得ることができる。たとえば、ヒトで使用するための所要の有効な範囲のVEGFRに対する抗体などの、治療的阻害剤を維持するために有効な臨床的投薬レジメンを定義するために、腫瘍保有マウスにおける有効性濃度応答VEGFR阻害剤を、ヒトでの治療に外挿することができる (Mordenti他、(1999) Toxicol Pathol.、1月～2月；27(1)：14～21)。同様のモデルおよび用量の研究を、VEGFRアイソフォームの用量の決定および適切なヒト用量への翻訳、ならびに当業者に知られている他の技術に適用することができる。前臨床安全性研究および前臨床薬物動態学を、たとえばサル、マウス、ラットおよびウサギに行うことができる。マウス、ラットおよびサルからの薬物動態学データは、非比例的スケーリングを用いて、ヒトにおける対応治療剤の薬物動態学の予測に用いられている。したがって、関節リウマチ、眼球血管新生および癌を含めたヒトの病的状態を治療するための適切な用量の情報を決定することができる。抗VEGF抗体のヒト化した変種が抗癌剤として臨床試験で用いられており (Brem、(1998) Cancer Res.、58(13)：2784～92；Presta他、(1997) Cancer Res.、57(20)：4593～9) このような臨床データも、VEGFRアイソフォームの治療的用量を設計する場合に基準源としてみなすことができる。

【0502】

M. 併用療法

本明細書中に提供するものを含めたCSRアイソフォームは、互いに組み合わせて、ヘルスタチンもしくは任意のたとえばU. S. Application Serial Nos. 09/942, 959、09/234, 208、09/506, 079；U. S. Provisional Application Serial Nos. 60/571, 289、60/580, 990および60/666, 825；ならびにU. S. Patent No. 6, 414, 130、公開された国際PCT特許出願の国際公開第00/44403号パンフレット、国際公開第01/61356号パンフレット、国際公開第2005/016966号パンフレットに記載の、それだけには限定されないが、配列番号320～359に記載のものを含めたアイソフォームなどの他の細胞表面受容体アイソフォームと共に、ならびに／または、それだけには限定されないが、本明細書中に記載し、当業者に知られている癌および他の増殖性障害、炎症性疾患、自己免疫障害を含めた、疾患および状態、特に異常な血管形成および／もしくは血管新生を有するものを治療するための他の既存の薬物および治療剤と共に、用いることができる。

【0503】

たとえば、VEGFアイソフォームなどのCSRアイソフォームを、糖尿病を治療するための薬剤と共に投与することができる。このような薬剤には、糖尿病性歯周病、糖尿病性血管疾患、尿細管間質性疾患および糖尿病性神経障害などの任意またはすべての状態を治療するための薬剤が含まれる。別の例では、CSRアイソフォームを、扁平細胞癌 (た

たとえば上皮扁平細胞癌)、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌および肺扁平上皮癌を含めた肺癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化管癌を含めた消化管癌または胃癌、膵臓癌、膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌(kidney)または腎臓(renal)癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、ならびに頭頸部癌を含めた癌を治療する薬剤と共に投与する。CSRアイソフォームのうちの任意のものを、疾患または状態を治療するための2つ以上の薬剤と組み合わせて投与することができる。

【0504】

アジュバントおよび他の免疫変調剤は、癌の治療において、たとえば腫瘍細胞に対する免疫応答を増大させるために、アイソフォームと組み合わせて用いることができる。併用療法は治療の有効性を増大させることができ、場合によっては、組合せが治療の個別の相加効果よりも有効であるように相乗効果が生じる。アジュバントの例には、それだけには限定されないが、細菌DNA、弱毒化マイコバクテリア細胞の核酸画分(BCG;バチルスーカルメットーゲラン)、BCGゲノム由来の合成オリゴヌクレオチド、およびCpGモチーフを含む合成オリゴヌクレオチド(CpG ODN; Woolldridge他(1997)Blood、89:2994~2998)、レバミゾール、水酸化アルミニウム(ミョウバン)、BCG、フロイトの不完全アジュバント(IFA)、QS-21(植物由来の免疫賦活剤)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、およびジニトロフェニル(DNP)が含まれる。免疫変調剤の例には、それだけには限定されないが、インターロイキン(たとえば、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、およびIL-1RA)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、オンコスタチンM、エリスロポエチン、白血病阻害因子(LIF)、インターフェロン、B7.1(CD80としても知られる)、B7.2(B70、CD86としても知られる)、TNFファミリーメンバー(TNF- α 、TNF- β 、LT- β 、CD40リガンド、Fasリガンド、CD27リガンド、CD30リガンド、4-1BBL、Trail)、およびMIFなどのサイトカイン、インターフェロン、IL-2およびIL-12などのサイトカイン;ならびにメトトレキサートおよびクロラムブシルなどの化学療法剤が含まれる。

【0505】

ヘルスタチンおよび他の薬剤との組合せを含めた、異なるCSRアイソフォームの組合せを、癌および異常な血管形成を含む他の障害の治療に用いることができる(たとえば、このようなポリペプチドの血管形成および血管新生経路における標的の概要を示す図1を参照、本明細書中および上述の同時係属かつ公開された出願のU. S. Application Serial Nos. 09/942,959、09/234,208、09/506,079;U. S. Provisional Application Serial Nos. 60/571,289、60/580,990および60/666,825;ならびにU. S. Patent No. 6,414,130、公開された国際PCT特許出願の国際公開第00/44403号パンフレット、国際公開第01/61356号パンフレット、国際公開第2005/016966号パンフレットに記載のものを提供する。細胞表面受容体には、VEGFR、FGFR、PDGFR(R α 、R β 、CSF1R、Kitを含む)、Met(c-met、c-RONを含む)、TEKおよびEphA2ファミリーのメンバーなどの受容体チロシンキナーゼが含まれる。また、これには、ErbB2、ErbB3、ErbB4、DDR1、DDR2、EphA、EphB、FGFR-2、FGFR-3、FGFR-4、MET、PDGFR、TEK、Tie-1、KIT、ErbB2、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、Flt1、Flt3、TNFR1、TNFR2、RON、CSFRも含まれる。このようなアイソフォームの例は、ヘルスタチン(配列番号320~345参照)、すなわちヘルスタチンのイントロン部分および本明細書中に提供する任意のアイソフォームを含めたポリペプチドである。

選択したアイソフォームおよび／または薬物の組合せは治療する疾患と相関関係にあり、標的組織および細胞ならびにそれ上で発現された受容体の検討に基づいている。

【0506】

組合せは、たとえば、血管形成および／もしくは内皮細胞の維持経路中の2つ以上の細胞表面受容体またはステップを標的とするか、あるいは疾患プロセス中の2つ以上の細胞表面受容体またはステップを標的とすることができ、たとえば、炎症性疾患、腫瘍および本明細書中に記載し、当業者に知られているすべての他のものなどの、これらの経路のうち一方または両方が関連するとされている任意のものである。2つ以上の薬剤は、単一の組成物として投与するか、または2つ以上の組成物として（2つを超える薬剤が存在する場合は）同時に、断続的にもしくは逐次的に投与することができる。これらは、2つ以上の組成物を個別にまたは合わせた組成物を含み、任意選択で投与の指示書および／もしくはシリンジなど投与するための装置を含むキットとして梱包することができる。

10

【0507】

以下の実施例は例示目的のみのために含め、本発明の範囲を限定することを意図しない。

【0508】

N. 実施例

実施例 1

CSRアイソフォームのクローニング方法

A. メッセンジャーRNAの調製

健康なまたは疾患状態の組織もしくは細胞系由来の主要なヒト組織型から単離したmRNAを、Clontech (BD Biosciences、Clontech、カリフォルニア州Palo Alto) およびStratagene (カリフォルニア州La Jolla) から購入した。等量のmRNAをプールし、逆転写に基づいたPCR増幅 (RT-PCR) 用の鋳型として用いた。

20

【0509】

B. cDNAの合成

mRNAを40%のDMSOの存在下、70℃で10分間変性させ、氷上で急冷した。1本目のcDNA鎖は、10%のDMSO、50mMのトリス-HCl (pH 8.3)、75mMのKCl、3mMのMgCl₂、10mMのDTT、2mMずつの各dNTP、5μgのmRNA、および200単位のStratascript逆転写酵素 (Stratagene、カリフォルニア州La Jolla) を含む20μlの反応液中の200ngのオリゴ (dT) または20ngのランダム六量体のいずれかをを用いて合成した。37℃で1時間インキュベーションを行ったあと、両方の反応からのcDNAをプールし、10単位のRNaseH (Promega、ウィスコンシン州Madison) で処理した。

30

【0510】

C. PCR増幅

オリゴ6.6ソフトウェア (Molecular Biology Insights, Inc.、コロラド州Cascade) を用いて遺伝子に特異的なPCRプライマーを選択し、Qiagen-Operon (カリフォルニア州Richmond) によって合成した。順方向プライマーが開始コドンに隣接する。逆方向プライマーはストップコドンに隣接するか、または開始コドンから少なくとも1.5kb下流の領域から選択した (表4参照)。それぞれのPCR反応液は、10ngの逆転写されたcDNA、0.025U/μlのTaqPlus (Stratagene)、0.0035U/μlのPfuTurbo (Stratagene)、0.2mMのdNTP (Amersham、ニュージャージー州Piscataway)、ならびに0.2μMの順方向および逆方向プライマーを、全体積50μl含んでいた。PCR条件は、35サイクルならびに94.5℃で45秒間、58℃で50秒間、および72℃で5分間であった。反応は、72℃で10分間の伸長ステップで終結させた。

40

50

【 0 5 1 1 】

【 表 4 - 1 】

表3B:CSRアイソフォームをクローニングするための遺伝子のリスト

ファミリー	メンバー	ヌクレオチド ACC.#	触媒 ドメイン	配列 番号:	ORF	prt ACC.#	配列 番号:
PDGFR	CSF1R	NM_005211	2012-3208	162	293-3211	NP_005202	249
	Flt3	NM_004119	1861-2886	244	58-3039	NP_004110	272
	KIT	NM_000222	1762-2799	1	22-2952	NP_000213	273
	PDGFR-A	NM_006206	2147-3253	246	395-3664	NP_006197	275
	PDGFR-B	NM_002609	2133-3215	163	357-3677	NP_002600	276
DDR	DDR1	NM_013993	2149-3057	156	337-3078	NP_054699	250
	DDR2	NM_006182	2022-2900	227	354-2921	NP_006173	251
EPH	EphA1	NM_005232	1939-2736	165	88-3018	NP_005223	253
	EphA2	NM_004431	1956-2759	229	138-3068	NP_004422	254
	EphA3	NM_005233	2086-2859	230	226-3177	NP_005224	255
	EphA4	NM_004438	1885-2685	231	43-3003	NP_004429	256
	EphA5	L36644	1259-1460	232	1-2976	AAA74245	257

10

20

30

【表 4 - 2】

ファミリー	メンバー	ヌクレオチド ACC.#	触媒 ドメイン	配列 番号:	ORF	prt ACC.#	配列 番号:
	EphA6	AL133666	691- 1332	233	343- 1347	CAB63775	258
	EphA7	NM_004440	2092- 2892	234	214- 3210	NP_004431	259
	EphA8	NM_020526	2028- 2801	235	126- 3143	NP_065387	260
	EphB1	NM_004441	2051- 2857	166	215- 3169	NP_004432	261
	EphB2	AF025304	1886- 2681	236	26- 3193	AAB94602	262
	EphB3	NM_004443	2316- 3122	237	438- 3434	NP_004434	263
	EphB4	NM_004444	2200- 3006	238	376- 3339	NP_004435	264
	EphB6	NM_004445	2761- 3498	239	799- 3819	NP_004436	265
ERB	ErbB2	NM_004448	2396- 3164	240	239- 4006	NP_004439	266
	ErbB3	NM_001982	2318- 3086	241	194- 4222	NP_001973	267
	EGFR	NM_005228	2380- 3148	228	247- 3879	NP_005219	252
FGFR	FGFR-1	M34641	1435- 2263	164	10- 2472	AAA35835	268

10

20

30

【表 4 - 3】

ファミリー	メンバー	ヌクレオチド ACC.#	触媒 ドメイン	配列 番号:	ORF	prt ACC.#	配列 番号:
	FGFR-2	NM_000141	2009-2872	242	593-3058	NP_000132	269
	FGFR-3	NM_000142	1429-2292	243	40-2460	NP_000133	270
	FGFR-4	NM_002011	1534-2394	2	157-2565	NP_002002	271
MET	MET	NM_000245	3419-4198	245	188-4360	NP_000236	274
	RON	NM_002447	3242-4260	159	29-4231	NP_002438	277
TEK	TEK	NM_000459	2603-3433	160	149-3523	NP_000450	278
	Tie-1	NM_005424	2579-3409	161	80-3496	NP_005415	279
TNFR	TNFR1	NM_001065	1323-1598(D D)	247	282-1649	NP_001056	280
	TNFR2	NM_001066	n/a	3	90-1475	NP_001057	281
VEGFR	VEGFR-1	NM_002019	2704-3702	157	250-4266	NP_002010	282
	VEGFR-2	NM_002253	2779-3792	248	304-4374	NP_002244	283
	VEGFR-3	NM_002020	2530-3525	158	22-3918	NP_002011	284

【 0 5 1 2 】

【表 5 - 1】

表4:PCRクローニング用のプライマー

配列 番号	プライマー	配列
4	CSFIR_F1	CTG CCA CTT CCC CAC CGA GG
5	DDR1_F1	GGG ATC AGG AGC TAT GGG ACC A
6	DDR2_F1	CTG AGA TGA TCC TGA TTC CCA GAA
7	EphA1_F1	GGA GCT ATG GAG CGG CGC TG
8	EphA2_F1	AGC GAG AAG CGC GGC ATG GA
9	EphA3_F1	CAC CAG CAA CAT GGA TTG TCA GC
10	EphA4_F1	CGA ACC ATG GCT GGG ATT TTC TA
11	EphA7_F1	ATA AAA CCT GCT CAT GCA CCA TG
12	EphB1_F1	GCG ATG GCC CTG GAT TAT CTA
13	EphB2_F1	CCC CGG GAA GCG CAG CCA
14	EphB3_F1	GCT CCT AGA GCT GCC ACG GC
15	EphB4_F1	GAT CCT ACC CGA GTG AGC CGG
16	CSFIR_R1	GGG CTC CTG CAG AGA TGG GTA
17	DDR1_R1	AGA GCC ATT GGG GAC ACA GGG A
18	DDR2_R1	AGC CTG ACT CCT CCT CCC CTG
19	EphA1_R1	AGC TCT GTC AGC AAG ACC CTG G
20	EphA2_R1	AGG TGG TGT CTG GGG CCA GGT C
21	EphA3_R1	GTC AGG CTT GAG GCT ACT GAT GG
22	EphA4_R1	AAC ATA GGA AGT GAG AGG GTT CAG G
23	EphA7_R1	ACT CCA TTG GGA TGC TCT GGT TC
24	EphB1_R1	AGC CCA TCA ATC CTT GCT GTG
25	EphB2_R1	GCG TGC CCG CAC CTG GAA GA
26	EphB3_R1	GCT GGT CAC TGT GGA GGC GA
27	EphB4_R1	GGT AGC TGG CTC CCC GCT TCA
28	CSFIR_R2	CCG AGG GTC TTA CCA AAC TGC
29	DDR1_R2	AAG CGG AGT CGA GAT CGA GGG A
30	DDR2_R2	GGG GAA CTC CTC CAC AGC CA
31	EphA1_R2	CGG GTA AAG TCC AAG GCT CCC
32	EphA2_R2	GAC ACA GGA TGG ATG GAT CTC GG
33	EphA3_R2	ATC AAT GGA TAT GTT GGT GGC ATC
34	EphA4_R2	AGG ATG CGT CAA TTT CTT TGG CA

10

20

30

【表 5 - 2】

配列 番号	プライマー	配列
35	EphA7_R2	CTG CAC CAA TCA CAC GCT CAA
36	EphB1_R2	ATC AAT CTC CTT GGC AAA CTC C
37	EphB2_R2	GCC CAT GAT GGA GGC TTC GC
38	EphB3_R2	ACG CAG GAC ACG TCG ATC TCC
39	EphB4_R2	ACC TGC ACC AAT CAC CTC TTC AA
40	EphB6_F1	AGA GTG GCG GGC ATG GTG TG
41	EphB6_R1	GCG GAG CTG ATA GTC CAG GAT G
42	EphB6_R2	CCT GTC CCA ATG ACC TCC TCA A
43	EphA6_F1	GGA GAT GAA AGA CTC TCC ATT TCA AG
44	FGFR-1_F1	ATT CGG GAT GTG GAG CTG GA
45	FGFR-2_F1	AGG ACC GGG GAT TGG TAC CG
46	FGFR-3_F1	CAT GGG CGC CCC TGC CTG
47	FGFR-4_F1	AGA AGG AGA TGC GGC TGC TG
48	TNFR1(p55)_F1	AGC TGT CTG GCA TGG GCC TCT C
49	TNFR2(p75)_F1	ACC GGA CCC CGC CCG CAC
50	EphA6_R1	ATCT TAG ACC GAC AGA AAA TTT GGC
51	FGFR-1_R1	CAA GGG ACC ATC CTG CGT GC
52	FGFR-2_R1	AGG GGC TTG CCC AGT GTC AG
53	FGFR-3_R1	GCT CCC ATT TGG GGT CGG CA
54	FGFR-4_R1	CGG GGG AAC TCC CAT AGT GG
55	TNFR1(p55)_R1	GGC GCA GCC TCA TCT GAG AAG A
56	TNFR2(P75)_R1	CAC AGC CCA CAC CGG CCT GG
57	Flt3_F1	GGA GGC CAT GCC GGC GTT G
58	KIT-F1	CGC AGC TAC CGC GAT GAG AGG
59	MET_F1	CTC ATA ATG AAG GCC CCC GC
60	PDGFR-A_F1	AAG TTT CCC AGA GCT ATG GGG A
61	PDGFR-B_F1	AGC AGC AAG GAC ACC ATG CG

10

20

30

40

【表 5 - 3】

配列 番号	プライマー	配列
62	RON_F1	GGT CCC AGC TCG CCT CGA TG
63	TEK_F1	AGA TTT GGG GAA GCA TGG ACT C
64	Tie-1_F1	CGG CCT CTG GAG TAT GGT CTG
65	VEGFR-1_F1	CAT GGT CAG CTA GTG GGA CAC C
66	VEGFR-2_F1	AGG TGC AGG ATG CAG AGC AAG
67	VEGFR-3_F1	AGC GGC CGG AGA TGC AGC G
68	Flt3_R1	CTG CTC GAC ACC CAC TGT CCA
69	KIT-R1	GCA GAA GTC TTG CCC ACA TCG
70	MET_R2	CTT CGT GAT CTT CTT CCC AGT GA
71	PDGFR-A_R1	AGA TTC TTA GCC AGG CAT CGC A
72	PDGFR-B_R1	AGC GCA CCG ACA GTG GCC GA
73	RON_R1	GCA CGG GCT GCC CAC TGT CA
74	TEK_R1	CTG TCC GAG GTT CCA AAT AGT TGA
75	Tie-1_R1	CGT TCT CAC TGG GGT CCA CCA
76	VEGFR-1_R1	ATT ATT GCC ATG CGC TGA GTG A
77	VEGFR-2_R1	GCC GCT TGG ATA ACA AGG GTA
78	VEGFR-3_R1	AAC TCG GTC CAG GTG TCC AGG C
79	Flt3_R2	CTT GGA AAC TCC CAT TTG AGA TCA
80	KIT-R2	ACA ACC TTC CCG AAA GCT CCA
81	MET_R2	ACT ACA TGC TGC ACT GCC TGG A
82	PDGFR-A_R2	CCC GAC CAA GCA CTA GTC CAT C
83	PDGFR-B_R2	CCA GAG CCG AGG GTG CGT CC
84	RON_R2	CAG GTC ATT CAG GTT GGG AGG A
85	TEK_R2	ATT TGA TGT CAT TCC AGT CAA GCA
86	Tie-1_R2	AGC ACT GGG TAG CTC AGG GGC
87	VEGFR-1_R2	AAC TCC CAC TTG CTG GCA TCA
88	VEGFR-2_R2	AAT TCC CAT TTG CTG GCA TCA
89	VEGFR-3_R2	ATT CCC ACT GGC TGG CAT CGT A

10

20

30

40

【0513】

D. PCR産物のクローニングおよび配列決定

PCR産物を1%のアガロースゲル上で電気泳動させ、検出可能なバンドからのDNAをGelstar (BioWhittaker Molecular Application、メリーランド州Walkersville)で染色した。DNAバンドをQiaQuickゲル抽出キット (Qiagen、カリフォルニア州Valencia)で抽出し、pDrive UA-クローニングベクター (Qiagen)内にライゲーションさせ、大腸菌中に形質転換させた。100 µg/mlのカルベニシリンを含むLB寒天プレート上で組換えプラスミドを選択した。それぞれの形質移入において192個コロニーをラ

50

ンダムに選択し、M13順方向および逆方向ベクタープライマーを用いたPCRによってそのcDNA挿入物のサイズを決定した。その後、蛍光イメージング（Alpha Innotech、カリフォルニア州San Leandro）によって可視化して区別可能な分子質量を有するPCR産物由来の代表的なクローンについて、ベクタープライマー（M13順方向および逆方向）を用いて両方向から配列決定を行った。ギャップを含む領域にわたる方向付けした配列決定の完成のためのカスタムプライマーを用いて、すべてのクローンの全体の配列決定を行った。

【0514】

E. 配列解析

選択的スプライシングのコンピュータ解析は、SIM4（スプライシング変異体を解析するためのコンピュータプログラム）を用いて、それぞれのcDNA配列を、そのそれぞれのゲノム配列とアラインメントさせることによって行った。正準（たとえばGTAG）のドナーアクセプタースプライシング部位を有する転写物のみの解析を検討した。CSRアイソフォームをコードしているクローンのさらなる研究を行った（以下の表5参照）。

10

【0515】

F. 標的クローニングおよび発現

公開ESTデータベースのコンピュータ解析により、イントロンの保持または挿入を有する潜在的なスプライシング変異体が同定された。ESTデータベースの解析によって同定された潜在的なスプライシング変異体のクローニングは、上述のようにオープンリーディングフレームに隣接するプライマーを用いたRT-PCRによって行った。

20

【0516】

cDNA分子をコードしている配列が確認されたCSRアイソフォームを、製造者の指示（Invitrogen、カタログ#K4930-00）に従ってCMVプロモーターの制御下にある複製を欠く組換えアデノウイルスベクター内にサブクローニングすることができ、サブクローニングした。組換えアデノウイルスは293A細胞（Invitrogen）を用いて産生した。感染した293細胞由来の上清を、適切な抗体を用いた免疫ブロッティングによって解析した。

【0517】

G. 例示的なCSRアイソフォーム

本明細書中に記載の方法を用いて調製した例示的なCSRアイソフォームを、以下の表5に記載する。CSRアイソフォームをコードしている核酸分子を提供し、これには、配列番号92、94、96、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、167、169、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、および225のいずれかに記載のヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドまたはヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド類似体の配列が含まれる。例示的なCSRアイソフォームポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号91、93、95、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、182、184、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、および226のいずれかに記載されている。

30

40

【0518】

【表 6 - 1】

表5 CSRアイソフォーム

遺伝子	ID	型	長さ	配列番号
FGFR-4	SR002_A11	イントロン融合	72 aa	90-91
KIT	SR002_H01	イントロン融合	413 aa	92-93
TNFR2	SR003_H02	イントロン融合	155 aa	94-95
DDR1	SR005_A11	エクソン欠失	286 aa	114-115
DDR1	SR005_A10	エクソン欠失	243 aa	116-117
FGRF-1	SR001_E12	エクソン欠失	228 aa	118-119
FGRF-4	SR002_A10	イントロン融合	446 aa	120-121
VEGFR-1	SR004_C05	イントロン融合	174 aa	122-123
VEGFR-3	SR007_E10	エクソン短縮	227 aa	124-125
VEGFR-3	SR007_F05	エクソン欠失	295 aa	126-127
RON	SR004_C11	イントロン融合	495 aa	128-129
TEK	SR007_G02	イントロン融合 エクソン短縮	367 aa	130-131
TEK	SR007_H03	エクソン欠失 イントロン融合	466 aa	132-133
Tie-1	SR006_A04	イントロン融合	251 aa	134-135
Tie-1	SR006_B07	イントロン融合	379 aa	136-137
Tie-1	SR006_B06	イントロン融合	161 aa	138-139
Tie-1	SR006_B12	イントロン融合	414 aa	140-141
Tie-1	SR006_B10	エクソン欠失	317 aa	142-143
CSF1R	SR005_A06	エクソン欠失	306 aa	144-145
PDGFR-B	SR007_C09	エクソン短縮 (4bp)	336 aa	146-147
EphA1	SR004_G03	イントロン融合	474 aa	148-149
EphA1	SR004_G07	イントロン融合 エクソン欠失	311 aa	150-151
EphA1	SR004_H03	イントロン融合	490 aa	152-153
EphB1	SR005_D06	エクソン短縮	242 aa	154-155
EphA2	SR016_E12	イントロン融合	497 aa	167-168
EphB4	SR012_C08	エクソン欠失	306 aa	169-170
EphB4	SR012_D11	エクソン短縮	516 aa	171-172
EphB4	SR012_E11	エクソン短縮	414 aa	173-174

10

20

30

【表 6 - 2】

遺伝子	ID	型	長さ	配列番号
FGFR-1	SR022_C02	エクソン欠失 イントロン融合	320 aa	175-176
FGFR-2	SR022_C10	イントロン融合	266 aa	177-178
FGFR-2	SR022_C11	イントロン融合	317 aa	179-180
FGFR-2	SR022_D04	エクソン欠失 イントロン融合	281 aa	181-182
FGFR-2	SR022_D06	イントロン融合	396 aa	183-184
MET	SR020_C10	イントロン融合	413 aa	185-186
MET	SR020_C12	イントロン融合	468 aa	187-188
MET	SR020_D04	イントロン融合	518 aa	189-190
MET	SR020_D07	イントロン融合	596 aa	191-192
MET	SR020_D11	イントロン融合	408 aa	193-194
MET	SR020_E11	イントロン融合	621 aa	195-196
MET	SR020_F08	イントロン融合	664 aa	197-198
MET	SR020_F11	イントロン融合	719 aa	199-200
MET	SR020_F12	イントロン融合	697 aa	201-202
MET	SR020_G03	エクソン短縮 イントロン融合	691 aa	203-204
MET	SR020_G07	イントロン融合	661 aa	205-206
MET	SR020_H03	イントロン融合	755 aa	207-208
MET	SR020_H06	イントロン融合	823 aa	209-210
MET	SR020_H07	イントロン融合	877 aa	211-212
MET	SR020_H08	エクソン欠失 イントロン融合	764 aa	213-214
RON	SR014_C01	イントロン融合	541 aa	215-216
RON	SR014_C09	イントロン融合	908 aa	217-218
RON	SR014_E12	イントロン融合	647 aa	219-220
Tie-1	SR016_G03	イントロン融合	751 aa	221-222
VEGFR-1	SR01_C02	イントロン融合	541 aa	100
VEGFR-2	SR015_F01	エクソン短縮	712 aa	223-224
VEGFR-3	SR015_G09	イントロン融合	765 aa	225-226

【 0 5 1 9 】

実施例 2

C S Rアイソフォーム発現アッセイ

A. m R N A 発現の解析

クローニングした C S Rアイソフォームの発現は、脳、心臓、腎臓、胎盤、前立腺、脾臓、脊髄、気管、精巣、子宮、胎児脳、胎児肝臓、副腎、肝臓、肺、小腸、唾液腺、骨格筋、胸腺、甲状腺を含めた様々な組織、ならびに乳房、結腸、腎臓、肺、卵巣、胃、子宮、M D A 4 3 5 および H E P G 2 を含めた様々な腫瘍組織における R T - P C R（または定量的 P C R）によって決定した。P C R プライマー（実施例 1、表 4 に記載のものなど）は、可溶性の受容体に特異的なシグナルのみが増幅されるように、保持されたイントロンまたは選択的エクソンの排他的な範囲内で選択した。半定量的な結果を得るために、それぞれの P C R 反応を 2 つのサイクル数（たとえば 3 2 サイクル対 3 8 サイクル）で行った。クローニングしたそれぞれの C S Rアイソフォームの発現を、対応する野生型の膜受

容体の発現と比較した。

【0520】

EphA2 (GenBank 番号 NM_004431 または 配列番号 229) mRNA は、脳、心臓、腎臓、胎盤、前立腺、脾臓、脊髄、気管、精巣、子宮、胎児脳、胎児肝臓、副腎、肝臓、肺、小腸、唾液腺、骨格筋、胸腺、および甲状腺中で高度に発現され、また、乳房、結腸、腎臓、肺、卵巣、胃、子宮、MDA435 および HEPG2 の腫瘍組織中でも発現される。可溶性 EphA2 (配列番号 167) mRNA は、気管、肺、小腸、および唾液腺中で高度に発現され、腎臓、胎盤、胎児脳、胎児肝臓、副腎、骨格筋、胸腺、脳、心臓、脾臓、脊髄、子宮、および肝臓中でより少ない程度で発現され、また、胃腫瘍中で高度に発現され、結腸、腎臓、肺、卵巣、子宮、MDA435 および HEPG2 の腫瘍組織中でより少ない程度に発現される。

10

【0521】

FGFR-4 (配列番号 2 として記載した GenBank 番号 NM_002011) mRNA は、脳、心臓、腎臓、胎盤、前立腺、脾臓、脊髄、気管、精巣、子宮、胎児脳、胎児肝臓、副腎、肝臓、肺、小腸、唾液腺、骨格筋、胸腺、および甲状腺を含めた様々なヒト組織中で発現される。また、FGFR-4 の mRNA は、乳房、結腸、腎臓、肺、卵巣、胃、子宮、および HEPG2 の腫瘍組織中でも発現される。可溶性 FGFR-4 (配列番号 120) mRNA は、腎臓、脾臓、精巣、胎児脳、胎児肝臓、副腎、肝臓、肺、小腸中で高度に発現され、脳、心臓、胎盤、前立腺、脊髄、気管、子宮、骨格筋、胸腺および甲状腺中でより少ない程度で発現される。また、可溶性 FGFR-4 (配列番号 120) mRNA は、腎臓および胃の腫瘍組織中でも高度に発現され、乳房、結腸、肺、卵巣、および HEPG2 の腫瘍組織中でより少ない程度に発現される。

20

【0522】

RON (配列番号 159 として記載した GenBank 番号 NM_002447) mRNA は、気管、精巣、胎児脳、肺、小腸、および胸腺中で高度に発現され、唾液腺、腎臓、胎盤、心臓、前立腺、甲状腺中で発現され、脳、脾臓、脊髄、子宮、胎児肝臓、副腎、肝臓、および骨格筋中でより少ない程度に発現される。また、RON の mRNA は、乳房、結腸、肺、卵巣、胃、HEPG2 の腫瘍組織中でも発現され、腎臓および子宮の腫瘍組織中でより少ない程度に発現される。可溶性 RON (配列番号 128) mRNA は、結腸および胃の腫瘍組織中で高度に発現される。可溶性 RON (配列番号 128) mRNA は、気管、小腸および胸腺中、ならびに乳房、肺、および卵巣の腫瘍組織中でより少ない程度に発現される。可溶性 RON (配列番号 219) mRNA は、前立腺、気管、胎児脳、肺、小腸、胸腺中、ならびに乳房、結腸、肺、卵巣、および胃の腫瘍組織中で高度に発現される。また、可溶性 RON (配列番号 219) mRNA は、脳、心臓、腎臓、胎盤、脾臓、脊髄、精巣、子宮、胎児肝臓、副腎、肝臓、唾液腺、骨格筋、甲状腺中、ならびに腎臓、子宮、MDA435 および HEPG2 の腫瘍組織中でも、より少ない程度に発現される。可溶性 RON (配列番号 217) mRNA は、気管、肺、小腸、胸腺中、ならびに乳房および結腸の腫瘍組織中で高度に発現される。可溶性 RON (配列番号 217) mRNA は、脳、心臓、腎臓、胎盤、前立腺、脾臓、精巣、子宮、胎児脳、唾液腺、甲状腺中、ならびに肺、卵巣、および胃の腫瘍組織中でより少ない程度に発現される。

30

40

【0523】

TEK (配列番号 160 として記載した GenBank 番号 NM_000459) mRNA は、心臓、腎臓、胎盤、脾臓、肺中、ならびに結腸、腎臓、肺、および卵巣の腫瘍組織中で高度に発現される。また、TEK の mRNA は、脳、前立腺、脊髄、気管、精巣、子宮、胎児脳、胎児肝臓、副腎、肝臓、小腸、骨格筋、胸腺、甲状腺中、ならびに乳房および胃の腫瘍組織中でも、より少ない程度に発現される。可溶性 TEK (配列番号 132) mRNA は、心臓および腎臓中、ならびに結腸腫瘍組織中で発現レベルが低い。

【0524】

VEGFR-1 (配列番号 157 として記載した GenBank 番号 NM_002019) mRNA は、脳、心臓、腎臓、胎盤、前立腺、脾臓、脊髄、精巣、子宮、胎児脳、胎

50

児肝臓、副腎、肺、小腸、骨格筋中で高度に発現され、気管、肝臓、唾液腺、胸腺および甲状腺中でより少ない程度に発現される。また、VEGFR-1のmRNAは、結腸、腎臓、肺および卵巣の腫瘍組織中でも高度に発現され、乳房および胃の腫瘍組織中でより少ない程度で発現される。可溶性VEGFR-1（配列番号100）mRNAは、胃腫瘍組織中で発現レベルが低い。

【0525】

VEGFR-3（配列番号158として記載したGenBank番号NM_002020）mRNAは、心臓、腎臓、胎盤、脾臓、胎児脳、胎児肝臓、肺、小腸中、ならびに乳房、結腸、腎臓、肺、卵巣、胃および子宮の腫瘍組織中で高度に発現される。VEGFR-3（配列番号158）mRNAは、脳、前立腺、脊髄、気管、精巣、子宮、副腎、肝臓、唾液腺、骨格筋、胸腺、甲状腺中でより少ない程度で発現される。可溶性VEGFR-3（配列番号225）mRNAは、胎盤、副腎、肺、小腸中、および乳房、腎臓、肺の腫瘍組織中で高度に発現される。また、可溶性VEGFR-3（配列番号225）mRNAは、脳、心臓、腎臓、前立腺、脾臓、脊髄、気管、精巣、子宮、胎児脳、胎児肝臓、肝臓、唾液腺、骨格筋、胸腺、および甲状腺中、ならびに結腸、卵巣、胃、および子宮の腫瘍組織中でも、より少ない程度に発現される。

10

【0526】

要約すると、mRNAの発現はすべてのCSRアイソフォームで検出可能であったが、一般に膜受容体アイソフォームの発現よりも低かった。

【0527】

20

B. 可溶性受容体の細胞分泌

分泌されたアイソフォームを評価するために、推定上のCSRアイソフォームを培養ヒト細胞中で分析した。候補CSRアイソフォームをコードしているスプライシング変異体cDNA分子を、その検出を容易にするためにタンパク質のC末端においてインフレイムでMyc-Hisタグと融合させた哺乳動物発現ベクター（pcDNA3.1MycHisベクター（Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad））内にサブクローニングした。

【0528】

ヒト胚性腎臓293T細胞を 2×10^6 個の細胞/ウェルで6ウェルプレートに播種し、ダルベッコ変法イーグル培地および10%のウシ胎児血清（Invitrogen）中に維持した。細胞を、製造者の指示に従ってリポフェクタミン2000（Invitrogen）を形質移入させた。形質移入の日に、0.5mlの無血清DMEM中で5μgのプラスミドDNAを15μlのリポフェクタミン2000と混合した。混合物を20分間室温でインキュベーションし、その後、細胞に加えた。37℃で細胞をCO₂インキュベーター内で48時間インキュベーションした。トランス遺伝子発現を調査するために、上清を採取し、細胞を0.2%のTriton X-100を含むPBS緩衝液に溶かした。細胞溶解液および上清のどちらにおいても、トランス遺伝子発現についてアッセイを行った。

30

【0529】

Ni-アガロースNTA（Qiagen）を用いて、製造者の指示に従ってネイティブ条件下のHis6タグを付加したタンパク質を精製した。精製したHis6タグを付加したタンパク質を溶出させ、抗Myc抗体を用いた免疫プロットングのためにSDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離した（どちらもInvitrogenから入手）。抗体は1:5000に希釈した。

40

【0530】

抗Myc抗体（Invitrogen）を用いたウエスタンブロットによって、分泌されたCSRアイソフォームの発現が細胞溶解液および馴化培地中で検出された。FGFR-4（配列番号121）、RON（配列番号129、216、218、220）、VEGFR-2（配列番号224）、VEGFR-3（配列番号127）、EphA2（配列番号168）、EphA1（配列番号153、149）、TEK（配列番号131、133

50

）、およびT i e - 1（配列番号222）タンパク質が細胞溶解液中で検出され、T i e - 1（配列番号222）、V E G F R - 2（配列番号224）、V E G F R - 3（配列番号127）およびE p h A 2（配列番号168）タンパク質が馴化培地中で検出された。

【0531】

C. 受容体の結合

C S Rアイソフォームおよび分泌されたアイソフォームの、膜に固定されたそのそれぞれの完全長受容体との結合を示すために、免疫共沈降アッセイを行った（たとえば、J i n他、J B i o l C h e m、2004、279：1408ならびにJ i n他J B i o l C h e m、2004、279：14179参照）。ヒト胚腎臓293T細胞を、可溶性V E G F R - 3を発現する組換えp c D N A 3.1（M y c H i s）プラスミドを用いて一過的に形質移入させた（上述）。形質移入の48時間後、馴化培地を採取し、V E G F - Dの結合を評価した。形質移入した293T細胞からの馴化培地（100 μ l）を、2 μ gの可溶性V E G F R - 1 - F cもしくはV E G F R - 3 - F c（R & D S y s t e m s）を存在させてまたは存在させずに、1時間、V E G F - D（100 ng）と共にインキュベーションした。0.2 μ g／反応の抗V E G F - D抗体を用いてタンパク質複合体を免疫沈降させ（R & D S y s t e m s）、抗M y c抗体でプロービングする変性タンパク質ゲル上で分離した。ウエスタンブロットにより、V E G F 3 - M y cとV E G F - Dとの間のタンパク質結合が示された。さらに、5 $\times$ モル過剰のs V E G F R - 3 - F cは結合を低下させたが、一方で、s V E G F R - 1 - F cの存在は結合に僅かしか影響を与えなかったか影響を与えなかった。

【0532】

D. 増殖アッセイ

C S Rアイソフォームの生物活性は、細胞増殖に対するその効果を測定することによって評価した。第4継代のH U V E C細胞（C l o n i t i x）を、D M E M／10% F B S中、4,000個の細胞／ウェルの密度で96ウェルプレートに播種した。細胞を、0.5 nMのV E G F - A（R & D S y s t e m s）を用いてもしくは用いずに、2.5 nMのs V E G F R - 1 - F c、2.5 nMのs V E G F R - 2 - F c、または1.6 $\sim$ 12.5 nMの精製したs V E G F R - 2を存在させてもしくは存在させずに、処理した。処理した細胞を7日間、標準の細胞培養条件下で培養した。細胞増殖は、C y Q u a n t 蛍光アッセイキット（I n v i t r o g e nカタログ# C 7 0 2 6）を用いて、製造者の指示に従って3つ組試料で決定した。0.5 nMのV E G F - AによりH U V E Cの増殖が誘発された。s V E G F R - 1 - F c（2.5 nM）およびs V E G F R - 2 - F c（2.5 nM）は、それぞれがV E G F A誘導性のH U V E C増殖を阻害した。可溶性V E G F R - 2（配列番号224）は、V E G F - A誘導性のH U V E C増殖を用量に依存する形で阻害した。

【0533】

当業者には変形が明らかであると思われるため、本発明は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0534】

【図1】血管形成および内皮細胞の維持経路を示す図である。1つまたは複数の経路ステップでのC S Rアイソフォームの変調の標的点を示す。具体的には、この図は、血管構造の形成、維持およびリモデリングにおけるステップを示す。これには、循環内皮前駆体（C E P）の動員におけるV E G Fの役割、および血管不安定化におけるアンジオポイエチン-2の役割が含まれる。

[illegible]

(b) 配列番号 9 1、9 3、9 5、1 1 5、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3、1 2 5、1 2 7、1 2 9、1 3 1、1 3 3、1 3 5、1 3 7、1 3 9、1 4 1、1 4 3、1 4 5、1 4 7、1 4 9、1 5 1、1 5 3、1 5 5、1 6 8、1 7 0、1 7 2、1 7 4、1 7 6、1 7 8、1 8 0、1 8 2、1 8 4、1 8 6、1 8 8、1 9 0、1 9 2、1 9 4、1 9 6、1 9 8、2 0 0、2 0 2、2 0 4、2 0 6、2 0 8、2 1 0、2 1 2、2 1 4、2 1 6、2 1 8、2 2 0、2 2 2、2 2 4 および 2 2 6 のいずれかに記載のアミノ酸の配列を有

する、単離したポリペプチド、

(c) 配列番号 91、93、95、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224 および 226 のいずれかに記載のアミノ酸の配列、その対立遺伝子変異体およびその種変異体と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含む単離したポリペプチドから選択される単離した細胞表面受容体 (CSR) アイソフォームポリペプチドであって、

配列同一性は、単離したポリペプチドの完全長配列に対して、それぞれの配列番号の完全長に沿って比較するポリペプチド。

【請求項 2】

ポリペプチドが、(c) のポリペプチドであり、それが同一性を示す配列番号に記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 1 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 3】

ポリペプチドが哺乳動物内で生じる、請求項 1 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 4】

哺乳動物がげっ歯類、霊長類またはヒトである、請求項 3 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 5】

ポリペプチドが、配列番号 123 に記載のアミノ酸の配列、またはその対立変異体もしくは種変異体と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含んでおり；

配列同一性は、単離したポリペプチドの完全長配列に対して、それぞれの配列番号の完全長に沿って比較し；かつ

ポリペプチドは、配列番号 282 に記載の VEGFR-1 受容体と比較して膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いている、

請求項 1 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 6】

配列番号 123 に記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子もしくは種変異体を含む、請求項 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

ポリペプチドが配列番号 123 に記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 5～6 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 8】

ポリペプチドが、配列番号 125、127、224 および 226 のいずれかに記載のアミノ酸の配列、またはその対立変異体もしくは種変異体と少なくとも 80% の配列同一性を有し；

配列同一性は、単離したポリペプチドの完全長配列に対して、それぞれの配列番号の完全長に沿って比較する、

請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号 125、127、244 および 226 のいずれかに記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子もしくは種変異体を含む、請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

対立遺伝子変異体が配列番号 313 または 314 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

ポリペプチドが配列番号 125、127、224 および 226 のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 8～10 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 2】

配列番号 1 3 5、1 3 7、1 3 9、1 4 1、1 4 3 および 2 2 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列またはその対立変異体もしくは種変異体を含んでおり；

配列番号 2 7 9 に記載の T i e - 1 受容体の少なくとも 1 つのドメインの全体または一部を含んでおり；かつ

T i e - 1 受容体と比較して膜貫通ドメインおよびプロテインキナーゼドメインを欠いており、それによって T i e - 1 受容体と比較してポリペプチドの膜局在化およびプロテインキナーゼ活性が低下または消滅している、

請求項 1 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 1 3】

対立遺伝子変異体が配列番号 3 1 0 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 1 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 4】

ポリペプチドが配列番号 1 3 5、1 3 7、1 3 9、1 4 1、1 4 3 および 2 2 2 のいずれかに記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 1 2 または 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5】

ポリペプチドが、配列番号 1 1 9 または 1 7 6 に記載のアミノ酸の配列、またはその対立変異体もしくは種変異体と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有し、

配列同一性は、単離したポリペプチドの完全長配列に対して、それぞれの配列番号の完全長に沿って比較する、

請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6】

配列番号 1 1 9 および 1 7 6 のいずれかに記載のアミノ酸配列またはその対立遺伝子もしくは種変異体を含む、請求項 1 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7】

対立遺伝子変異体が、配列番号 3 0 0 に記載の対立遺伝子変異の 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 1 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 8】

ポリペプチドが配列番号 1 1 9 または 1 7 6 に記載の配列と同数のアミノ酸を含む、請求項 1 5 ～ 1 7 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 9】

K I T、T N F R s、F G F R - 1、V E G F R - 2、V E G F R - 3、R O N、C S F 1 R、P D G F R - B、E p h A 2、E p h B、および M E T のアイソフォームから選択された、ポリペプチド受容体アイソフォームをコードしている遺伝子のイントロンによってコードされている少なくとも 1 つのアミノ酸を含む、単離したポリペプチド。

【請求項 2 0】

ポリペプチドには膜貫通ドメインが含まれない、請求項 1 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 1】

少なくとも 1 つの追加のドメインもしくはその一部分を欠いており、それによって活性が取り除かれている、低下しているもしくは改変されている、請求項 1 9 または請求項 2 0 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 2】

受容体拮抗剤である、請求項 1 9 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 2 3】

ポリペプチドが細胞表面受容体の活性を変調する、請求項 1 ～ 2 2 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 2 4】

細胞表面受容体が同族受容体である、請求項 2 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 5】

ポリペプチドによって変調される活性が、二量体化、ホモ二量体化、ヘテロ二量体化、三量体化、キナーゼ活性、受容体関連キナーゼの活性、受容体関連プロテアーゼの活性、細胞表面受容体の自己リン酸化、細胞表面受容体のリン酸転移、シグナル伝達分子のリン酸化、リガンド結合、リガンド結合に対する細胞表面受容体との競合、シグナル伝達、シグナル伝達分子との相互作用、アポトーシスの誘導、膜会合および膜局在化のうちの1つまたは複数である、請求項23または請求項24に記載のポリペプチド。

【請求項26】

アイソフォームポリペプチドに直接または間接的に連結したFc断片をさらに含む、請求項1～25のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項27】

請求項1～26のいずれかに記載のポリペプチドをコードしているヌクレオチドの配列からなる核酸分子。

【請求項28】

イントロンおよびエクソンを含む核酸分子であって、
イントロンはストップコドンを含み；
核酸分子は、エクソンとイントロンとの接合点にまたがるオープンリーディングフレームをコードしており；かつ
オープンリーディングフレームは、イントロン中のストップコドンで終結する、
請求項27に記載の核酸分子。

【請求項29】

イントロンが、コードされたポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸をコードしている、請求項28に記載の核酸分子。

【請求項30】

ストップコドンがイントロンの最初のコドンである、請求項28または請求項29に記載の核酸分子。

【請求項31】

配列番号90、92、94、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、167、169、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223および225のいずれかに記載の核酸の配列、その対立遺伝子変異体およびその種変異体からなる、単離した核酸分子。

【請求項32】

プロモーターに動作可能に連結した請求項27～31のいずれかに記載の核酸分子を含むベクターであって、それによってCSRアイソフォームポリペプチドが発現されるベクター。

【請求項33】

請求項32に記載のベクターを含む細胞。

【請求項34】

1つの細胞表面受容体(CSR)アイソフォームの第1の部分および第2の異なるCSRアイソフォームの一部を含むキメラポリペプチドであって、

キメラポリペプチドは、1つまたは複数のチロシンキナーゼ受容体の活性を変調し；
それぞれの部分が少なくとも4、5、6、7、8、10、12、15個以上のアミノ酸残基を含み；かつ

第1および第2の細胞表面受容体アイソフォームが、請求項1～26のいずれかに記載のポリペプチドから選択されたポリペプチドを含むか、またはヘルスタチンポリペプチドである、キメラポリペプチド。

【請求項35】

イントロン融合タンパク質のイントロンにコードされた部分に直接またはリンカーを介

して連結された、第 1 の部分を含むコンジュゲートであって、

第 1 の部分が細胞表面受容体アイソフォームの細胞外ドメインの全体または一部を含み；

第 2 の部分がイントロン融合タンパク質由来のイントロンを含み；かつ

第 1 および第 2 の部分は異なる同族受容体由来である、
コンジュゲート。

【請求項 36】

イントロンにコードされた部分がヘルスタチンのイントロンにコードされた部分である、請求項 35 に記載のポリペプチド。

【請求項 37】

イントロンにコードされた部分が配列番号 334～345 のいずれかに記載されている、請求項 36 に記載のポリペプチド。

【請求項 38】

イントロン融合ポリペプチドのイントロンにコードされた部分に連結した血清アルブミンを含むコンジュゲート。

【請求項 39】

請求項 1～26 のいずれかに記載のポリペプチド、または請求項 27 もしくは 31 に記載の核酸分子、または請求項 32 に記載のベクター、または請求項 33 に記載の細胞、または請求項 34 に記載のキメラポリペプチド、または請求項 35 もしくは請求項 38 に記載のコンジュゲートを含む、薬剤組成物。

【請求項 40】

細胞表面受容体の活性を変調するために有効な濃度または量のポリペプチドを含む、請求項 39 に記載の組成物。

【請求項 41】

変調が活性の阻害である、請求項 40 に記載の組成物。

【請求項 42】

組成物のポリペプチドが、受容体チロシンキナーゼまたは腫瘍壊死因子受容体と複合体形成する、請求項 39～41 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 43】

疾患を治療するための、請求項 39～42 のいずれかに記載の組成物の使用。

【請求項 44】

疾患を治療するための医薬品を配合するための、請求項 39～42 のいずれかに記載の組成物の使用。

【国際調査報告】

60700340014

PCT/US2005/017051



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
PCT/US2005/017051

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07K14/705 C07K14/71 C07K14/715 A61K38/04

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)
 C07K A61K

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 221, 2000, pages 132-147, XP002344169 US ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY the whole document	1
X	MECHANISMS OF DEVELOPMENT., vol. 83, 1999, pages 77-94, XP002344170 IE ELSEVIER SCIENCE IRELAND LTD. the whole document	1
X	EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE., vol. 10, 1998, pages 1574-1580, XP002344171 GB OXFORD UNIVERSITY PRESS. the whole document	1

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "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)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "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
 "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
 "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
 "8" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 July 2006

Date of mailing of the international search report

09/03/2007

 Name and mailing address of the ISA/
 European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 551 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

30. 5. 2007

PCT/US2005/017051

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2005/017051

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ on paper
- ☐ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☐ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

PCT/US2005/017051

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/017051

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/26827 A (NOVARTIS) 4 April 2002 (2002-04-04) the whole document	1
X	DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 180, 1996, pages 786-789, XP002344172 US ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY the whole document	1
X	FASEB JOURNAL., vol. 15, no. 6, 2001, pages 1028-1036, XP002360326 US FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD. the whole document	99,100, 141-143, 164-176
X	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 291, no. 3, 2002, pages 554-559, XP002325317 US ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL. the whole document	99,100, 141-143, 164-176
X	WO 98/55638 A (MAX-PLANCK GES.) 10 December 1998 (1998-12-10) the whole document	99,100, 141-143, 164-176
P,X	WO 2005/016966 A (RECEPTOR BIOLOGIX) 24 February 2005 (2005-02-24) the whole document	99,100, 141-143, 164-176

PCT/US2005/017051

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/017051**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

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.:
1 (partially), 99-100, 141-143, 164-176 (partially)
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.

PCT/US2005/017051

5

International Application No. PCT/US2005/017051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of the EphA receptor, where the membrane localization is reduced or abolished compared to the wild-type EphA receptor, due to the absence of all or part of its transmembrane domain.

2. claims: 1-2, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in subject 1, comprising at least one domain of the EphA1 receptor.

3. claims: 1-2, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of an EphA2 receptor.

4. claims: 1-2, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of an EphA3 receptor.

5. claims: 1-2, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of an EphA4 receptor.

6. claims: 1-2, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of an EphA5 receptor.

7. claims: 1-2, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of an EphA6 receptor.

8. claims: 1-2, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of an EphA7 receptor.

9. claims: 1-2, 141-143, 164-176 (all partially)

PCT/US2005/017051

6

International Application No. PCT/US2005/017051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Isolated polypeptides comprising at least one domain of an EphA8 receptor.

10. claims: 7-10, 15-18 (completely), and 3, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated peptides as in claims 1-2 comprising Seq. 253-260.

11. claims: 13 (completely) and 3, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 1 comprising allelic variations of the sequences 253-260, different from Seq. 289-293.

12. claims: 4, 21 (completely), and 141-143, 164-176 (partially)

Isolated polypeptides as in claims 1-3 comprising the sequences 289-293.

13. claims: 5 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 1-4 and lacking a part of the protein kinase (PK) domain.

14. claims: 6 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 1-5 and lacking all or a part of a sterile alpha motif (SAM).

15. claims: 11-12, 14 (completely), and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 1-5 and exhibiting at least 80% identity with the sequences 149, 151 and 153.

16. claims: 19-20, 22 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 1-5 comprising at least a sequence exhibiting at least 80% homology with Seq. 168.

17. claims: 23, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of the EphB receptor, where the membrane localization is reduced or abolished compared to the wild-type EphB receptor, due to the absence of all or part of its transmembrane domain.

PCT/US2005/017051

7

International Application No. PCT/US2005 /017051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

18. claims: 23-24, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 23 comprising at least one domain of the EphB1 receptor.

19. claims: 23-24, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 23 comprising at least one domain of the EphB2 receptor.

20. claims: 23-24, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 23 comprising at least one domain of the EphB3 receptor.

21. claims: 23-24, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 23 comprising at least one domain of the EphB4 receptor.

22. claims: 23-24, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 23 comprising at least one domain of the EphB5 receptor.

23. claims: 23-24, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 23 comprising at least one domain of the EphB6 receptor.

24. claims: 25 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 23-24 comprising at least seq. 261-265 or an allelic variant thereof..

25. claims: 26 (completely), 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 23 comprising Seq. 294-298.

26. claims: 27 (completely), 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 23-26 lacking all or a part of a PK domain.

PCT/US2005/017051

8

International Application No. PCT/US2005/017051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

27. claims: 28 (completely), 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 23-27 and lacking all or a part of the SAM motif.

28. claims: 29 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides according to claims 23-28, which contain an ephrin-binding domain.

29. claims: 30 (completely), 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 23-29 and lacking one or more acids of a fibronectin domain of the EphB receptor.

30. claims: 31-32 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 23.30 and comprising an intron sequence or are operatively linked to at least an amino acid encoded by an intron, where the intron is from a gene encoding the EphB receptor.

31. claims: 33-34 (completely), 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides having at least 80% identity with the seq. 155, 170, 172 and 174.

32. claims: 35-36 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides having the sequences 294 or 297 or their allelic variations.

33. claims: 37 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of the FGFR1 receptor, where the polypeptide comprises an immunoglobulin domain corresponding to seq. 268 and lacks a transmembrane domain corresponding to the residues 375-397 of FGFR1.

34. claims: 38-39 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 37 and comprising an intron sequence or are operatively linked to at least an amino acid encoded by an intron, where the intron is from a gene encoding the FGFR1.

PCT/US2005/017051

9

International Application No. PCT/US2005/017051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

35. claims: 40 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated peptides as in claims 37-39 and lacking at least one amino acid from a PK domain.

36. claims: 41 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated peptides as in claims 37-40 and comprising one or more residues of an immunoglobulin domain corresponding to the residues 156-246 of FGFR1.

37. claims: 42-43 (completely) and 45, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated peptides having at least 80% identity with the sequences 119 and 176.

38. claims: 44 (completely) and 45, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 42-43, where the allelic variant is set forth in Seq. no. 300.

39. claims: 46 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of the FGFR2 receptor, where the polypeptide comprises seq. 269 and lacks a transmembrane and a PK domains in compared to FGFR2.

40. claims: 47-48 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 46 and comprising an intron sequence or are operatively linked to at least an amino acid encoded by an intron, where the intron is from a gene encoding the FGFR2.

41. claims: 49 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 46-48 and lacking an immunoglobulin domain corresponding to the residues 41-125 of FGFR2.

42. claims: 50, 52 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

PCT/US2005/017051

/D

International Application No. PCT/US2005 /017051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Isolated polypeptides as in claims 46-49, comprising seq. 178, 180, 182 or 184, or an allelic variant thereof.

43. claims: 51 (completely), 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 46-50 and comprising the seq. no. 301.

44. claims: 53 (completely), 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of the FGFR4 receptor, where the polypeptide comprises an immunoglobulin domain corresponding to the residues 241-351 of FGFR4 and lacks a transmembrane and a PK domains as compared to FGFR4.

45. claims: 54-55 (completely), 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 53 and comprising an intron sequence or are operatively linked to at least an amino acid encoded by an intron, where the intron is from a gene encoding the FGFR4.

46. claims: 56-57 (completely), 59, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 53-55 having at least 80% identity with seq. 121.

47. claims: 58 (completely), 59, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 53-57 having analogy with seq. 303.

48. claims: 60 (completely), 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of the DDR1 receptor, lacking a transmembrane and a PK domains as compared to DDR1 and having at least 80% identity with the sequences 115 or 117..

49. claims: 61-62 (completely), 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 60 and comprising an intron sequence or are operatively linked to at least an amino acid encoded by an intron, where the intron is from a gene encoding the DDR1.

PCT/US2005/017051

//

International Application No. PCT/US2005/017051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

50. claims: 63 (completely), 65, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 60-62 and comprising the seq. 115 or 117 or their allelic variants.

51. claims: 64 (completely), 65, 141-143, 164-176 (partially)

Isolated polypeptides as in claims 60-63 and comprising the sequence no. 286.

52. claims: 66-68 (completely), 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of the MET receptor, operatively linked to at least an intron of a gene encoding MET, and lacks a transmembrane and a PK domains and at least another additional domain as compared to MET as shown in the sequence 274.

53. claims: 69 (completely), 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 66-68, where the additional domain is selected from a SEMA domain, a plexin domain and an IPTG/IPG domain.

54. claims: 70-71 (completely), 73, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 66-69, and having at least 80% identity with Seq. 186, 188, 190, 192, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 214.

55. claims: 72 (completely), 73, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 66-71 and comprising one or more allelic variants as in seq. no. 306.

56. claims: 74 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of the RON receptor as set forth in Seq. 277, and lacking a transmembrane domains as compared to MET receptor.

57. claims: 75-76 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

PCT/US2005/017051

12

International Application No. PCT/US2005/017051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Isolated polypeptides as in claims 74 and comprising an intron sequence or are operatively linked to at least an amino acid encoded by an intron, where the intron is from a gene encoding the RON.

58. claims: 77 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated peptides as in claims 74-76, where the polypeptide lacks one or more acids of a PK as compared to RON as set forth in seq. 277.

59. claims: 78 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated peptides as in claims 74-77, where the polypeptide comprises at least one amino acid from the IPTG/TUG domain.

60. claims: 79-80 (completely) and 82, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 74-78 and exhibiting at least 80% identity with seq. 216, 218 and 220.

61. claims: 81 (completely) and 82, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising a part of the allelic variants as in seq. 308.

62. claims: 83 (completely) and 91, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of the TEK receptor as set forth in Seq. 278, and lacking a transmembrane domain, a PK domain and at least some residues of at least one of the fibronectin domains as compared to TEK receptor.

63. claims: 84-85 (completely) and 91, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 83 and comprising an intron sequence or are operatively linked to at least an amino acid encoded by an intron, where the intron is from a gene encoding the TEK.

64. claims: 86-87 (completely) and 91, 141-143, 164-176 (all partially)

PCT/US2005/017051

13

International Application No. PCT/US2005 /017051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Isolated polypeptides as in claims 83-85, wherein the polypeptide lacks one or more amino acids of the three fibronectin domains of the TEK receptor as corresponding to the residues 444-529, 543-626 and 639-724 of seq. 278.

65. claims: 88-89 (completely) and 91, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 83-87 and corresponding to the sequences 131 and 133.

66. claims: 90 (completely) and 91, 141-143, 164-176 (all partially)I

Isolated peptides comprising a part of the allelic variants as in seq. 309.

67. claims: 92 (completely) and 94, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 83-90 and comprising at least a domain of a Tie-1 receptor as set forth in seq. 279, where the polypeptide lacks a transmembrane domain and a PK domain as compared to the TEK receptor and comprising seq. 135, 137, 139, 141, 143, 222.

68. claims: Claims 93 (completely) and 94, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 83-90 and 92 and comprising allelic variations of seq. 310.

69. claims: 95 (completely) and 97, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising a sequence at least 80% identical with seq. 223 and lacking a transmembrane and a PK domains as compared to the VEGFR1 receptor of seq. 282.

70. claims: 96 (completely) and 97, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 95 and comprising seq. 123 or an allelic variant thereof.

71. claims: 98 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

PCT/US2005/017051

14

International Application No. PCT/US2005/017051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Isolated polypeptides as in claims 95-96 and comprising at least one domain of a VEGFR as set forth in seq. 283 and 284 and lacking one or more amino acids of the transmembrane domain of VEGFR.

72. claims: 99-100 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 95-98 and comprising an intron sequence or are operatively linked to at least an amino acid encoded by an intron, where the intron is from a gene encoding the VEGFR.

73. claims: 101 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated peptides as in claims 95-100 and lacking one or more amino acids of a PK domain.

74. claims: 102 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated peptides as in claims 95-101 and lacking one or more amino acids of an immunoglobulin domain.

75. claims: 103-104 (completely) and 106, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 95-102 and exhibiting at least 80% identity with seq. 125, 127, 224 and 226.

76. claims: 105 (completely) and 106, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 95-104 and comprising one or more allelic variations as in seq. 313 and 314.

77. claims: 107 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of a PDGFR-B as set in seq. 276 and lacking one or more amino acids of a transmembrane domain of PDGFR-B.

78. claims: 108-109 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 107 and comprising an intron sequence or are operatively linked to at least an amino acid encoded by an intron, where the intron is from a gene encoding the PDGFR-B.

PCT/US2005/017051

15

International Application No. PCT/US2005/017051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

79. claims: 110 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 107-109 and lacking one or more amino acids of a PK domain.

80. claims: 111 (completely) and 141-143, 165-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 107-110 and comprising one or more amino acids of an immunoglobulin domain.

81. claims: 112, 113 (completely) and 115, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 107-111 and exhibiting 80% sequence identity with seq. 147.

82. claims: 114 (completely) and 115, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 107-113 and comprising one or more amino acids of the allelic variations set forth in seq. 307.

83. claims: 116 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of a CSFR1 as set in seq. 276 and lacking one or more amino acids of a transmembrane domain of CSFR1.

84. claims: 117-118 (completely) and 141-143, 16-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 116 and comprising an intron sequence or are operatively linked to at least an amino acid encoded by an intron, where the intron is from a gene encoding the CSFR1.

85. claims: 119 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 116-118 and lacking one or more amino acids of a PK domain.

86. claims: 120 (completely), 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 116-119 and comprising one or more amino acids of an immunoglobulin domain.

PCT/US2005/017051

16

International Application No. PCT/US2005 /017051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

87. claims: 121, 122 (completely), 124, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides having at least 80% sequence identity with the seq. 145.

88. claims: 123 (completely) and 124, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising one or more amino acids of the allelic variations set forth in seq. 285.

89. claims: 125 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising at least one domain of a KIT as set in seq. 273 and lacking one or more amino acids of a transmembrane domain and one or more amino acids of a PK domain of KIT.

90. claims: 126-127 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 125 and comprising an intron sequence or are operatively linked to at least an amino acid encoded by an intron, where the intron is from a gene encoding the KIT.

91. claims: 128 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 125-127 and comprising one or more amino acids of an immunoglobulin domain.

92. claims: 129-130 (completely) and 132, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides exhibiting 80% identity to seq. 93.

93. claims: 131 (completely), 132, 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising one or more amino acids of the allelic variations set forth in seq. 305.

94. claims: 133 (completely), 141-143, 164-176 (all partially)

PCT/US2005/017051

17

International Application No. PCT/US2005/017051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Isolated polypeptides comprising at least one domain of a TNFR as set in seq. 280 or 281 and lacking one or more amino acids of a transmembrane domain of TNFR.

95. claims: 134-135 (completely), 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 133 and comprising an intron sequence or are operatively linked to at least an amino acid encoded by an intron, where the intron is from a gene encoding the TNFR.

96. claims: 136 (completely) and 141-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claim 133-135 and comprising at least two cysteine-rich c6 domains of TNFR.

97. claims: 137-138 (completely), 140-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides as in claims 133-136 and exhibiting at least 80% identity with seq. 95.

98. claims: 139 (completely), 140-143, 164-176 (all partially)

Isolated polypeptides comprising one or more amino acids of the allelic variations set forth in seq. 312.

99. claims: 144-149, 157-163, 178-182, 191-199, 217-225

Pharmaceutical preparations containing an isolated peptide of any of the claims 1-143 and methods to prepare medicaments based on the above peptides.

100. claims: 150, 183, 187-188 (completely) and 155-156, 189-190 (all partially)

Nucleic acids encoding for a sequence of claims 1-143, vectors comprising them and cells including those vectors.

101. claims: 151-153, 184-186 (completely) and 151-153, 189-190 (all partially)

Nucleic acids encoding a sequence of claims 1-143 and comprising an intron and an exon, wherein the intron contains a stop codon and the nucleic acid encodes an open reading frame which spans an exon-intron junction, and the open reading frame terminates at the stop codon of the intron, vectors containing them and cells including those vectors.

PCT/US2005/017051

18

International Application No. PCT/US2005/017051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

102. claims: 154 (completely) and 155-156, 189-190 (all partially)

Nucleic acids encoding one of the sequences 90, 92, 94, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223 and 225 or their allelic variants, vectors comprising them and cells including those vectors.

103. claim: 177 (completely)

Isolated polypeptides of claims 1-143, further including a TNFR isoform.

104. claims: 200-204 (completely)

Chimeric peptides containing a portion of a cell surface receptor (CSR) and a portion of a second, different CSR.

105. claims: 205-210 (completely)

Conjugates including a first portion linked to an intron-encoded polypeptide, wherein the resulting polypeptide modulate the activity of a CSR.

106. claims: 211-212 (completely)

A peptide containing a N-portion of a receptor different from HER-2, and an intron wherein the polypeptide lacks all or a part of a transmembrane domain, and is able to modulate the activity of a CSR.

107. claims: 213-216 (completely)

A method to prepare a synthetic intron-containing fusion protein.

108. claims: 226-229 (completely)

An isolated polypeptide comprising at least an amino acid encoded by the intron of a gene encoding a polypeptide receptor isoform selected from FGFR4, KIT, TNFRs, DDR1, FGFR1, VEGFR2, VEGFR3, RON, TEK, CSFR1, PDGFR-B, EphA, EphB, MET.

PCT/US2005/017051

19

International Application No. PCT/US2005/017051

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**109. claims: 230-231 (completely)**

Combinations of one or more cell surface receptors isoforms
and one therapeutic drug.

110. claims: 232-234 (completely)

Pharmaceutical compositions containing the combinations of
claims 230-231 and their use in the preparation of
medicaments.

PCT/US2005/017051

201

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/017051

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0226827	A	04-04-2002	AU	1229202 A	08-04-2002
WO 9855638	A	10-12-1998	AT	312935 T	15-12-2005
			AU	8435698 A	21-12-1998
			JP	2002511750 T	16-04-2002
			US	2005235367 A1	20-10-2005
			US	7011973 B1	14-03-2006
WO 2005016966	A	24-02-2005	AU	2004265226 A1	24-02-2005
			CA	2525969 A1	24-02-2005
			EP	1626988 A2	22-02-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A	
A 6 1 K	38/45	(2006.01)	A 6 1 K	37/52		
A 6 1 K	38/55	(2006.01)	A 6 1 K	37/64		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	
A 6 1 K	35/76	(2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	35/76		
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/713		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00		
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	9/00		
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	27/02		
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10		
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	1/04		
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/12		
A 6 1 P	9/14	(2006.01)	A 6 1 P	15/00		
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	9/14		
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/28		
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	43/00		
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/00		
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	31/12		
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	35/04		
A 6 1 P	9/08	(2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 P	13/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06		
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	9/08		
A 6 1 P	31/22	(2006.01)	A 6 1 P	13/02		
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	11/06		
A 6 1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	35/02		
A 6 1 P	33/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/22		
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/18		
			A 6 1 P	31/16		
			A 6 1 P	33/00		
			A 6 1 K	37/02		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,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,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,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,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR, CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,L T,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN ,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 シェパード, マイケル, エイチ.

アメリカ合衆国, カリフォルニア州, サン フランシスコ, ノエ ストリート 1 2 1 7

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA63 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09 CA10 CA12 DA03
EA04 FA02 FA10 GA11 GA18 HA03 HA08 HA12 HA14
4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA25 CA24 CA44
4C084 AA01 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 DC25 DC32
DC50 MA17 MA66 NA14 ZA01 ZA02 ZA16 ZA33 ZA36 ZA39
ZA45 ZA59 ZA66 ZA81 ZA89 ZA96 ZB07 ZB11 ZB15 ZB21
ZB26 ZB27 ZB31 ZB33 ZB37 ZC20 ZC35 ZC42
4C086 AA01 EA17 EA18 MA01 MA04 MA17 MA66 NA14 ZA01 ZA02
ZA16 ZA33 ZA36 ZA39 ZA45 ZA59 ZA66 ZA81 ZA89 ZA96
ZB07 ZB11 ZB15 ZB21 ZB26 ZB27 ZB31 ZB33 ZB37 ZC20
ZC35 ZC42
4C087 AA01 BC83 CA12 MA17 MA66 NA14 ZA01 ZA02 ZA16 ZA33
ZA36 ZA39 ZA45 ZA59 ZA66 ZA81 ZA89 ZA96 ZB07 ZB11
ZB15 ZB21 ZB26 ZB27 ZB31 ZB33 ZB37 ZC20 ZC35 ZC42
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 EA20 FA72 FA74 GA26