

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-514448

(P2004-514448A)

(43) 公表日 平成16年5月20日(2004.5.20)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
<b>A O 1 K 67/027</b>	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 4
<b>A 6 1 P 1/04</b>	A 6 1 P 1/04	4 B O 6 5

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 202 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-546727 (P2002-546727)	(71) 出願人	500203709 アムジェン インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 913 20, サウザンド オークス, ワン アムジェン センター ドライブ
(86) (22) 出願日	平成13年11月28日 (2001.11.28)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月27日 (2003.5.27)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/044866	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02002/044379	(72) 発明者	ジン, シュキアン アメリカ合衆国 カリフォルニア 913 62, サウザンド オークス, ボーデ ロ レーン 3254
(87) 国際公開日	平成14年6月6日 (2002.6.6)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/253,476		
(32) 優先日	平成12年11月28日 (2000.11.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 トランスフォーミング増殖因子β関連分子およびその使用

## (57) 【要約】

本発明は、トランスフォーミング増殖因子 - 関連 (TGF - R) のポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞、および TGF - R ポリペプチドを産生するための方法も提供する。本発明はさらに、TGF - R ポリペプチドに関連する疾患、障害、および状態を処置、診断、改善、および/または予防するための方法を提供する。TGF - R アミノ酸配列を含む融合ポリペプチドもまた、提供される。本発明はまた、本明細書中に記載の単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に記載の組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、ならびにこの宿主細胞を培養する工程およびそのようにしてされたポリペプチドを必要に応じて単離する工程を包含する、TGF - R ポリペプチドを産生する方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

単離された核酸分子であって、以下：

- (a) 配列番号 1 または配列番号 3 のいずれかに示されるヌクレオチド配列；
- (b) A T C C 寄託番号 P T A - 2 6 6 5 または A T C C 寄託番号 P T A - 2 6 6 6 における D N A 挿入物のヌクレオチド配列；
- (c) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
- (d) 少なくとも中程度にストリンジェントな条件下で (a) ~ (c) のいずれかのヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列；および
- (e) (a) ~ (c) のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

10

## 【請求項 2】

単離された核酸分子であって、以下：

- (a) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドに少なくとも約 70 パーセント同一のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該コードされたポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (b) ヌクレオチド配列であって、配列番号 1 もしくは配列番号 3 のいずれかに示されるヌクレオチド配列、A T C C 寄託番号 P T A - 2 6 6 5 もしくは A T C C 寄託番号 P T A - 2 6 6 6 における D N A 挿入物のヌクレオチド配列、または (a) のヌクレオチド配列の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；
- (c) 配列番号 1 もしくは配列番号 3 のヌクレオチド配列、A T C C 寄託番号 P T A - 2 6 6 5 もしくは A T C C 寄託番号 P T A - 2 6 6 6 における D N A 挿入物のヌクレオチド配列、または少なくとも約 25 アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする (a) もしくは (b) のヌクレオチド配列のいずれかの領域であって、該ポリペプチドフラグメントが、配列番号 2 もしくは配列番号 4 のいずれかに示される該コードされたポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、領域；
- (d) 配列番号 1 もしくは配列番号 3 のヌクレオチド配列、A T C C 寄託番号 P T A - 2 6 6 5 または A T C C 寄託番号 P T A - 2 6 6 6 における D N A 挿入物の該ヌクレオチド配列、または少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む (a) ~ (c) のいずれかのヌクレオチド配列の領域；
- (e) ヌクレオチド配列であって、少なくとも中程度にストリンジェントな条件下で (a) ~ (d) のいずれかのヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列；および
- (f) (a) ~ (d) のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

20

30

## 【請求項 3】

単離された核酸分子であって、以下：

- (a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該コードされたポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該コードされたポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該コードされたポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する

40

50

、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮化および/またはN末端短縮化を有する配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該コードされたポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮化およびN末端短縮化からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該コードされたポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示される該ポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

10

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、(a)~(e)のいずれかのヌクレオチド配列；

(g) 少なくとも中程度にストリンジェントな条件下で(a)~(f)のいずれかのヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列；および

(h) (a)~(e)のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項4】

請求項1、2または3のいずれかに記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項5】

請求項4に記載のベクターを含む、宿主細胞。

20

【請求項6】

真核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項7】

原核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項8】

TGF- $\beta$ -Rポリペプチドを産生するプロセスであって、請求項5に記載の宿主細胞を、該ポリペプチドを発現するために適切な条件下で培養する工程、および必要に応じて、該ポリペプチドを該培養物から単離する工程を包含する、プロセス。

【請求項9】

請求項8に記載のプロセスによって産生される、ポリペプチド。

30

【請求項10】

請求項8に記載のプロセスであって、前記核酸分子が、TGF- $\beta$ -RポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結された、ネイティブなTGF- $\beta$ -RポリペプチドについてのプロモーターDNA以外のプロモーターDNAを含む、プロセス。

【請求項11】

請求項2に記載の単離された核酸分子であって、前記パーセント同一性が、GAP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、およびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを使用して決定される、核酸分子。

【請求項12】

化合物が、TGF- $\beta$ -Rポリペプチド活性またはTGF- $\beta$ -Rポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項5、6または7のいずれかに記載の細胞を、該化合物に曝露する工程、および該細胞中でのTGF- $\beta$ -Rポリペプチド活性またはTGF- $\beta$ -Rポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス。

40

【請求項13】

単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるアミノ酸配列；

(b) ATCC寄託番号PTA-2665またはATCC寄託番号PTA-2666におけるDNA挿入物によってコードされる、アミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

50

## 【請求項 14】

単離されたポリペプチドであって、以下：

- (a) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかのオルソログについてのアミノ酸配列；
- (b) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約 70 パーセント同一のアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
- (c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基を含む配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、該フラグメントが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、フラグメント；および
- (d) アミノ酸配列であって、配列番号 2 もしくは配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列、ATCC 寄託番号 PTA - 2665 もしくは ATCC 寄託番号 PTA - 2666 における DNA 挿入物のヌクレオチド配列、または (a) もしくは (b) のいずれかのアミノ酸配列の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

10

## 【請求項 15】

単離されたポリペプチドであって、以下：

- (a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
- (b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
- (c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
- (d) C 末端短縮化および/または N 末端短縮化を有する配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに
- (e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮化および N 末端短縮化からなる群より選択される少なくとも 1 つの改変を有する、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

20

30

## 【請求項 16】

請求項 1、2、または 3 のいずれかの核酸分子によってコードされる、単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、単離されたポリペプチド。

## 【請求項 17】

請求項 14 に記載の単離されたポリペプチドであって、パーセント同一性が、GAP、BLASTP、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit および Smith-Waterman アルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを使用して決定される、単離されたポリペプチド。

40

## 【請求項 18】

請求項 13、14 または 15 のいずれかに記載のポリペプチドを特異的に結合する、選択的結合因子またはそのフラグメント。

## 【請求項 19】

請求項 18 に記載の選択的結合因子またはそのフラグメントであって、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはそれらのフラグメントを特異的に結合する、選択的結合因子またはそのフラグメント。

50

## 【請求項 20】

抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

## 【請求項 21】

ヒト化抗体である、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

## 【請求項 22】

ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

## 【請求項 23】

ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

## 【請求項 24】

モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

## 【請求項 25】

キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

## 【請求項 26】

C D R - グラフト化された抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

## 【請求項 27】

抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

## 【請求項 28】

可変領域フラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

## 【請求項 29】

F a b フラグメントまたは F a b ' フラグメントである、請求項 28 に記載の可変領域フラグメント。

## 【請求項 30】

選択的結合因子またはそのフラグメントであって、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドについての特異性を有する少なくとも 1 つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子またはそのフラグメント。

## 【請求項 31】

検出可能な標識に結合している、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

## 【請求項 32】

T G F - - R ポリペプチドの生物学的活性を拮抗する、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

## 【請求項 33】

T G F - - R ポリペプチドに関連する、疾患、状態または障害を処置、予防または改善するための方法であって、患者に、請求項 18 に記載の有効量の選択的結合因子を投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 34】

動物を、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドで免疫することによって産生される、選択的結合因子。

## 【請求項 35】

請求項 13、14 または 15 のいずれかに記載のポリペプチドを結合し得る選択的結合因子を産生する、ハイブリドーマ。

## 【請求項 36】

抗 T G F - - R 抗体または請求項 18 に記載のフラグメントを使用して、T G F - - R ポリペプチドの量を検出または定量する方法。

## 【請求項 37】

生物学的サンプル中の T G F - - R ポリペプチドの量を検出または定量するためのキットであって、請求項 18 に記載の選択的結合因子を備える、キット。

10

20

30

40

50

## 【請求項 38】

請求項 13、14 または 15 のいずれかに記載のポリペプチド、および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

## 【請求項 39】

前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、可溶化剤、安定剤または抗酸化剤である、請求項 38 に記載の組成物。

## 【請求項 40】

請求項 13、14 または 15 のいずれかに記載のポリペプチドの誘導体を包含する、ポリペプチド。

## 【請求項 41】

水溶性ポリマーを用いて共有結合的に改変された、請求項 40 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 42】

前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシ - ポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ - (N - ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド / エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオールおよびポリビニルアルコールからなる群より選択される、請求項 41 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 43】

請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の核酸分子および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

## 【請求項 44】

前記核酸分子が、ウイルスペクターに含まれる、請求項 43 に記載の組成物。

## 【請求項 45】

請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の核酸分子を含む、ウイルスペクター。

## 【請求項 46】

異種アミノ酸配列に融合された、請求項 13、14 または 15 のいずれかに記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。

## 【請求項 47】

前記異種アミノ酸配列が、IgG 定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項 46 に記載の融合ポリペプチド。

## 【請求項 48】

医学的状态を処置、予防または改善するための方法であって、請求項 13、14 もしくは 15 のいずれかに記載のポリペプチド、または請求項 1、2 もしくは 3 のいずれかに記載の核酸によってコードされるポリペプチドを患者に投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 49】

被験体における病理学的状態または病理学的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：

(a) 請求項 13、14 もしくは 15 のいずれかに記載のポリペプチドまたは請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドの発現の、サンプル中での存在または量を決定する工程；ならびに

(b) 該ポリペプチドの発現の存在または量に基づいて、病理学的状態または病理学的状態に対する感受性を診断する工程、を包含する、方法。

## 【請求項 50】

デバイスであって、以下：

(a) 移植に適する膜；および

(b) 該膜内にカプセル化された細胞

を備え、該細胞が、請求項 13、14 または 15 のいずれかに記載のタンパク質を分泌し、そして該膜が、該タンパク質に対して透過性であり、そして該細胞に対して有害な物質に対して不透過性である、デバイス。

10

20

30

40

50

## 【請求項 5 1】

TGF - - R ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、以下：

(a) 請求項 1 3、1 4 または 1 5 のいずれかに記載のポリペプチドを化合物と接触させる工程；および

(b) 該化合物に対する該 TGF - - R ポリペプチドの結合の程度を決定する工程、を包含する、方法。

## 【請求項 5 2】

該化合物に結合した場合のポリペプチドの活性を決定する工程をさらに包含する、請求項 5 1 に記載の方法。

## 【請求項 5 3】

請求項 1、2、または 3 のいずれかに記載の核酸分子を動物に投与する工程を包含する、該動物におけるポリペプチドのレベルを調節する方法。

## 【請求項 5 4】

請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。

## 【請求項 5 5】

化合物が、TGF - - R ポリペプチド活性または TGF - - R ポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項 5 4 に記載のトランスジェニック哺乳動物を、該化合物に曝露する工程、および該哺乳動物中での TGF - - R ポリペプチド活性または TGF - - R ポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス

## 【請求項 5 6】

固体支持体に付着された、請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の核酸分子。

## 【請求項 5 7】

少なくとも 1 つの、請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の核酸分子を含む核酸分子のアレイ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本出願は、米国仮特許出願第 60 / 253, 476 号 (2000 年 11 月 28 日出願) からの優先権を主張する。この開示は、参考として本明細書中に明確に援用される。

## 【0002】

## (発明の分野)

本発明は、トランスフォーミング増殖因子 - - 関連 (TGF - - R) ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、TGF - - R ポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞、および方法に関する。本発明はさらに、TGF - - R ポリペプチドに関連する疾患、障害および状態の診断、処置、改善および / または予防のための薬学的組成物および方法に関する。

## 【0003】

## (発明の背景)

核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作における技術的進歩ならびにヒトゲノムの解読は、新規の治療剤の発見を大きく加速した。現在では、高速の核酸配列決定技術により、前例のない速度で配列情報が作製され得、そしてコンピュータ分析と結合されて、部分的または全体的なゲノムへと重複する配列を集合させることが可能であり、そしてポリペプチドコード領域の同定が可能である。既知アミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較は、以前に同定された配列および / または構造の目印に対する相同性の程度を決定することを可能にし得る。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療剤として使用するために有利な特性を産物に付与し得る。

## 【0004】

過去10年間にわたるゲノム研究における著しい技術的進歩にも関わらず、ヒトゲノムに基づいた新規の治療剤の開発に対する可能性は、未だ広範には実現されていない。潜在的に有利なポリペプチド治療剤をコードする多くの遺伝子またはこれらがコードするポリペプチド（これらは、治療的分子に対して「標的」として機能し得る）は、依然として同定されていない。従って、診断的または治療的な利点を有する、新規なポリペプチドおよびこれらをコードする核酸分子を同定することが、本発明の目的である。

【0005】

（発明の要旨）

本発明は、新規の T G F - R 核酸分子およびコードされるポリペプチドに関する。

【0006】

本発明は、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する：

- (a) 配列番号1または配列番号3のいずれかに記載のヌクレオチド配列；
- (b) A T C C 登録番号 P T A - 2 6 6 5 または P T A - 2 6 6 6 における D N A インサートのヌクレオチド配列；
- (c) 配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
- (d) 少なくとも中程度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (c) のいずれかのヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；および
- (e) (a) ~ (c) のいずれかのヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列

10

20

【0007】

本発明はまた、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する：

- (a) 配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドに対して、少なくとも約70%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、コードされるポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (b) 配列番号1または3のいずれかのヌクレオチド配列、A T C C 登録番号 P T A - 2 6 6 5 もしくは P T A - 2 6 6 6 における D N A インサート、または (a) のヌクレオチド配列に記載のヌクレオチド配列の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードする、ヌクレオチド配列；
- (c) 少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1もしくは配列番号3のヌクレオチド配列、A T C C 登録番号 P T A - 2 6 6 5 もしくは P T A - 2 6 6 6 における D N A インサート、または (a) もしくは (b) のヌクレオチド配列の、領域であって、ここで、このポリペプチドフラグメントが、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、ヌクレオチド配列領；
- (d) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号1もしくは配列番号3のヌクレオチド配列、A T C C 登録番号 P T A - 2 6 6 5 もしくは P T A - 2 6 6 6 における D N A インサート、または (a) ~ (c) のいずれかのヌクレオチド配列のヌクレオチド配列の、領域；
- (e) 少なくとも中程度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (d) のいずれかのヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列；および
- (f) (a) ~ (e) のいずれかのヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列

30

40

【0008】

本発明はさらに、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する：

- (a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号2または配列番号4に記

50

載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、コードされるポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する、配列番号 2 または配列番号 4 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、コードされるポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列。

【0009】

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する、配列番号 2 または配列番号 4 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、コードされるポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

10

(d) C 末端および / または N 末端の切断 ( t r u n c a t i o n ) を有する、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、コードされるポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端切断および N 末端切断からなる群から選択される少なくとも 1 つの改変を有する、配列番号 2 または配列番号 4 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされるポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載のコードされるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

20

(f) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、(a) ~ (e) のいずれかのヌクレオチド配列；

(g) 少なくとも中程度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (f) のいずれかのヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(h) (a) ~ (e) のいずれかのヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列。

【0010】

本発明は、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する；

30

(a) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載のアミノ酸；および

(b) A T C C 登録番号 P T A - 2 6 6 5 または P T A - 2 6 6 6 における D N A インサートによってコードされるアミノ酸配列；

本発明はまた、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する；

(a) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかのオルソログ ( o r t h o l o g ) についてのアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかのアミノ酸配列に対して、少なくとも約 70% 同一であるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有するアミノ酸配列；

40

(c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基を含む、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載のアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、このフラグメントが、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、アミノ酸配列のフラグメント；および

(d) 配列番号 2 もしくは配列番号 4 のいずれかに記載のアミノ酸配列、A T C C 登録番号 P T A - 2 6 6 5 または P T A - 2 6 6 6 における D N A インサート、または (a) もしくは (b) のいずれかのアミノ酸配列の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体についてのアミノ酸配列。

【0011】

本発明はさらに、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペ

50

チドを提供する：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端および/またはN末端の切断を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端切断およびN末端切断からなる群から選択される少なくとも1つの改変を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列。

【0012】

TGF - - Rアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドもまた、提供される。

【0013】

本発明はまた、本明細書中に記載の単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に記載の組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、ならびにこの宿主細胞を培養する工程およびそのようにしてされたポリペプチドを必要に応じて単離する工程を包含する、TGF - - Rポリペプチドを産生する方法を提供する。

【0014】

TGF - - Rポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物もまた、本発明によって包含される。TGF - - R核酸分子は、TGF - - Rポリペプチドの発現およびレベルの増加（これは、循環レベルの増加を含み得る）を可能にする様式で、動物中に導入される。あるいは、TGF - - R核酸分子は、内因性TGF - - Rポリペプチドの発現を抑制する様式で、動物に導入される（すなわち、TGF - - Rポリペプチド遺伝子ノックアウトを有するトランスジェニック非ヒト動物を生成する）。このトランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物であり、そしてより好ましくは、げっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）である。

【0015】

本発明のTGF - - Rポリペプチドの誘導体もまた、提供される。

【0016】

さらに、本発明のTGF - - Rポリペプチドを特異的に結合し得る選択的結合因子（例えば、抗体およびペプチド）が提供される。このような抗体およびペプチドは、アゴニスト性またはアンタゴニスト性であり得る。

【0017】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチドまたは選択的結合因子、および1以上の薬学的に受容可能な処方剤を含む薬学的組成物もまた、本発明によって包含される。この薬学的組成物は、本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドの治療的有効量を提供するように使用される。本発明はまた、このポリペプチド、核酸分子、および選択的結合因子を使用する方法に関する。

【0018】

本発明のTGF - - Rポリペプチドおよび核酸分子を使用して、本明細書中に列挙される疾患および障害を含む疾患および障害を処置、予防、改善、および/または検出し得る。

【0019】

10

20

30

40

50

本発明はまた、TGF-β-Rポリペプチドに結合する試験分子を同定するために試験分子をアッセイする方法を提供する。この方法は、試験分子がポリペプチドに結合する程度を決定するために、TGF-β-Rポリペプチドと試験分子を接触させる工程を包含する。この方法はさらに、このような試験分子がTGF-β-Rポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストのどちらであるかを決定する工程を包含する。本発明はさらに、TGF-β-Rポリペプチドの発現またはTGF-β-Rポリペプチドの活性に対する、分子の影響を試験する方法を、提供する。

#### 【0020】

TGF-β-Rポリペプチドの発現を制御する方法およびTGF-β-Rポリペプチドのレベルを調節する（例えば、増加および減少させる）方法もまた、本発明によって包含される。1つの方法は、TGF-β-Rポリペプチドをコードする核酸分子を、動物に投与する工程を包含する。別の方法において、TGF-β-Rポリペプチドの発現を制御または調節するエレメントを含む核酸分子が、投与され得る。これらの方法の例として、さらに本明細書に記載されるような、遺伝子治療、細胞治療、および抗アンチセンス治療が、挙げられる。

#### 【0021】

本発明の別の局面において、TGF-β-Rポリペプチドは、そのレセプター（「TGF-β-Rポリペプチドレセプター」）を同定するために、使用され得る。「発現クローニング」の種々の形態を広範に使用して、タンパク質リガンドに対するレセプターがクローニングされている。例えば、SimonsenおよびLodish、1994、Trends Pharmacol. Sci. 15: 437~41ならびにTartagliaら、1995、Cell 83: 1263~71を参照のこと。TGF-β-Rポリペプチドレセプターの単離は、TGF-β-Rポリペプチドシグナル伝達経路の新規なアゴニストおよびアンタゴニストの同定または開発に対して、有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性TGF-β-Rポリペプチドレセプター、抗TGF-β-Rポリペプチドレセプター-選択的結合因子（例えば、抗体およびその誘導体）、低分子、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、これらの任意のものは、本明細書中で開示される疾患または障害を含む1つ以上の疾患または障害の処置のために、使用され得る。

#### 【0022】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で使用される節の見出しは、構成上の目的のためのみであり、そしてそこに記載される内容を限定するように解釈されるべきではない。本願において引用される全ての参考文献が、明確に、本明細書中に参考として援用される。

#### 【0023】

（定義）

用語「TGF-β-R遺伝子」または「TGF-β-R核酸分子」または「TGF-β-Rポリヌクレオチド」とは、配列番号1または配列番号3のいずれかに示されるヌクレオチド配列、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-2665またはPTA-2666におけるDNAインサートのヌクレオチド配列、および本明細書中で定義される核酸分子を含むかまたはこれらからなる、核酸分子をいう。

#### 【0024】

用語「TGF-β-Rポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物または生物の集団の染色体上の所定の遺伝子座を占める遺伝子の、天然に存在する可能ないくつかの代替形態のうちの1つをいう。

#### 【0025】

用語「TGF-β-Rポリペプチドスプライス改変体」とは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるTGF-β-Rポリペプチドアミノ酸配列のRNA転写物中のイントロン配列の選択的プロセッシングによって生成される、核酸分子（通常はRNA）をい

う。

【0026】

用語「単離された核酸分子」とは、(1)総核酸が供給源細胞から単離される場合に、その核酸分子が天然で一緒に見出されるタンパク質、脂質、糖質、または他の物質の少なくとも約50パーセントから分離された、本発明の核酸分子、(2)「単離された核酸分子」が天然で連結しているポリヌクレオチドの、全てまたは一部に連結していない、本発明の核酸分子、(3)天然では連結しないポリヌクレオチドに作動可能に連結した本発明の核酸分子、または(4)より大きなポリヌクレオチド配列の一部として天然には存在しない本発明の核酸分子、をいう。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、いずれの他の混入核酸分子も、天然の環境において見出されるいずれの他の混入物(これらは、ポリペプチド産生におけるその使用、またはその治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる)も実質的に含まない。

10

【0027】

用語「核酸配列」または「核酸分子」とは、DNAまたはRNA配列をいう。この用語は、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのいずれかから形成される分子を含み、例えば、以下であるがこれらに限定されない：4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン(pseudoisocytosine)、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソ-ペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノ-メチル-2-チオウラシル、β-D-マンノシルキューオシン(beta-D-mannosylqueosine)、5'-メトキシカルボニル-メチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、および2,6-ジアミノプリン。

20

30

【0028】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を移すために使用される任意の分子(例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス)をいうために使用される。

【0029】

用語「発現ベクター」とは、宿主細胞の形質転換に適しており、そして挿入された異種核酸配列の発現を、指示および/または制御する核酸配列を含むベクターをいう。発現としては、転写、翻訳、およびRNAスプライシング(イントロンが存在する場合)のようなプロセスが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0030】

用語「作動可能に連結される」は、隣接配列の配置をいうために、本明細書中で使用される。ここで、このように記載される隣接配列は、その通常の機能を行うように構成または構築される。従って、コード配列に作動可能に連結した隣接配列は、このコード配列の複製、転写および/または翻訳を行うことが可能であり得る。例えば、コード配列は、プロモーターがそのコード配列の転写を指示し得る場合に、プロモーターに作動可能に連結されている。隣接配列は、これが正確に機能する限り、コード配列と連続する必要はない。したがって、例えば、介在する非翻訳性であるが転写される配列が、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そしてこのプロモーター配列は、なおこのコード配列に「作動可能に連結される」とみなされ得る。

50

## 【0031】

用語「宿主細胞」は、核酸配列により形質転換されたか、または形質転換され得、次いで目的の選択された遺伝子を発現し得る細胞をいうために使用される。この用語は、選択された遺伝子が存在する限り、その子孫が形態学または遺伝子構造において本来の親と同一であろうとなかろうと、親細胞の子孫を含む。

## 【0032】

用語「TGF- $\beta$  - Rポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドおよび関連ポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、TGF- $\beta$  - Rポリペプチドフラグメント、TGF- $\beta$  - Rポリペプチドオルソログ、TGF- $\beta$  - Rポリペプチド改変体、およびTGF- $\beta$  - Rポリペプチド誘導体が挙げられ、これらの関連ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する。TGF- $\beta$  - Rポリペプチドは、本明細書中に定義される場合成熟ポリペプチドであり得、そしてそれらの調製方法によっては、アミノ末端メチオニン残基を有しても有さなくてもよい。

10

## 【0033】

用語「TGF- $\beta$  - Rポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドのアミノ末端での短縮（リーダー配列を有しても有しなくてもよい）および/またはカルボキシル末端での短縮を含む、ポリペプチドをいう。用語「TGF- $\beta$  - Rポリペプチドフラグメント」とはまた、TGF- $\beta$  - Rポリペプチドオルソログ、TGF- $\beta$  - Rポリペプチド誘導体、あるいはTGF- $\beta$  - Rポリペプチド改変体のアミノ末端短縮および/またはカルボキシル末端短縮をいうか、あるいは、TGF- $\beta$  - Rポリペプチド対立遺伝子改変体またはTGF- $\beta$  - Rポリペプチドスプライス改変体によりコードされるポリペプチドのアミノ末端短縮および/またはカルボキシル末端短縮をいう。TGF- $\beta$  - Rポリペプチドフラグメントは、オルタナティブRNAスプライシングから、またはインビボプロテアーゼ活性から生じ得る。TGF- $\beta$  - Rポリペプチドの膜結合形態は、本発明によりまた意図される。好ましい実施形態において、短縮および/または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100アミノ酸より多いアミノ酸を含む。このように生成されたポリペプチドフラグメントは、約25の連続するアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100アミノ酸より多いアミノ酸を含む。このようなTGF- $\beta$  - Rポリペプチドフラグメントは、必要に応じてアミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、TGF- $\beta$  - Rポリペプチドに対する抗体を作製するために用いられ得ることが認識される。

20

30

## 【0034】

用語「TGF- $\beta$  - Rポリペプチドオルソログ」とは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるTGF- $\beta$  - Rポリペプチドアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスTGF- $\beta$  - RポリペプチドとヒトTGF- $\beta$  - Rポリペプチドとは、互いにオルソログであるとみなされる。

## 【0035】

用語「TGF- $\beta$  - Rポリペプチド改変体」とは、配列番号2または配列番号4（リーダー配列を有するかまたは有さない）のいずれかに示されるTGF- $\beta$  - Rポリペプチドアミノ酸配列と比較して、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失（例えば、内部欠失および/またはTGF- $\beta$  - Rポリペプチドフラグメント）、および/または付加（例えば、内部付加および/またはTGF- $\beta$  - R融合ポリペプチド）を有するアミノ酸配列を含むTGF- $\beta$  - Rポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在する（例えば、TGF- $\beta$  - Rポリペプチド対立遺伝子改変体、TGF- $\beta$  - Rポリペプチドオルソログ、およびTGF- $\beta$  - Rポリペプチドスプライス改変体）か、または人工的に構築され得る。このようなTGF- $\beta$  - Rポリペプチド改変体は、配列番号1または配列番号3のいずれかに示されるDNA配列から適宜に変化するDNA配列を有する、対応する核酸分子から調製され得

40

50

る。好ましい実施形態において、この改変体は、1～3、または1～5、または1～10、または1～15、または1～20、または1～25、または1～50、または1～75、または1～100、または100より多くのアミノ酸の置換、挿入、付加、および/または欠失を有し、ここで、この置換は、保存的、または非保存的、あるいはそれらの任意の組み合わせであり得る。

**【0036】**

用語「TGF - - Rポリペプチド誘導体」とは、化学的に改変された、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチド、本明細書中で定義されるようなTGF - - Rポリペプチドフラグメント、TGF - - Rポリペプチドオルソログ、または、TGF - - Rポリペプチド改変体をいう。用語「TGF - - Rポリペプチド誘導体」とはまた、化学的に改変された、本明細書中で定義されるようなTGF - - Rポリペプチド対立遺伝子改変体、またはTGF - - Rポリペプチドスプライス改変体によりコードされるポリペプチドもいう。

10

**【0037】**

用語「成熟TGF - - Rポリペプチド」とは、リーダー配列を有さないTGF - - Rポリペプチドをいう。成熟TGF - - Rポリペプチドはまた、他の修飾（例えば、アミノ末端のタンパク質分解性プロセッシング（リーダー配列を有するかまたは有さない）および/またはカルボキシル末端のタンパク質分解性プロセッシング、より大きな前駆体からのより小さなポリペプチドの切断、N結合型および/またはO結合型グリコシル化など）も含み得る。

20

**【0038】**

用語「TGF - - R融合ポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチド、本明細書中で定義されるTGF - - Rポリペプチドフラグメント、TGF - - Rポリペプチドオルソログ、TGF - - Rポリペプチド改変体、またはTGF - - R誘導体のアミノ末端またはカルボキシル末端での1つ以上のアミノ酸（例えば、異種タンパク質または異種ペプチド）の融合をいう。用語「TGF - - R融合ポリペプチド」とはまた、本明細書中で定義されるTGF - - Rポリペプチド対立遺伝子改変体またはTGF - - Rポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端での1つ以上のアミノ酸の融合もいう。

30

**【0039】**

用語「生物学的に活性なTGF - - Rポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドに特有の少なくとも1つの活性を有するTGF - - Rポリペプチドをいう。さらに、TGF - - Rポリペプチドは、免疫原として活性であり得る；すなわち、このTGF - - Rポリペプチドは、抗体が惹起され得る少なくとも1エピトープを含む。

**【0040】**

用語「単離されたポリペプチド」とは、(1)供給源細胞から単離される場合に、天然と一緒に見出されるポリヌクレオチド、脂質、糖質、または他の物質の少なくとも約50パーセントから分離された、本発明のポリペプチド、(2)「単離されたポリペプチド」が天然で連結するポリペプチドの全てまたは一部に連結（共有結合の相互作用または非共有結合の相互作用によって）されていない、本発明のポリペプチド、(3)天然には連結されていないポリペプチドに作動可能に連結（共有結合的または非共有結合的相互作用によって）する、本発明のポリペプチド、または(4)天然には存在しない本発明のポリペプチド、をいう。好ましくは、単離されたポリペプチドは、その治療的用途、診断用途、予防用途または研究用途を妨害する、その天然の環境において見出されるいずれの他の混入ポリペプチドも他の混入物も、実質的に含まない。

40

**【0041】**

用語「同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定される、2つ以上のポリペプチド分子または2つ以上の核酸分子の配列間の関係をいう。当該分野において、「同一性」はまた、場合に応じて、2つ以上のヌクレオチド配列鎖（string）

50

間または2つ以上のアミノ酸配列鎖間の一致によって決定されるように、核酸分子間またはポリペプチド間の配列関連性の程度も意味する。「同一性」は、2つ以上の配列のうち小さなものと、特定の数理的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）により取り扱われたギャップ整列（存在する場合）との間の同一の一致パーセントを評価する。

【0042】

用語「類似性」は、関連する概念であるが、「同一性」とは対照的であり、「類似性」とは、同一の一致と保存的置換の一致との両方を含む関連性の程度をいう。2つのポリペプチド配列が、例えば10/20の同一のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換である場合、パーセント同一性および類似性は、両方とも50%である。同じ例において、保存的置換が存在するさらに5つの位置が存在する場合、パーセント同一性は50%のままであるが、パーセント類似性は75%（15/20）である。従って、保存的置換が存在する場合、2つのポリペプチド間のパーセント類似性は、これら2つのポリペプチド間のパーセント同一性よりも高い。

10

【0043】

用語「天然に存在する」または「ネイティブの」とは、生物学的物質（例えば、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞など）と関連して使用される場合、天然において見出され、そしてヒトによって操作されていない物質をいう。同様に、「天然に存在しない」または「ネイティブではない」とは、本明細書中で使用される場合、天然で見出されないか、またはヒトによって構造的に改変もしくは合成された物質をいう。

20

【0044】

用語「有効量」および「治療有効量」とは、各々、本明細書中に示されるTGF- $\beta$ -Rポリペプチドの1つ以上の生物学的活性の観察可能なレベルを支持するために使用される、TGF- $\beta$ -RポリペプチドまたはTGF- $\beta$ -R核酸分子の量をいう。

【0045】

用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理学的に受容可能なキャリア」とは、本明細書中で使用される場合、薬学的組成物としてのTGF- $\beta$ -Rポリペプチド、TGF- $\beta$ -R核酸分子、またはTGF- $\beta$ -R選択的結合因子の送達の達成または促進に適した1つ以上の処方物質をいう。

【0046】

用語「抗原」とは、選択的結合因子（例えば、抗体）により結合され得、そしてさらに動物において、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生するために使用され得る分子または分子の一部をいう。抗原は、1つ以上のエピトープを有し得る。

30

【0047】

用語「選択的結合因子」とは、TGF- $\beta$ -Rポリペプチドに対して特異性を有する分子（単数または複数）をいう。本明細書中で使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、選択的結合因子の、ヒトTGF- $\beta$ -Rポリペプチドに結合し、かつヒト非TGF- $\beta$ -Rポリペプチドに結合しない能力をいう。しかし、選択的結合因子はまた、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるようなポリペプチドのオルソログ（すなわち、その種間変形（例えば、マウスTGF- $\beta$ -RポリペプチドおよびラットTGF- $\beta$ -Rポリペプチド））に結合し得ることが、認識される。

40

【0048】

用語「形質導入」は、1つの細菌から別のものへの（通常、ファージによる）遺伝子の移入をいうために使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞の配列の獲得および移入をいう。

【0049】

用語「トランスフェクション」は、細胞による外来DNAまたは外因性DNAの取り込みをいうために使用される。そして、細胞は、その外因性DNAが細胞膜の内側に導入されている場合、「トランスフェクト」されている。多数のトランスフェクション技術が、当該分野で周知であり、そして、本明細書中に開示される。例えば、Grahamら、19

50

73, *Virology* 52:456; Sambrookら、*Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davisら、*Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986); および Chuら、1981, *Gene* 13:197を参照のこと。このような技術は、1つ以上の外因性DNA部分を適切な宿主細胞に導入するために使用され得る。

【0050】

用語「形質転換」は、本明細書中に使用される場合、細胞の遺伝的特徴における変化をいい、そして細胞は、新しいDNAを含むように改変されている場合、形質転換されている。例えば、細胞は、そのネイティブな状態から遺伝的に改変された場合、形質転換される。トランスフェクションまたは形質導入に続いて、その形質転換DNAは、細胞の染色体へ物理的に組み込むことによってその細胞のDNAと組み換わり得るか、複製されないエピソームエレメントとして一過性に維持され得るか、またはプラスミドとして独立して複製し得る。細胞は、そのDNAが細胞分裂により複製される場合、安定に形質転換されているとみなされる。

【0051】

(核酸分子および/またはポリペプチドの関連性)

関連した核酸分子が、配列番号1または配列番号3のいずれかの核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を包含すること、および上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を包含することが理解される。関連した核酸分子はまた、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドと比較して1以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加および/もしくは欠失を含むかまたは本質的にこれからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。例えば、そのような関連するTGF-Rポリペプチドは、一つ以上のN結合グリコシル化部位もしくはO結合グリコシル化部位の付加もしくは欠失または、一つ以上のシステイン残基の付加または欠失を含み得る。

【0052】

関連する核酸分子はまた、配列番号2または配列番号4のいずれかのTGF-Rポリペプチドの少なくとも約25個連続したアミノ酸、または少なくとも約50個連続したアミノ酸、または少なくとも約75個連続したアミノ酸、または少なくとも約100個連続したアミノ酸、または約100個以上連続したアミノ酸のポリペプチドをコードするTGF-R核酸分子のフラグメントを包含する。

【0053】

さらに、関連するTGF-R核酸分子はまた、本明細書中で定義したとおりの中程度または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号1、もしくは配列番号3のいずれかのTGF-R核酸分子またはポリペプチドをコードする分子の十分に相補的な配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子を包含し、このポリペプチドは、配列番号2もしくは配列番号4、または本明細書中に定義されるような核酸フラグメント、または本明細書中に定義されるようなポリペプチドをコードする核酸フラグメントのいずれかに示されるアミノ酸配列を含む。ハイブリダイゼーションプローブは、本明細書中に提供されるTGF-R配列を用いて、cDNAライブラリー、ゲノムDNAライブラリーまたは合成DNAライブラリーを関連する配列についてスクリーニングするために調製され得る。既知配列に対して有意な同一性を示す、TGF-RポリペプチドのDNA配列および/またはアミノ酸配列の領域は、本明細書中に記載されるような配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこれらの領域を、スクリーニングのためのプローブの設計に使用し得る。

【0054】

用語「高度にストリンジェントな条件」とは、配列が非常に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを許容し、かつ有意に不一致のDNAのハイブリダイゼーションを排除するように設定された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、温度、イオン強度、および変性剤(例えば、ホルムアミド)の濃度によって主に決定され

10

20

30

40

50

る。ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての「高度にストリンジェントな条件」の例は、65 ~ 68 での0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウムまたは42 での0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウム、および50%ホルムアミドである。Sambrook, FritschおよびManiatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory 1989); Andersonら, Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach 第4章 (IRL Press Limited)を参照のこと。

【0055】

よりストリンジェントな条件(例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド、または他の変性剤)もまた用いられ得るが、ハイブリダイゼーションの割合は影響される。他の薬剤は、非特異的および/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少する目的のために、ハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液中に含まれ得る。例は、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(NaDodSO<sub>4</sub>またはSDS)、ficoll、デンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA(または別の非相補的DNA)および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた用いられ得る。これらの添加剤の濃度および種類は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は通常、pH 6.8 ~ 7.4で実施される;しかし、代表的なイオン強度の条件では、ハイブリダイゼーションの割合は、pHからほぼ独立する。Andersonら, Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach 第4章 (IRL Press Limited)を参照のこと。

【0056】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基組成、長さおよび塩基対の不一致度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変動要因を適応させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にするために当業者によって調整され得る。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の方程式によって評価され得る:

$$T_m (\text{°C}) = 81.5 + 16.6 (\log [\text{Na}^+]) + 0.41 (\%G + C) - 600 / N - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、[Na<sup>+</sup>]は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中でのナトリウムイオンのモル濃度であり、%G + Cは、ハイブリッド中での(グアニン+シトシン)塩基の百分率である。不完全に一致したハイブリッドについては、融解温度は、1%の不一致毎に約1 下げられる。

【0057】

用語「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が形成され得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、50 ~ 65 での0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウムまたは37 ~ 50 での0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウムおよび20%ホルムアミドである。例示として、0.015 Mナトリウムイオン中での50 という「中程度にストリンジェントな条件」は、約21%の不一致を許容する。

【0058】

「高度にストリンジェントな条件」と「中程度にストリンジェントな条件」との間に絶対的な区別が存在しないことが当業者によって認識される。例えば、0.015 Mナトリウムイオン(ホルムアミドなし)では、完全に一致した長さのDNAの融解温度は、約71 である。65 で(同じイオン強度で)の洗浄を用いると、これは、約6%の不一致を可能にする。より遠く関連した配列を捕獲するために、当業者は、単純に、温度を低くし

10

20

30

40

50

得るかまたはイオン強度を高くし得る。

【0059】

約20ntまでのオリゴヌクレオチドプローブについての1M NaCl<sup>\*</sup>中での融解温度の良好な推定は、以下によって与えられる：

$$T_m = A - T \text{塩基対あたり} 2 + G - C \text{塩基対あたり} 4$$

<sup>\*</sup> 6×クエン酸ナトリウム塩(SSC)中でのナトリウムイオン濃度は、1Mである。Suggsら, Developmental Biology Using Purified Genes 683頁(BrownおよびFox編, 1981)を参照のこと。

【0060】

オリゴヌクレオチドについての高度ストリンジェンシー洗浄条件は通常、6×SSC、0.1% SDS中でのそのオリゴヌクレオチドのT<sub>m</sub>よりも0～5低い温度においてである。

【0061】

別の実施形態では、関連する核酸分子は、配列番号1もしくは配列番号3のいずれかに示されるようなヌクレオチド配列に対して少なくとも約70パーセント同一であるヌクレオチド配列を含むかもしくはこれからなる。好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号1もしくは配列番号3のいずれかに示されるようなヌクレオチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一である。関連する核酸配列は、配列番号2、もしくは配列番号4のいずれかに示されるようなポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するポリペプチドをコードする。

【0062】

核酸配列における相違は、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列の保存的および/または非保存的変化をもたらし得る。

【0063】

配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列に対する保存的変化(およびコードするヌクレオチドに対する、対応する変化)は、TGF-Rポリペプチドの機能的特徴および化学的特徴と類似の機能的特徴および化学的特徴を有するポリペプチドを生じる。対照的に、TGF-Rポリペプチドの機能的特徴および/または化学的特徴における実質的な変化は、以下を維持することへの影響が有意に異なる、配列番号2もしくは配列番号4または配列番号8のいずれかのアミノ酸配列における置換を選択することによって達成され得る：(a)例えば、シートコンホメーションもしくはヘリックコンホメーションのような、置換領域における分子骨格の構造、(b)標的部点での分子の電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖のかさ。

【0064】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置でのアミノ酸残基の極性にも電荷にもほとんど影響がないかまたは全く影響がないような、非ネイティブ残基によるネイティブなアミノ酸残基の置換を含み得る。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基はまた、「アラニンスキャニング変異誘発」について以前に記載されていたように、アラニンによって置換され得る。

【0065】

保存的アミノ酸置換はまた、生物学的系における合成によるよりむしろ、化学的なペプチド合成によって代表的に組み込まれる、天然には存在しないアミノ酸残基を含む。これらとしては、ペプチド模倣物、およびアミノ酸部分の他の逆転形態または反転形態が挙げられる。

【0066】

天然に存在する残基は、共通の側鎖の特性に基づいてクラスに分けられ得る：

- 1) 疎水性：Nルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- 2) 中性の親水性：Cys、Ser、Thr；
- 3) 酸性：Asp、Glu；

- 4) 塩基性：A s n、G l n、H i s、L y s、A r g；  
 5) 鎖の方向に影響を与える残基：G l y、P r o；および  
 6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【0067】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーの、別のクラスのメンバーへの交換を含み得る。このような置換された残基は、非ヒトTGF- $\beta$ -Rポリペプチドと相同であるヒトTGF- $\beta$ -Rポリペプチドの領域、またはこの分子の非相同性領域に導入され得る。

【0068】

このような変更を作製する場合、アミノ酸の疎水性親水性指標 ( h y d r o p a t h i c i n d e x ) が、考慮され得る。各アミノ酸は、その疎水性特徴および荷電特徴に基づいて疎水性親水性指標が割り当てられる。この疎水性親水性指標は、イソロイシン (+ 4 . 5 ) ; パリン (+ 4 . 2 ) ; ロイシン (+ 3 . 8 ) ; フェニルアラニン (+ 2 . 8 ) ; システイン/シスチン (+ 2 . 5 ) ; メチオニン (+ 1 . 9 ) ; アラニン (+ 1 . 8 ) ; グリシン (- 0 . 4 ) ; スレオニン (- 0 . 7 ) ; セリン (- 0 . 8 ) ; トリプトファン (- 0 . 9 ) ; チロシン (- 1 . 3 ) ; プロリン (- 1 . 6 ) ; ヒスチジン (- 3 . 2 ) ; グルタミン酸 (- 3 . 5 ) ; グルタミン (- 3 . 5 ) ; アスパラギン酸 (- 3 . 5 ) ; アスパラギン (- 3 . 5 ) ; リジン (- 3 . 9 ) およびアルギニン (- 4 . 5 ) である。

【0069】

タンパク質に相互作用的な生物学的機能を与える上での疎水性親水性アミノ酸指標の重要性は、一般的に当該分野で理解されている ( K y t e ら、1982、J . M o l . B i o l . 157 : 105 - 31 ) 。特定のアミノ酸が、類似した疎水性親水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸に置換され得、そしてなお、類似した生物学的活性を保持することは公知である。疎水性親水性指標に基づいて変更する際、疎水性親水性指標が $\pm 2$ 内であるアミノ酸の置換が好ましく、疎水性親水性指標が $\pm 1$ 内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そして疎水性親水性指標が $\pm 0.5$ 内であるアミノ酸置換がなおより特に好ましい。

【0070】

同様のアミノ酸の置換が親水性に基づいて効果的になされ得、特に、それによって作製される生物学的に機能的に等価なタンパク質またはペプチドが本発明における場合と同様に免疫学的な実施形態における使用を意図されていることもまた、当該分野で理解される。タンパク質の最も大きな局所平均親水性は、隣接アミノ酸の親水性によって支配される場合、その免疫原性および抗原性 ( すなわち、そのタンパク質の生物学的特性 ) と関連する。

【0071】

以下の親水性値は、これらのアミノ酸残基に対して割り当てられる：アルギニン (+ 3 . 0 ) ; リジン (+ 3 . 0 ) ; アスパラギン酸 (+ 3 . 0  $\pm$  1 ) ; グルタミン酸 (+ 3 . 0  $\pm$  1 ) ; セリン (+ 0 . 3 ) ; アスパラギン (+ 0 . 2 ) ; グルタミン (+ 0 . 2 ) ; グリシン ( 0 ) ; スレオニン (- 0 . 4 ) ; プロリン (- 0 . 5  $\pm$  1 ) ; アラニン (- 0 . 5 ) ; ヒスチジン (- 0 . 5 ) ; システイン (- 1 . 0 ) ; メチオニン (- 1 . 3 ) ; パリン (- 1 . 5 ) ; ロイシン (- 1 . 8 ) ; イソロイシン (- 1 . 8 ) ; チロシン (- 2 . 3 ) ; フェニルアラニン (- 2 . 5 ) ; およびトリプトファン (- 3 . 4 ) 。類似した親水性値に基づいて変更する際、親水性値が $\pm 2$ 内であるアミノ酸の置換が好ましく、親水性値が $\pm 1$ 内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そして親水性値が $\pm 0.5$ 内であるアミノ酸置換がなおより特に好ましい。当業者はまた、親水性に基づいて、一次アミノ酸配列からエピトープを同定し得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」ともいわれる。

【0072】

所望のアミノ酸置換 ( 保存的または非保存的に関わらず ) は、そのような置換が所望される場合に当業者によって決定され得る。例えば、アミノ酸置換は、TGF- $\beta$ -Rポリペ

プチドの重要な残基を決定するために使用され得るか、または本明細書中に記載される TGF - - R ポリペプチドの親和性を増加もしくは減少させるために使用され得る。例示的なアミノ酸置換を、表 I に示す。

【 0 0 7 3 】

【 表 1 】

表 I		
アミノ酸置換		
元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ 酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

当業者は、周知技術を用いて配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの適切な改変体を決定し得る。生物学的活性を損なわずに変化され得る分子の適切な領域を同定するため、当業者は、活性に重要であるとは考えられない領域を標的とし得る。例えば、同種由来または他種由来の、類似の活性を有する類似のポリペプチドが公知の場合、当業者は、TGF - - R ポリペプチドのアミノ酸配列をそのような類似のポリペ

10

20

30

40

50

プチドと比較し得る。そのような比較を用いて、当業者は、類似のポリペプチド間で保存されるその分子の残基および部分を同定し得る。そのような類似のポリペプチドに対して保存されていないTGF - R分子の領域における変化が、TGF - Rポリペプチドの生物学的活性および/または構造に逆の影響をおそらくはほとんど与えないことが、理解される。当業者はまた、たとえ比較的保存された領域であっても、活性を維持した状態で天然に存在する残基を化学的に類似したアミノ酸で代用し得る（保存的アミノ酸残基置換）ことを理解する。従って、生物学的活性または構造に対して重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を損なうことなく、またはポリペプチド構造に逆の影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換を受け得る。

**【0074】**

10

さらに、活性または構造に重要である類似のポリペプチドにおける残基を同定する、構造-機能研究を当業者は、再検討し得る。そのような比較を考慮して、当業者は、類似のポリペプチドにおいて活性もしくは構造に重要であるアミノ酸残基に対応する、TGF - Rポリペプチドにおけるアミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、TGF - Rポリペプチドのそのような予測された重要なアミノ酸残基に関して、化学的に類似したアミノ酸置換を選択し得る。

**【0075】**

当業者はまた、類似したポリペプチドにおける三次元構造に関連して、三次元構造およびアミノ酸配列を分析し得る。そのような情報を考慮して、当業者は、三次元構造についてTGF - Rポリペプチドのアミノ酸残基のアラインメントを推測し得る。当業者は、タンパク質の表面上であると推測されるアミノ酸残基に対して根本的な変化を作製しないように選択し得る。なぜなら、そのような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。さらに、当業者は、各々のアミノ酸残基において単一アミノ酸置換を含む試験改変体を作製し得る。その改変体は、当業者に公知の活性アッセイを用いてスクリーニングされ得る。そのような改変体を使用して、適切な改変体に関する情報を収集し得る。例えば、当業者は、特定のアミノ酸残基に対する変更が、崩壊された活性、図らずも減少された活性、または不適切な活性を生じることを見出した場合、そのような変更を有する改変体は、回避される。言い換えると、そのような慣用的な実験から集められた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が単独または他の変異と組み合わせるとかのいずれかで回避されるべきであるアミノ酸を、容易に決定し得る。

20

30

**【0076】**

多数の科学刊行物が、二次構造の予測に向けられている。Moult、1996、Curr. Opin. Biotechnol. 7: 422 - 427; Chouら、1974、Biochemistry 13: 222 - 245; Chouら、1974、Biochemistry 113: 211 - 222; Chouら、1978、Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47: 45 - 48; Chouら、1978、Ann. Rev. Biochem. 47: 251 - 276; およびChouら、1979、Biophys. J. 26: 367 - 384を参照のこと。さらに、コンピュータプログラムが二次構造の予測を補助するために現在利用可能である。二次構造を予測する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%よりも大きい配列同一性、または40%よりも大きい配列類似性を有する2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似した構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース(PDB)の近年の成長により、二次構造の予測可能性(ポリペプチド構造またはタンパク質構造内の潜在的な折り畳み数を含む)の促進がもたらされた。Holmら、1999、Nucleic Acids Res. 27: 244 - 247を参照のこと。所定のポリペプチドまたはタンパク質における限定された数の折り畳みが存在すること、および一度構造の臨界の数が決定されると、構造予測が劇的により正確になること、が示唆されている(Brennerら、1997、Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 369 - 376)。

40

**【0077】**

50

二次構造を予測するさらなる方法としては、「スレッディング (threading)」（Jones、1997、Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 377-387; Sipplら、1996、Structure 4: 15-19）、「プロフィール分析」（Bowyerら、1991、Science 253: 164-170; Gribskovら、1990、Methods Enzymol. 183: 146-159; Gribskovら、1987、Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 84: 4355-4358）、および「進化的連鎖 (evolutionary linkage)」（Holmら、前出、および Brennerら、前出を参照のこと）が、挙げられる。

【0078】

好ましい TGF - - R ポリペプチド改変体としては、グリコシル化部位の数および/または型が配列番号 2、または配列番号 4 のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して変更されている、グリコシル化改変体が挙げられる。1つの実施形態において、TGF - - R ポリペプチド改変体は、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載のアミノ酸配列より多いかまたはより少ない数の N 連結グリコシル化部位を含む。N 連結グリコシル化部位は、配列 Asn - X - Ser または Asn - X - Thr によって特徴付けられ、ここで、X と印されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N 連結性炭水化物鎖の付加のための潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を排除する置換は、存在する N 連結性炭水化物鎖を除去する。1つ以上の N 連結性グリコシル化部位（代表的に、天然に存在するグリコシル化部位）が排除され、そして1つ以上の新たな N 連結部位が作製される、N 連結炭水化物鎖の再配置もまた、提供される。さらなる好ましい TGF - - R 改変体としてはシステイン改変体が挙げられ、ここで、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較された場合、1つ以上のシステイン残基が欠失されるか、または別のアミノ酸（例えば、セリン）で置換される。システイン改変体は、TGF - - R ポリペプチドが、例えば不溶性の封入体の単離後に、生物学的に活性なコンフォメーションにリフォールディングされなければならない場合に、有用である。システイン改変体は、一般に、ネイティブタンパク質より少ないシステイン残基を有し、そして代表的には、非対合のシステインより生じる相互作用を最小にするよう同数のシステイン残基を有する。

【0079】

別の実施形態において、TGF - - R ポリペプチド改変体は、少なくとも1つのアミノ酸の挿入を有する配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載されるアミノ酸配列を含むか（そしてそのポリペプチドは配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載されるポリペプチドの活性を有する）、または、少なくとも1つのアミノ酸の欠失を有する配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載されるアミノ酸配列を含む（そしてそのポリペプチドは配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載されるポリペプチドの活性を有する）。TGF - - R ポリペプチド改変体はまた、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載されるアミノ酸配列を含み、ここでそのポリペプチド配列は切り詰められたカルボキシル末端および/またはアミノ末端を有し、且つさらにここでそのポリペプチドは配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載されるポリペプチドの活性を有する。TGF - - R ポリペプチド改変体はさらに、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、切り詰められたカルボキシル末端、および切り詰められたアミノ末端からなる群より選択される、少なくとも1つ以上の改変を有する配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載されるアミノ酸配列を含み、ならびにここでそのポリペプチドは配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載されるポリペプチドの活性を有する。

【0080】

さらなる実施形態において、TGF - - R ポリペプチド改変体は、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも約 70% 同一であるアミノ酸配列を含む。好ましい実施形態において、TGF - - R ポリペプチド改変体は、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも約

10

20

30

40

50

75%、または約80%、または約85%、または約90%、あるいは約95、96、97、98または99%、同一なパーセントであるアミノ酸配列を含む。TGF - - Rポリペプチド改変体は、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を保持する。

【0081】

さらに、配列番号2または配列番号4、あるいは他のTGF - - Rポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、同種ポリペプチドに融合されてホモダイマーを形成し得るか、あるいは異種ポリペプチドに融合されてヘテロダイマーを形成し得る。異種のペプチドおよびポリペプチドとしては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：TGF - - R融合ポリペプチドの検出および/または単離を可能にするエピトープ；膜貫通レセプタータンパク質またはその一部（例えば、細胞外ドメインまたは、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン）；膜貫通レセプタータンパク質に結合する、リガンドまたはその一部；触媒的に活性である、酵素またはその一部；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；安定性を増加させるポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）；ならびに配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のTGF - - Rポリペプチドとは異なる治療活性を有するポリペプチド。

10

【0082】

融合は、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のTGF - - Rポリペプチドの、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、なされ得る。融合は、リンカーもアダプター分子も用いずに直接であっても、リンカーもしくはアダプター分子を介してであってもよい。リンカーまたはアダプター分子は、1つ以上のアミノ酸残基であり得、代表的に、約20～約50アミノ酸残基である。リンカーまたはアダプター分子はまた、融合した部分の分離を可能にするよう、DNA制限エンドヌクレアーゼまたはプロテアーゼに対する切断部位を有して設計され得る。融合ポリペプチドは、一度構築されると、本明細書中に記載の方法に従って誘導体化され得ることが、理解される。

20

【0083】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のTGF - - Rポリペプチドは、ヒトIgGのFc領域の1つ以上のドメインと融合される。抗体は、2つの機能的に独立した部分、抗原を結合する「Fab」として公知の変域ドメイン、ならびに補体活性化および食作用細胞による攻撃といったエフェクター機能に關与する「Fc」として公知の定常ドメイン、を含む。Fcは長い血清半減期を有し、一方でFabは短寿命である（Caponら、1989、Nature 337：525-531）。治療タンパク質と一緒に構築される場合には、Fcドメインは、より長い半減期を提供し得るか、またはFcレセプター結合機能、プロテインA結合機能、補体固着機能、および恐らくは胎盤移入機能すら、組み込み得る（同書）。表IIは、当該分野において公知の特定のFc融合物の使用を要約する。

30

【0084】

【表2】

40

表 II  
治療用タンパク質とのFc融合

Fcの型	融合パートナー	治療的関連	参考文献
IgG1	CD30-LのN-末端	ホジキン病； 未分化リンパ腫； T細胞白血病	米国特許第 5,480,981号
マウス Fcγ2a	IL-10	抗炎症； 移植拒絶	Zhengら, 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNFレセプター	敗血症性ショック	Fisherら, 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697-1702; Van Zeeら, 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, またはIgE (第一ドメインを 除外したもの)	TNFレセプター	炎症、 自己免疫障害	米国特許第 5,808,029号
IgG1	CD4レセプター	AIDS	Caponら, 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	IL-2のN-末端	抗癌、抗ウイルス	Harvillら, 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	OPGのC-末端	変形性関節症； 骨密度	WO 97/23614
IgG1	レプチンのN-末端	抗肥満	PCT/US 97/23183, 1997年12月11日出願
ヒト Ig Cγ1	CTLA-4	自己免疫障害	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69

一例において、ヒトIgGヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域は、当業者に公知の方法を使用して、TGF-β-Rポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、融合され得る。別の例において、ヒトIgGヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域は、TGF-β-Rポリペプチドフラグメント（例えば、TGF-β-Rポリペプチドの推定細胞外部分）のアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、融合され得る。

【0085】

得られたTGF-β-R融合ポリペプチドは、プロテインAアフィニティーカラムの使用により精製され得る。Fc領域と融合されたペプチドおよびタンパク質は、非融合の対応物よりも実質的に長い半減期をインビボにおいて示すことが見出された。また、Fc領域への融合は、融合ポリペプチドの二量化/多量体化を可能にする。Fc領域は、天然に存在するFc領域であり得るか、または治療的品質、循環時間、もしくは減少した凝集性のような特定の品質を改善するよう変更され得る。

【0086】

関連する核酸分子およびポリペプチドの同一性および類似性は、公知の方法により容易に計算され得る。そのような方法としては、Computational Molecular Biology (A.M. Lesk編、Oxford University Press 1988)；Biocomputing: Informatics and Genome Projects (D.W. Smith編、Academic Press 1993)；Computer Analysis of Sequence Data (Part 1, A.M. GriffinおよびH.G. Griffin編、Humana Press 1994)；G.von Heinle、Sequence Analysis in Molecular Biology (Academic Pre

10

20

30

40

50

ss 1987); Sequence Analysis Primer (M. Gribskov および J. Devereux 編、M. Stockton Press 1991); ならびに Carillo ら、1988、SIAM J. Applied Math., 48:1073 に記載される方法が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0087】

同一性および/または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間での最大の適合を付与するよう設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公共に利用可能なコンピュータプログラムにおいて記載されている。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための、好ましいコンピュータプログラム方法としては、GCG プログラムパッケージ (GAP (Devereux ら、1984、Nucleic Acids Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)、BLASTP、BLASTN、および FASTA (Altschul ら、1990、J. Mol. Biol. 215:403-410) を含む) が挙げられるが、これらに限定されない。BLASTX プログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他の供給源 (Altschul ら、BLAST Manual (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschul ら、1990、前出) から公共に利用可能である。周知の Smith Waterman アルゴリズムもまた、同一性を決定するために使用され得る。

#### 【0088】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定のライメントスキームは、その2配列の短い領域のみの適合を生じ得、そしてこの小さな整列領域は、2つの全長配列間に有意な関連がない場合でさえも、非常に高い配列同一性を有し得る。従って、好ましい実施形態において、選択された整列方法 (GAP プログラム) は、要求のポリペプチドの少なくとも50個連続するアミノ酸にわたる整列を生じる。

#### 【0089】

例えば、コンピュータアルゴリズム GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) を使用して、配列同一性の百分率が決定されるべき2つのポリペプチドが、それらのそれぞれのアミノ酸の最適な適合 (アルゴリズムによって決定される「適合スパン」) のために、整列される。ギャップオープニングペナルティ (gap opening penalty) (これは、平均対角の3倍として計算される; 「平均対角」とは、使用される比較行列 (comparison matrix) の対角の平均である; 「対角」とは、特定の比較行列によって各々完全なアミノ酸適合に対して割り当てられたスコアまたは数である) およびギャップエクステンションペナルティ (gap extension penalty) (これは通常、ギャップオープニングペナルティの0.1倍である)、ならびに PAM 250 または BLOSUM 62 のような比較行列が、このアルゴリズムと組み合わせて使用される。標準的な比較行列もまた、そのアルゴリズムによって使用される (Dayhoff ら、5 Atlas of Protein Sequence and Structure (補遺3 1978) (PAM 250 比較行列); Henikoff ら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919 (BLOSUM 62 比較行列) を参照のこと)。

#### 【0090】

ポリペプチド配列の比較のため好ましいパラメーターとしては、以下が挙げられる:

アルゴリズム: Needleman および Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-53;

比較マトリックス: BLOSUM 62 (Henikoff ら, 前出);

ギャップペナルティ: 12

ギャップ長ペナルティ: 4

類似性の閾値: 0

10

20

30

40

50

GAPプログラムは、上記のパラメーターを用いて有用である。上述のパラメーターは、GAPアルゴリズムを使用して、ポリペプチドを（末端ギャップに関するペナルティーがなしで）比較するためのデフォルトパラメーターである。

【0091】

核酸分子配列の比較のための好ましいパラメーターとしては、以下が挙げられる：

アルゴリズム：NeedlemanおよびWunsch，前出；

比較マトリックス：一致 = +10、不一致 = 0

ギャップペナルティー：50

ギャップ長ペナルティー：3

GAPプログラムはまた、上記のパラメーターを用いて有用である。上述のパラメーターは、核酸分子を比較するためのデフォルトパラメーターである。 10

【0092】

他の例示的なアルゴリズム、ギャップオープニングペナルティー、ギャップエクステンションペナルティー、比較マトリックス、類似性の閾値が使用され得、これらは、Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997に示されるものを含む。なされるべき特定の選択は、当業者に明らかであり、なされるべき特定の比較（例えば、DNA対DNA、タンパク質対タンパク質、タンパク質対DNA）に依存し；さらに、その比較が、所定の配列対の間である（この場合、GAPまたはBestFitが一般的に好ましい）かまたは、一つの配列と大きな配列データベースとの間（この場合、FASTAまたはBLASTAが好ましい） 20

【0093】

（核酸分子）

TGF - Rポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子は、種々の方法（化学合成、cDNAライブラリースクリーニングまたはゲノムライブラリースクリーニング、発現ライブラリースクリーニング、および/またはcDNAのPCR増幅を含むが、これらに限定されない）で容易に得られ得る。

【0094】

本明細書中で使用される組換えDNA方法は、一般的に、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、および/またはCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編, Green Publishers Inc. および Wiley and Sons 1994)に示される方法である。本発明は、本明細書中に記載される核酸分子、およびこのような分子を得るための方法を提供する。 30

【0095】

TGF - Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、一つの種から同定された場合、その遺伝子の全てまたは一部が、同じ種からオルソログ遺伝子または関連遺伝子を同定するためのプローブとして使用され得る。そのプローブまたはプライマーは、TGF - Rポリペプチドを発現すると考えられる種々の組織供給源由来のcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。さらに、配列番号1または配列番号3のいずれかに示される配列を有する核酸分子の一部または全てを使用して、ゲノムライブラリーをスクリーニングし、TGF - Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的には、中程度のストリンジェンシーの条件または高いストリンジェンシーの条件が、スクリーニングのために使用され、そのスクリーニングから得られる偽陽性の数を最小にする。 40

【0096】

TGF - Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子はまた、発現されたタンパク質の性質に基づく陽性クローンの検出を使用する、発現クローニングによって同定され得る。代表的には、核酸ライブラリーは、宿主細胞表面において発現されそして提示 50

されるクローン化タンパク質への、抗体または他の結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）の結合によってスクリーニングされる。抗体または結合パートナーは、検出可能な標識を用いて修飾されて、所望のクローンを発現する細胞を同定する。

【0097】

以下に記載される説明に従って行われる組換え発現技術に従って、これらのポリヌクレオチドを作製し得、そしてコードされるポリペプチドを発現させ得る。例えば、TGF-  
-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、大量の所望のヌクレオチド配列を容易に作製し得る。次いで、この配列を使用して検出プローブまたは増幅プライマーを作製し得る。あるいは、TGF-  
-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを、発現ベクターに挿入し得る。発現ベクターを適切な宿主に導入することによって、コードされるTGF-  
-Rポリペプチドが、大量に産生され得る。

10

【0098】

適切な核酸配列を得るための別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。この方法において、cDNAが、酵素逆転写酵素を使用して、ポリ（A）+RNAまたは全RNAから調製される。次いで、2つのプライマー（代表的には、TGF-  
-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードするcDNAの2つの別個の領域に対して相補的である）が、TaqポリメラーゼのようなポリメラーゼとともにこのcDNAに付加され、そしてこのポリメラーゼが、これら2つのプライマー間のcDNAの領域を増幅する。

【0099】

TGF-  
-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、Engelsら、1989、Angew.Chem.Intl.Ed.28:716-34によって記載されるような、当業者に周知の方法を使用する、化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのホスホトリエステル法、ホスホロアミダイト法、およびH-ホスホネート法が挙げられる。このような化学合成のために好ましい方法は、標準的なホスホロアミダイト化学を使用する、ポリマーにより支持される合成である。代表的に、TGF-  
-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百ヌクレオチド長である。約100ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用して、いくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、これらのフラグメントが一緒に連結されて、TGF-  
-R遺伝子の全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、このポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントは、ATGを有し、これは、メチオニン残基をコードする。このメチオニンは、宿主細胞において産生されたポリペプチドがその細胞から分泌されるよう設計されるか否かに依存して、TGF-  
-Rポリペプチドの成熟形態で存在してもそうでなくてもよい。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

20

30

【0100】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞におけるTGF-  
-Rポリペプチドの最適な発現のために変更されたコドンを含む。特定のコドン変更は、発現のために選択される、TGF-  
-Rポリペプチドおよび宿主細胞に依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって（例えば、所定の宿主細胞において高度に発現される遺伝子における使用に好ましいコドンを選択することによって）実施され得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドン優先度に関する「Eco\_\_high.cod」のようなコドン頻度表を組み込むコンピューターアルゴリズムが使用され得、そしてUniversity of Wisconsin Package Version 9.0（Genetics Computer Group, Madison, WI）によって提供される。他の有用なコドン頻度表としては、「Celegans\_\_high.cod」、「Celegans\_\_low.cod」、「Drosophila\_\_high.cod」、「Human\_\_high.cod」、「Maize\_\_high.cod」、および「Yeast\_\_high.cod」が挙げられる。

40

【0101】

50

いくつかの場合において、TGF-β-Rポリペプチド改変体をコードする核酸分子を調製することが望ましくあり得る。改変体をコードする核酸分子は、プライマーが所望の点変異を有する場合、部位特異的変異誘発、PCR増幅、または他の適切な方法を使用して生成され得る（変異誘発技術の記載に関しては、Sambrookら（前出）、およびAusubelら（前出）を参照）。Engelsら（前出）によって記載される方法を使用する化学合成もまた、このような改変体を調製するために使用され得る。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

#### 【0102】

（ベクターおよび宿主細胞）

TGF-β-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を、標準的な連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入する。そのベクターは、代表的に、使用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される（すなわち、そのベクターは、遺伝子の増幅および/または遺伝子の発現が生じ得るように、宿主細胞機構と適合性である）。TGF-β-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫（バキュロウイルス系）宿主細胞、および/または真核生物宿主細胞において増幅/発現され得る。宿主細胞の選択は、TGF-β-Rポリペプチドが翻訳後修飾（例えば、グリコシル化および/またはリン酸化）されるか否かに一部依存する。そうである場合、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、または哺乳動物宿主細胞が、好ましい。発現ベクターの総説について、Meth. Enz., 185巻（D. V. Goeddel編, Academic Press 1990）を参照のこと。

#### 【0103】

代表的に、上記宿主細胞のいずれかにて使用される発現ベクターは、プラスミド維持のための配列、ならびに外来性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。このような配列（集合的に、「隣接配列」と呼ばれる）としては、特定の実施形態において、代表的に、以下のヌクレオチド配列のうちの一つ以上が挙げられる：プロモーター、一つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプタープライス部位を含む完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるべきポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択マーカーエレメント。これらの配列のそれぞれが、以下に議論される。

#### 【0104】

必要に応じて、そのベクターは、「タグ」コード配列（すなわち、TGF-β-Rポリペプチドコード配列の5'末端または3'末端に配置されるオリゴヌクレオチド分子）を含み得；そのオリゴヌクレオチド配列は、polyHis（例えば、hexaHis）、または別の「タグ」（例えば、FLAG、HA（赤血球凝集素インフルエンザウイルス）、またはmyc（これらに関して市販の抗体が存在する））をコードする。このタグは、代表的には、ポリペプチドの発現の際にそのポリペプチドに融合され、宿主細胞からの、TGF-β-Rポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立ち得る。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリックスとしてタグに対する抗体を使用するカラムクロマトグラフィーによって、達成され得る。必要に応じて、タグは、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような種々の手段によって、精製されたTGF-β-Rポリペプチドからその後除去され得る。

#### 【0105】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および/または系統由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種または宿主細胞系統以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、一つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または合成であり得るか、あるいはその隣接配列は、TGF-β-Rポリペプチド発現を調節するために正常に機能するネイティブな配列であり得る。このように、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、あるいは任意の植物であり得、但し、この隣接配列は、宿主細胞の機構において機能的であり、そし

て宿主細胞の機構によって活性化され得る。

【0106】

本発明のベクターに有用な隣接配列は、当該分野において周知であるいくつかの方法のいずれかによって得られ得る。代表的には、TGF - R 遺伝子隣接配列以外の、本明細書中で有用な隣接配列は、マッピングおよび/または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全長ヌクレオチド配列は公知であり得る。ここで、隣接配列は、核酸合成または核酸クローニングのために本明細書中で記載される方法を使用して、合成され得る。

【0107】

隣接配列の全てまたは一部のみが公知である場合、PCRを使用して、そして/あるいは適切なオリゴヌクレオチドならびに/または同じ種もしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、その隣接配列は得られ得る。隣接配列が公知でない場合、隣接配列を含むDNAのフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子さえをも含み得る大きなDNA断片から単離され得る。単離は、適切なDNAフラグメントを生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化、続いて、アガロースゲル精製を使用する単離、Qiagen (登録商標) カラムクロマトグラフィ (Chatsworth, CA)、または当業者に公知の他の方法によって、達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

。

【0108】

複製起点は、代表的に、商業的に購入した原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は、宿主細胞においてベクターの増幅に役立つ。特定のコピー数へのベクターの増幅は、いくつかの場合において、TGF - R ポリペプチドの最適な発現に重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、複製起点部位は、公知の配列に基づいて化学的に合成され得、そしてベクターに連結され得る。例えば、プラスミドpBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) 由来の複製起点は、大部分のグラム陰性菌に適切であり、そして種々の起点 (例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、またはHPVもしくはBPVのようなパピローマウイルスの起点) は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクター

。

【0109】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の末端の3'側に位置し、そして転写を終結させるのに役立つ。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G-Cリッチフラグメント、続いてポリ-T配列である。この配列はライブラリーから容易にクローン化されるか、またはベクターの一部として商業的に購入さえされるが、これはまた、本明細書中に記載されるような核酸合成のための方法を使用して、容易に合成され得る。

【0110】

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培養培地において増殖される宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。代表的な選択マーカー遺伝子は、(a) 原核生物宿主細胞に対して、抗生物質または他の毒素 (例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシン) に対する耐性を与えるか; (b) 細胞の栄養要求性の欠損を補うか; あるいは(c) 複合培地から入手可能でない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択のために使用され得る。

【0111】

他の選択遺伝子が、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に重

10

20

30

40

50

要なタンパク質の産生のためにより大きく要求される遺伝子が、組換え細胞の連続世代の染色体においてタンデムに反復されるプロセスである。哺乳動物細胞に関する適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞形質転換体は、形質転換体のみが、ベクターに存在する選択遺伝子によって生存するように唯一適合される、選択圧下に置かれる。選択圧は、培地中の選択因子の濃度が連続的に変化し、それによって選択遺伝子と TGF-β-R ポリペプチドをコードする DNA との両方の増幅を導く条件下で、形質転換された細胞を培養することによって課される。結果として、増加した量の TGF-β-R ポリペプチドが、増幅された DNA から合成される。

#### 【0112】

リボソーム結合部位は、通常、mRNA の翻訳開始に必要であり、そしてシャイン・ダルガーノ配列 (原核生物) またはコザック配列 (真核生物) によって特徴付けられる。このエレメントは、代表的に、発現される TGF-β-R ポリペプチドのプロモーターの 3' 側かつコード配列の 5' 側に配置される。シャイン・ダルガーノ配列は、可変であるが、代表的には、ポリプリンである (すなわち、高い A-G 含量を有する)。多くのシャイン・ダルガーノ配列が、同定されており、そのそれぞれが、本明細書中に記載の方法を使用して容易に合成され得、原核生物ベクターにおいて使用され得る。

#### 【0113】

リーダー配列、またはシグナル配列は、宿主細胞から外へ TGF-β-R ポリペプチドを指向させるために使用され得る。代表的には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、TGF-β-R 核酸分子のコード領域に位置するか、または TGF-β-R ポリペプチドコード領域の 5' 末端に直接位置する。多くのシグナル配列が同定されており、選択された宿主細胞において機能性である任意のシグナル配列が、TGF-β-R 核酸分子と組み合わせて使用され得る。従って、シグナル配列は、TGF-β-R 核酸分子に対して同種 (天然に存在) または異種であり得る。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載される方法を使用して化学的に合成され得る。ほとんどの場合において、シグナルペプチドの存在による宿主細胞からの TGF-β-R ポリペプチドの分泌は、分泌された TGF-β-R ポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を生じる。シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはシグナル配列は、ベクターに挿入された TGF-β-R 核酸分子の一部であり得る。

#### 【0114】

TGF-β-R ポリペプチドコード領域に結合されたネイティブな TGF-β-R ポリペプチドシグナル配列をコードするヌクレオチド配列、または TGF-β-R ポリペプチドコード領域に結合された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれかの使用が、本発明の範囲内に含まれる。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセッシングされる (すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される) ものであるべきである。ネイティブな TGF-β-R ポリペプチドシグナル配列を認識せず、プロセッシングしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼリーダー、ペニシリナーゼリーダー、または熱安定エンテロトキシン II リーダーの群から選択される、原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌について、ネイティブな TGF-β-R ポリペプチドシグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー、または酸ホスファターゼリーダーによって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、ネイティブなシグナル配列が申し分ないが、他の哺乳動物シグナル配列は適切であり得る。

#### 【0115】

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において望ましいような、いくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するように、種々のプレ配列が操作され得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るかまたはプロ配列を付加し得、これはまた、グリコシル化に影響し得る。最終タンパク質産物は、(成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して) -1 位に、発現に付随して 1 つ以上のさらなるアミノ酸を

10

20

30

40

50

有し得、これは、全く除去されないかもしれない。例えば、最終タンパク質産物は、アミノ末端に結合される、ペプチダーゼ切断部位において見出される1つまたは2つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位の使用は、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域を切断する場合、所望の T G F - - R ポリペプチドの少し短縮した形態を生じ得る。

#### 【0116】

多くの場合において、核酸分子の転写は、ベクター内の1つ以上のイントロンの存在によって増加する；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞（特に、哺乳動物宿主細胞）において産生される場合、特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に、使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合、T G F - - R 遺伝子内に天然に存在し得る。イントロンが遺伝子内に天然に存在しない（大部分の c D N A についてのような）場合、イントロンは、別の供給源から得られ得る。隣接配列および T G F - - R 遺伝子に対するイントロンの位置は、そのイントロンが効果的に転写されなければならないので、一般的に重要である。従って、T G F - - R c D N A 分子が転写される場合、イントロンの好ましい位置は、転写開始部位の3'側であり、かつ、ポリ-A転写終結配列の5'側である。好ましくは、イントロンは、コード配列を中断しないように、c D N A の一方の側またはもう一方の側（すなわち、5'側または3'側）に配置される。任意の供給源（ウイルス、原核生物および真核生物（植物または動物）を含む）由来の任意のイントロンを使用して本発明を実行し得るが、但し、このイントロンは、挿入される宿主細胞に適合性である。合成イントロンもまた本明細書中に含まれる。必要に応じて、1つより多くのイントロンがベクター内で使用され得る。

10

20

#### 【0117】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には各々、宿主生物によって認識され、T G F - - R ポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する構造遺伝子の開始コドンに対して上流（すなわち、5'側）（一般的に、約100~1000bp内）に配置される非転写配列である。プロモーターは、通常、2つのクラス（誘導プロモーターおよび構成プロモーター）の1つにグループ化される。誘導プロモーターは、培養条件におけるいくらかの変化（例えば、栄養の存在または非存在、あるいは温度の変化）に応答してそれらの制御下で、D N A からの増加したレベルの転写を開始する。他方、構成プロモーターは、連続的な遺伝子産物の産生を開始する；すなわち、遺伝子発現に対してほとんど制御しないかまたは制御しない。多数のプロモーター（種々の潜在的な宿主細胞によって認識される）が周知である。適切なプロモーターは、供給源のD N A からプロモーターを制限酵素消化によって取り出し、そして所望のプロモーター配列をベクターに挿入することによって、T G F - - R ポリペプチドをコードするD N A に作動可能に連結される。ネイティブなT G F - - R プロモーター配列は、T G F - - R 核酸分子の増幅および/または発現を指向するために使用され得る。しかし、ネイティブなプロモーターと比較して大きい転写および発現タンパク質のより高い産生が可能であり、そして使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合、異種プロモーターが好ましい。

30

#### 【0118】

原核生物宿主との使用に適切なプロモーターとしては、-ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ、トリプトファン（t r p）プロモーター系；およびハイブリッドプロモーター（例えば、t a c プロモーター）が挙げられる。他の公知の細菌プロモーターもまた、適切である。これらの配列は、公開されており、それによって、当業者は、任意の有用な制限部位を供給するのに必要とされるリンカーまたはアダプターを使用して、所望のD N A 配列にそれらを連結し得る。

40

#### 【0119】

酵母宿主との使用に適切なプロモーターはまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと有利に使用される。哺乳動物宿主細胞との使用に適切なプロモーターは周知であり、これには、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイ

50

ルス（例えば、Adenovirus 2）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましいシミアンウイルス40（SV40）のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

【0120】

TGF-β-R 遺伝子発現を制御する際に目的となり得るさらなるプロモーターとして、以下が挙げられるが、これらに限定されない：SV40 初期プロモーター領域（Bernois 及び Chambon, 1981, Nature 290:304-10）；CMV プロモーター；ラウス肉腫ウイルスの3'側の長末端反復に含まれるプロモーター（Yamamoto ら, 1980, Cell 22:787-97）；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagner ら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-45）；メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinster ら, 1982, Nature 296:39-42）；β-ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター（Villa-Kamaroff ら, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:3727-31）；または tac プロモーター（DeBoer ら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:21-25）。組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている、以下の動物転写制御領域もまた関心が高い：膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼI 遺伝子制御領域（Swift ら, 1984, Cell 38:639-46）；Ornitz ら, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986)；MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515）；膵臓細胞において活性なインシュリン遺伝子制御領域（Hanahan, 1985, Nature 315:115-22）；リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedl ら, 1984, Cell 38:647-58；Adames ら, 1985, Nature 318:533-38；Alexander ら, 1987, Mol. Cell. Biol., 7:1436-44）；精巣細胞、乳房細胞、リンパ系細胞、および肥満細胞において活性なマウス乳腺癌ウイルス制御領域（Leder ら, 1986, Cell 45:485-95）；肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域（Pinkert ら, 1987, Genes and Devel. 1:268-76）；肝臓において活性な α-フェトプロテイン質遺伝子制御領域（Krumlauf ら, 1985, Mol. Cell. Biol., 5:1639-48；Hammer ら, 1987, Science 235:53-58）；肝臓において活性な α1-抗トリプシン遺伝子制御領域（Kelsey ら, 1987, Genes and Devel. 1:161-71）；骨髄性細胞において活性な α-グロビン遺伝子制御領域（Mogram ら, 1985, Nature 315:338-40；Kollias ら, 1986, Cell 46:89-94）；脳の稀突起神経膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域（Readhead ら, 1987, Cell 48:703-12）；骨格筋において活性なミオシン軽鎖-2 遺伝子制御領域（Sani, 1985, Nature 314:283-86）；ならびに視床下部において活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域（Mason ら, 1986, Science 234:1372-78）。

【0121】

エンハンサー配列は、より高等な真核生物によって本発明の TGF-β-R ポリペプチドをコードする DNA の転写を増加するように、ベクターに挿入され得る。エンハンサーは、転写を増加させるためにプロモーターに作用する、通常約 10 ~ 300 bp の長さの DNA のシス作用性エレメントである。エンハンサーは、相対的な方向および位置が独立している。これらは、転写単位に対して 5' 側および 3' 側に見出された。哺乳動物遺伝子

から入手可能なくつかのエンハンサー配列が公知である（例えば、グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、 $\alpha$ -フェータンパク質およびインシュリン）。しかし、代表的には、ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化のための例示的な増強エレメントである。エンハンサーは、TGF- $\beta$ 1-R核酸分子に対して5'位または3'位でベクターにスプライシングされ得るが、代表的には、プロモーターから5'側に配置される。

#### 【0122】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような開始ベクターから構築され得る。このようなベクターは、全ての所望の隣接配列を含んでも良いし、含まなくても良い。本明細書に記載される隣接配列の1つ以上が既にベクター内に存在しない場合、これらは、個々に得られ得、ベクターに連結され得る。隣接配列のそれぞれを得るために使用される方法は、当業者に周知である。

10

#### 【0123】

本発明を実行するために好ましいベクターは、細菌宿主細胞、昆虫宿主細胞、および哺乳動物宿主細胞と適合性のベクターである。このようなベクターとしては、特に、pCRII、pCR3、およびpcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA)、pBSII (Stratagene, La Jolla, CA)、pET15 (Novagen, Madison, WI)、pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA)、pETL (BlueBacII, Invitrogen)、pDSR- (国際公開番号WO 90/14363) ならびにpFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY) が挙げられる。

20

#### 【0124】

さらなる適切なベクターとしては、コスミド、プラスミド、または改変ウイルスが挙げられ、これらに限定されないが、これらのベクター系は、選択された宿主細胞と適合性でなければならないことが理解される。このようなベクターとして、Bluescript (登録商標) プラスミド誘導體 (高コピー数ColE1-ベースのファージミド; Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) のようなプラスミド、Taq増幅PCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド (例えば、TOPOTM TA Cloning (登録商標) KitおよびPCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導體; Invitrogen)、ならびに哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはバキュロウイルス発現系 (pBacPAKプラスミド誘導體; Clontech) のようなウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

30

#### 【0125】

ベクターが構築され、そしてTGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後に、完全なベクターが増幅および/またはポリペプチド発現に適切な宿主細胞に挿入され得る。TGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドについての発現ベクターの選択された宿主細胞への形質転換は、トランスフェクション、感染、塩化カルシウム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、DEAE-デキストラン法、または他の公知の技術のような方法を含む周知の方法によって達成され得る。選択される方法は、使用される宿主細胞の型に依存する。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、Sambrookら (前出) に記載される。

40

#### 【0126】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞 (例えば、E. coli) または真核生物宿主細胞 (例えば、酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞) であり得る。宿主細胞は、適切な条件下で培養される場合にTGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドを合成し、これは、続いて、培養培地から (宿主細胞がそのポリペプチドを培地に分泌する場合) 収集され得るか、または直接そ

50

のポリペプチドを産生する宿主細胞から収集される（そのポリペプチドが分泌されない場合）。適切な宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、活性に望ましいかまたは必要なポリペプチド修飾（例えば、グリコシル化またはリン酸化）、および生物学的に活性な分子へと折り畳まれる容易さなどの種々の因子に依存する。

【0127】

多くの適切な宿主細胞が当該分野において公知であり、多くが、American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VAから入手可能である。例としては、チャニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、CHO DHFR(-)細胞(Urlaubら, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:4216-20)、ヒト胚性腎臓(HEK)293または293 T細胞、あるいは3T3細胞のような哺乳動物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。適切な哺乳動物宿主細胞の選択および形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物生成、および精製のための方法が当該分野において公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルのCOS-1およびCOS-7細胞株、およびCV-1細胞株である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、霊長動物細胞株およびげっ歯類細胞株（形質転換細胞株を含む）が挙げられる。正常な二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養物から誘導される細胞株、ならびに初代外植片もまた適切である。候補細胞は、選択遺伝子を遺伝子型的に欠き得るか、または優性に作用する選択遺伝子を含み得る。他の適切な哺乳動物細胞株として、マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa、マウスL-929細胞、Swissから誘導された3T3株、Balb-cまたはNIHマウス、BHKまたはHaKハムスター細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。これらの細胞株のそれぞれは、タンパク質発現に関する分野の当業者にとって公知であり入手可能である。

【0128】

同様に、本発明のための適切な宿主細胞として有用なのは、細菌細胞である。例えば、E. coli（例えば、HB101、DH5、DH10、およびMC1061）の種々の菌株は、生物工学の分野において宿主細胞として周知である。B. subtilis、Pseudomonas spp.、他のBacillus spp.、Streptomyces spp.などの種々の菌株もまた、本方法において使用され得る。

【0129】

当業者に公知の酵母細胞の多くの菌株はまた、本発明のポリペプチドの発現のための宿主細胞として利用可能である。好ましい酵母細胞としては、例えば、Saccharomyces cerevisiaeおよびPichia pastorisが挙げられる。

【0130】

さらに、望ましい場合には、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kittsら, 1993, Biotechniques, 14:810-17; Lucklow, 1993, Curr. Opin. Biotechnol. 4:564-72; およびLucklowら, 1993, J. Virol., 67:4566-79に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9およびHi5 (Invitrogen)である。

【0131】

グリコシル化TGF-β-Rポリペプチドを発現するために、トランスジェニック動物がまた使用され得る。例えば、トランスジェニック乳汁産生動物（例えば、雌ウシまたはヤギ）を使用し、本発明のグリコシル化ポリペプチドを動物の乳汁中に得ることができる。TGF-β-Rポリペプチドを産生するために、植物もまた使用し得るが、一般的に、植物において生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞において産生されるものとは異なり、ヒト治療の用途に適切ではないグリコシル化産物を生じ得る。

【0132】

（ポリペプチド産生）

TGF-β-Rポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞は、当業者に周知の標準的な培地を使用して培養され得る。この培地は通常、細胞の増殖および生存に必要な全ての栄養

素を含む。E. coli細胞を培養するための適切な培地としては、例えば、Luria Broth (LB) および/または Terrific Broth (TB) が挙げられる。真核生物細胞を培養するための適切な培地としては、Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640)、Minimal Essential Medium (MEM) および/または Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) が挙げられ、これらの全ては、培養される特定の細胞株に必要とされるように血清および/または増殖因子を補充され得る。昆虫培養物についての適切な培地は、必要に応じて、イーストレート (yeastolate)、ラクトアルブミン加水分解産物、および/または胎仔ウシ血清を補充したグレース培地である。

10

## 【0133】

代表的に、トランスフェクトまたは形質転換された細胞の選択的な増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、培地に補充物質として添加される。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されるプラスミドに存在する選択マーカーエレメントによって指示される。例えば、選択マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培養培地に加えらるる化合物は、カナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリン、およびネオマイシンが挙げられる。

## 【0134】

宿主細胞によって産生される TGF- $\beta$  - R ポリペプチドの量は、当該分野において公知の標準的な方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定しないが、ウェスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分離、免疫沈降、および/または DNA 結合ゲルシフトアッセイのような活性アッセイが挙げられるが、これらに限定されない。

20

## 【0135】

TGF- $\beta$  - R ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計される場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地中に見出され得る。しかし、TGF- $\beta$  - R ポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合、細胞質および/または核 (真核宿主細胞について) に、あるいは、細胞質ゾル (グラム陰性細菌宿主細胞について) に存在する。

## 【0136】

宿主細胞の細胞質ゾルおよび/または核 (真核生物宿主細胞について) あるいは細胞質ゾル (細菌宿主細胞について) に位置する TGF- $\beta$  - R ポリペプチドについて、細胞内物質 (グラム陰性細菌に対する封入体を含む) は、当業者に公知の任意の標準的技術を用いて宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、均質化、および/または超音波破碎、次いで遠心分離によって溶解されペリプラズム/細胞質の内容物を放出し得る。

30

## 【0137】

TGF- $\beta$  - R ポリペプチドが細胞質ゾル内に封入体を形成した場合、この封入体は、しばしば、細胞内膜および/または細胞外膜に結合し得、従って、主に、遠心分離後のペレット物質において見出される。次いで、ペレット物質は、pH 限局値で処理され得るか、または還元剤 (アルカリ性の pH では、例えばジチオトレイトール、または酸性の pH では、例えばトリスカルボキシエチルホスフィン) の存在下カオトロピック剤 (例えば、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体) で処理されて、封入体を放出し、分断し、そして可溶化し得る。次いで、可溶化された TGF- $\beta$  - R ポリペプチドは、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。TGF- $\beta$  - R ポリペプチドを単離することが望ましい場合、単離は、本明細書中および Marstonら, 1990, Meth. Enz., 182: 264-75 に記載されるような標準的な方法を使用して達成され得る。

40

## 【0138】

いくつかの場合、TGF- $\beta$  - R ポリペプチドは、単離の際に生物学的に活性でなくても良い。「再折り畳み」すなわちポリペプチドをその3次構造に変換しジスルフィド結合を

50

生成するための種々の方法を、生物学的活性を回復するために使用し得る。このような方法は、一定のpH（通常は、7より上）および特定の濃度のカオトロピック剤（chaotropic）の存在に、可溶化されたポリペプチドを曝露する工程を包含する。カオトロピック剤の選択は、封入体の可溶化に使用される選択肢に非常に類似するが、通常、カオトロピック剤はより低い濃度で使用され、溶解に使用されるカオトロピック剤と必ずしも同一ではない。多くの場合、再折り畳み/酸化溶液はまた、還元剤、または特定の比の還元剤およびその酸化形態を含み、特定の酸化還元電位を生成し、タンパク質のシステイン架橋の形成を生じるジスルフィドシャフリングを可能にする。通常使用される酸化還元対のいくつかとしては、システイン/シスタミン、グルタチオン（GSH）/ジチオビスGSH、塩化第二銅、ジチオトレイトール（DTT）/ジチアンDTT、および2-2-メルカプトエタノール（bME）/ジチオ-b（ME）が挙げられる。多くの場合において、共溶媒が使用され得るか、または再折り畳みの効率を増加するため必要とされ得、この目的のために使用されるより一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

#### 【0139】

封入体がTGF- - Rポリペプチドの発現において有意な程度まで形成されない場合、ポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後の上清中に見出される。ポリペプチドはさらに、本明細書中に記載されるような方法を使用して上清から単離され得る。

#### 【0140】

溶液からのTGF- - Rポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。ポリペプチドが、ヘキサヒスチジン（TGF- - Rポリペプチド/ヘキサHis）のようなタグまたは他の小さなペプチド（例えば、FLAG（Eastman Kodak Co., New Haven, CT）またはmyc（Invitrogen））をそのカルボキシル末端またはアミノ末端のいずれかにおいて含むように合成された場合、このポリペプチドはカラムマトリクスがタグに対して高い親和性を有するアフィニティークラムに溶液を通すことによって一工程で精製され得る。

#### 【0141】

例えば、ポリヒスチジンは、ニッケルに対して大きな親和性および特異性を有して結合する。従って、ニッケルのアフィニティークラム（例えば、Qiagen（登録商標）ニッケルカラム）は、TGF- - Rポリペプチド/ポリHisの精製のために使用され得る。例えば、Current Protocols in Molecular Biology § 10.11.8（Ausubelら編、Green Publishers Inc. and Wiley & Sons 1993）を参照のこと。

#### 【0142】

さらに、TGF- - Rポリペプチドは、TGF- - Rポリペプチドを特異的に認識し得、そして結合し得るモノクローナル抗体の使用によって精製され得る。

#### 【0143】

精製のための他の適切な手段としては、限定しないが、アフィニティークロマトグラフィー、免疫親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、モレキュラーサイズクロマトグラフィー（molecular sieve chromatography）、HPLC、電気泳動（ネイティブゲル電気泳動を含む）に続くゲル溶出、および分取用等電集束法（「Isoprime」machine/technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA）が挙げられる。いくつかの場合において、2つ以上の精製技術を、増加した純度を達成するために組み合わせ得る。

#### 【0144】

TGF- - Rポリペプチドはまた、当該分野で公知の技術（例えば、Merrifieldら、1963、J. Am. Chem. Soc. 85: 2149；Houghtenら、1985、Proc Natl Acad. Sci. USA 82: 5132；ならびに、StewartおよびYoung、Solid Phase Peptide Sy

nt h e s i s ( P i e r c e C h e m i c a l C o . 1 9 8 4 ) に記載される技術)を使用する化学合成法(例えば、固相ペプチド合成)によって調製され得る。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを有するかまたは有さずに合成され得る。化学的に合成されたTGF-β-Rポリペプチドは、これらの参考文献に記載される方法を使用して酸化され得、ジスルフィド結合を形成する。化学的に合成されたTGF-β-Rポリペプチドは、組換え的に産生されるかまたは天然の供給源から精製される対応するTGF-β-Rポリペプチドに匹敵する生物学的活性を有すると期待され、従って、組換えまたは天然のTGF-β-Rポリペプチドと相互交換可能に使用され得る。

【0145】

TGF-β-Rポリペプチドを得る別の手段は、TGF-β-Rポリペプチドが天然に見出される供給源の組織および/または流体のような生物学的サンプルからの精製による。このような精製は、本明細書中に記載されるようなタンパク質精製のための方法を使用して行われ得る。精製の間、TGF-β-Rポリペプチドの存在が、例えば、組換え的に産生されたTGF-β-Rポリペプチドまたはそのペプチドフラグメントに対して調製された抗体を使用してモニターされ得る。

10

【0146】

核酸およびポリペプチドを産生するための多くのさらなる方法は、当該分野において公知であり、この方法は、TGF-β-Rポリペプチドに対して特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Robertsonら, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12297-303を参照のこと。これは、mRNAとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。また、Robertson, 1999, Curr. Opin. Chem. Biol. 3:268-73も参照のこと。さらに、米国特許第5,824,469号は、特定の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを得るための方法を記載する。この手順は、異種プールのオリゴヌクレオチドを生成する工程を包含し、この異種プールのオリゴヌクレオチドはそれぞれが、5'ランダム化配列、中央部の予備選択配列、および3'ランダム化配列を有する。得られる異種プールは、所望の生物学的機能を示さない細胞の集団に導入される。次いで、細胞の亜集団を、予め決定された生物学的機能を示すものについてスクリーニングする。その亜集団から、所望の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドが単離される。

20

30

【0147】

米国特許第5,763,192号;同第5,814,476号;同第5,723,323号;および同第5,817,483号は、ペプチドまたはポリペプチドを産生するためのプロセスを記載する。これは、確率論的な遺伝子またはそのフラグメントを産生し、次いで、その確率論的な遺伝子によってコードされた1以上のタンパク質を産生する宿主細胞にこれらの遺伝子を導入することによって達成される。次いで、この宿主は、所望の活性を有するペプチドまたはポリペプチドを産生する、これらのクローンを同定するためにスクリーニングされる。

【0148】

ペプチドまたはポリペプチドを産生するための別の方法は、Athersys, Inc.によって出願された国際公開番号WO99/15650に記載される。これは、「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」(RAGE-GD)として知られており、このプロセスは、インサイチュ組換え方法によって、内因性遺伝子の発現または遺伝子の過剰発現の活性化を含む。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同組換えまたは変則的(illegitimate)組換えによって、遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞中に、調節配列を組み込むことによって、活性化または増加される。この標的DNAは、まず、照射に供せられ、そして遺伝子プロモーターが挿入される。このプロモーターは、遺伝子の前方の裂け目に最終的に配置され、遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドまたはポリペプチドの発現を引き起こす。

40

50

## 【0149】

これらの方法はまた、包括的なTGF-β-Rポリペプチド発現ライブラリーを作製するために使用され得、これは、続いて、種々のアッセイ（例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイおよび生物全体のアッセイ（例えば、植物、マウスなど））において、ハイスループット表現型スクリーニングのために使用され得ることが理解される。

## 【0150】

（合成）

本明細書中に記載される核酸およびポリペプチド分子が組換え手段および他の手段によって産生され得ることは、当業者によって認識される。

## 【0151】

（選択的結合因子）

用語「選択的結合因子」とは、1つ以上のTGF-β-Rポリペプチドに対して特異性を有する分子をいう。適切な選択的結合因子としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに低分子。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を用いて調製され得る。本発明の例示的なTGF-β-Rポリペプチド選択的結合因子は、TGF-β-Rポリペプチドの特定の部分に結合し得、これによってTGF-β-Rポリペプチドレセプターへのこのポリペプチドの結合を阻害する。

## 【0152】

選択的結合因子（例えば、TGF-β-Rポリペプチドに結合する抗体および抗体フラグメント）は、本発明の範囲内にある。抗体は、単一特異性ポリクローナルを含むポリクローナル；モノクローナル（MAbs）；組換え；キメラ；ヒト化（例えば、相補性決定領域（CDR移植片化））；ヒト；単鎖；および/または二重特異性；ならびにそれらのフラグメント；改変体または誘導体であり得る。抗体フラグメントは、TGF-β-Rポリペプチド上のエピトープに結合する抗体のそれらの部分を含む。このようなフラグメントの例としては、全長の抗体の酵素的切断によって生じるFabおよびF(ab')フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えDNA技術（例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む組換えプラスミドの発現）によって生じるものが挙げられる。

## 【0153】

TGF-β-Rポリペプチドに指向されたポリクローナル抗体は、一般的に動物（例えば、ウサギまたはマウス）において、TGF-β-Rポリペプチドおよびアジュバントの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって産生される。TGF-β-Rポリペプチドを、免疫させる種において免疫原性であるキャリアタンパク質（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリン、または大豆トリプシンインヒビター）と結合することは、有用であり得る。また、凝集剤（例えば、ミョウバン）は、免疫応答を増強するために用いられる。免疫後、これらの動物を採血し、そしてこの血清を抗TGF-β-R抗体力価についてアッセイする。

## 【0154】

TGF-β-Rポリペプチドに指向されたモノクローナル抗体は、培養中の継代細胞株による抗体分子の産生を提供する任意の方法を用いて産生される。モノクローナル抗体を調製するための適切な方法の例としては、Kohlerら、Nature, 256: 495-497 (1975)のハイブリドーマ法、およびヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984)）；Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987)が挙げられる。TGF-β-Rポリペプチドと反応性のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本発明によって提供される。

## 【0155】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤としての使用のために改変され得る。1つの実施

10

20

30

40

50

形態は、「キメラ」抗体であり、この「キメラ」抗体において、重（H）鎖および/または軽（L）鎖の一部は、特定の種由来の抗体あるいは特定の抗体のクラスまたはサブクラスに属する抗体における、対応する配列と同一であるか、または相同であるが、その鎖の残部は、別の種由来の抗体または別の抗体のクラスまたはサブクラスに属する抗体における、対応する配列と同一であるかまたは相同である。このような抗体のフラグメントもまた、これらのフラグメントが所望の生物学的活性を示す限り、含まれる。米国特許第4,816,567号; Morrisonら, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855(1985)を参照のこと。

#### 【0156】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。米国特許第5,585,089号および同第5,693,762号を参照のこと。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源由来の抗体に導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば、当該分野で記載された方法(Jonesら, Nature 321:522-525(1986); Riechmannら, Nature, 332:323-327(1998); Verhoevenら, Science 239:1534-1536(1988))を用いて、ヒト抗体の対応する領域についてのげっ歯類相補性決定領域の少なくとも一部分を置換することによって実施され得る。

#### 【0157】

TGF- $\beta$  Rポリペプチドに結合するヒト抗体はまた、本発明に包含される。内因性免疫グロブリン産生の非存在下で、ヒト抗体のレパートリーを産生し得るトランスジェニック動物(例えば、マウス)を用いて、このような抗体は、必要に応じてキャリアと結合体化される、TGF- $\beta$  Rポリペプチド抗原(すなわち、連続した少なくとも6アミノ酸を有する)での免疫によって産生される。例えば、Jakobovitsら, Proc. Natl. Acad. Sci., 90:2551-2555(1993); Jakobovitsら, Nature 362:255-258(1993); Bruggermannら, Year in Immunol., 7:33(1993)を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、この動物における免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖をコードする内因性遺伝子座を無能力化し、かつそのゲノム中に、ヒト重鎖および軽鎖のタンパク質をコードする遺伝子座を挿入することによって生成される。次いで、部分的に改変された動物(すなわち、全てよりも少ない数の改変を有する動物)を交雑育種して、所望の免疫系の改変を全て有する動物を得る。免疫原を投与された場合、これらのトランスジェニック動物は、(例えば、マウスよりもむしろ)ヒトのアミノ酸配列(これらの抗原に対して免疫特異性である可変領域を含む)を有する抗体を産生する。国際出願番号PCT/US96/05928およびPCT/US93/06926を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第5,545,807号、国際出願番号PCT/US91/245およびPCT/GB89/01207、ならびに欧州特許第546073B1号および第546073A1号に記載される。ヒト抗体はまた、本明細書中に記載されるように、宿主細胞における組換えDNAの発現によってか、またはハイブリドーマ細胞における発現によって産生され得る。

#### 【0158】

代替実施形態において、ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーから産生され得る(Hoogenboomら, J. Mol. Biol. 227:381(1991); Marksら, J. Mol. Biol. 222:581(1991))。これらのプロセスは、糸状バクテリオファージの表面上の抗体レパートリーの提示による免疫選択、および選りぬきの抗原に対するそれらの結合によるファージの次の選択を模倣する。1つのこのような技術は、国際出願番号PCT/US98/17364に記載されており、これは、このようなアプローチを用いた、MPL-レセプターおよびmsk-レセプターに対する高親和性かつ機能的アゴニストの抗体の単離を記載している。

#### 【0159】

10

20

30

40

50

キメラ抗体、CDR移植片化抗体、およびヒト化抗体は、組換え方法によって代表的に産生される。これらの抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入され、そして本明細書に記載される材料および手順を用いて発現される。好ましい実施形態において、抗体は、哺乳動物の宿主細胞（例えば、CHO細胞）において産生される。モノクローナル（例えば、ヒト）抗体は、本明細書において記載されるように、宿主細胞において組換えDNAの発現によってかまたはハイブリドーマ細胞における発現によって産生され得る。

【0160】

本発明の抗TGF-β-R抗体は、以下の任意の公知のアッセイ方法において用いられ得る：例えば、TGF-β-Rポリペプチドの検出および定量的のための、競合結合アッセイ、直接的および間接的サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイ（Solomon, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)）。これらの抗体は、用いられるアッセイ方法に適切な親和性を有するTGF-β-Rポリペプチドに結合する。 10

【0161】

診断適用について、特定の実施形態において、抗TGF-β-R抗体は、検出可能な部分で標識され得る。検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで検出可能なシグナルを産生し得る任意の部分であり得る。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>125</sup>I、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In、もしくは<sup>67</sup>Ga）；蛍光化合物もしくは化学発光化合物（例えば、フルオロセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン）；または酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、もしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ（Bayer, *Meth. Enz.*, 184: 138-163 (1990)））であり得る。 20

【0162】

競合的結合アッセイは、限られた量の抗TGF-β-R抗体との結合に関して、試験サンプルの分析物（TGF-β-Rポリペプチド）と競合する、標識された標準物（例えば、TGF-β-Rポリペプチド、またはその免疫学的反応性部分）の能力に依存する。試験サンプル中のTGF-β-Rポリペプチドの量は、抗体に結合する標準物の量に反比例する。結合する標準物の量を決定するのを容易にするため、これらの抗体は、競合の前か後に代表的に不溶化され、その結果、これらの抗体に結合された標準物および分析物は、結合されていないままの標準物および分析物から、都合良く分離され得る。 30

【0163】

サンドイッチアッセイは、代表的に、検出および/または定量されるタンパク質の2つの抗体（異なる免疫原性部分、またはエピトープにそれぞれ結合し得る）の使用を含む。サンドイッチアッセイにおいて、試験サンプルの分析物は、代表的に、固体支持体上に固定化される第1抗体に結合し、その後、第2の抗体がこの分析物に結合し、これにより、不溶性の3つの部分の複合体を形成する。米国特許第4,376,110号を参照のこと。第2の抗体は、それ自体に検出可能な部分を標識され得（直接的サンドイッチアッセイ）るか、または検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定され得る（間接的サンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、酵素結合免疫ソルベント検定法（ELISA）であり、この場合、検出可能な部分は、酵素である。 40

【0164】

選択的結合因子（抗TGF-β-R抗体を含む）はまた、インビボでのイメージングに有用である。検出可能な部分で標識された抗体は、動物に（好ましくは血流中に）投与され得、そして宿主における標識された抗体の存在および位置が、アッセイされる。抗体は、核磁気共鳴、放射線学、または当該分野で公知の他の検出手段のいずれかによって、動物において検出可能な任意の部分で標識され得る。

【0165】

本発明の選択的結合因子（抗体を含む）は、治療剤として用いられ得る。これらの治療剤 50

は、一般に、以下の点において、アゴニストまたはアンタゴニストである：これらのいずれかが、TGF-β-Rポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を、それぞれ、増強するかまたは減少させる。1つの実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗体は、TGF-β-Rポリペプチドに特異的に結合し得、そして、インビボまたはインビトロにおいてTGF-β-Rポリペプチドの機能的活性を阻害または排除し得る、抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、選択的結合因子（例えば、アンタゴニスト抗体）は、少なくとも約50%まで、そして好ましくは、少なくとも約80%まで、TGF-β-Rポリペプチドの機能的活性を阻害する。別の実施形態において、選択的結合因子は、抗TGF-β-Rポリペプチド抗体であり得、これは、TGF-β-Rポリペプチド結合パートナー（リガンドまたはレセプター）と相互作用し得、これによって、インビボまたはインビトロにおいてTGF-β-Rポリペプチド活性を阻害または排除する。選択的結合因子（アゴニストおよびアンタゴニスト抗TGF-β-Rポリペプチド抗体を含む）は、当該分野で周知のスクリーニングアッセイによって同定される。

10

**【0166】**

本発明はまた、TGF-β-R選択的結合因子（例えば、抗体）および生物学的サンプルにおいてTGF-β-Rポリペプチドのレベルを検出するのに有用な他の試薬を備えるキットに関する。このような試薬は、検出可能な標識、ブロックング血清、ポジティブおよびネガティブコントロールサンプル、ならびに検出試薬を含み得る。

**【0167】**

（マイクロアレイ）

DNAマイクロアレイ技術は、本発明に従って利用され得ることが理解される。DNAマイクロアレイは、固体支持体（例えば、ガラス）上に配置される核酸の小型かつ高密度アレイである。アレイ内の各セルまたはエレメントは、相補的核酸配列（例えばmRNA）とハイブリダイゼーションのための標的として働く単一核酸種の多数のコピーを有する。DNAマイクロアレイ技術を用いた発現プロファイリングにおいて、mRNAはまず、細胞サンプルまたは組織サンプルから抽出され、次いで、蛍光標識されたcDNAに酵素により変換される。この物質は、このマイクロアレイにハイブリダイズされ、そして未結合のcDNAが洗浄によって除去される。次いで、このアレイ上に示された個々の遺伝子の発現は、各標的核酸分子に特異的に結合する標識されたcDNAの量を定量化することによって可視化される。このように、幾千もの遺伝子の発現が、生物学的材料の単一サンプルから、ハイスループットかつ並列様式で定量化され得る。

20

30

**【0168】**

このハイスループット発現プロファイリングは、以下を含むが、これらに限定されない本発明のTGF-β-R分子に関して、広い範囲の適用を有する：治療のための標的としてTGF-β-R疾患関連遺伝子の同定および検証；関連TGF-β-R分子およびそのインヒビターの分子毒物学；治験のための代理マーカーの集団および世代の階層化；ならびに、ハイスループットスクリーニングにおける選択的化合物の同定に役立つことによる関連TGF-β-Rポリペプチド低分子薬物開発の増強。

**【0169】**

（化学的誘導体）

TGF-β-Rポリペプチドの化学的に改変された誘導体は、本明細書中に記載された開示を考慮して、当業者によって調製され得る。TGF-β-Rポリペプチド誘導体は、このポリペプチドに自然に結合した分子の型または位置のいずれかにおいて異なる様式で改変される。誘導体は、1以上の自然に結合した化学的な基の欠失によって形成される分子を含み得る。配列番号2もしくは配列番号4または他のTGF-β-Rポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、1以上のポリマーの共有結合によって改変され得る。例えば、選択されたポリマーは、代表的に水溶性であり、その結果、それが結合するタンパク質は、水性環境（例えば、生理学的な環境）下で沈殿しない。ポリマーの混合物が、適切なポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、最終産物の調製物の治療学的用途のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

40

50

## 【0170】

このポリマーの各々は、任意の分子量を有し得、そして分枝または非分枝であり得る。このポリマーの各々は、代表的に、約2kDaと約100kDaとの間の平均分子量を有する（この用語「約（およそ）」は、水溶性ポリマーの調製の際に、いくつかの分子が、示した分子量より多く、いくつかは少ない分子量を有することを示す）。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約5kDaと約50kDaの間、より好ましくは、約12kDaと約40kDaとの間、そして最も好ましくは、約20kDaと約35kDaとの間である。

## 【0171】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N-結合型またはO-結合型炭水化物、糖、ホスフェート、ポリエチレングリコール（PEG）（これは、モノ-（ $C_1 - C_{10}$ ）、アルコキシ-、またはアリアルオキシ-ポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導体化するために使用されたPEGの形態を含む）、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン（例えば、約6kDの低分子量デキストラン）、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ-（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、およびポリビニルアルコール。共有結合で結合したTGF- $\beta$ -Rポリペプチドマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本発明に包含される。

## 【0172】

一般に、化学的誘導体化は、タンパク質と活性化ポリマー分子とを反応させるために用いられる任意の適切な条件下で実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、一般に、以下の工程を包含する：（a）ポリペプチドと活性化ポリマー分子（例えば、ポリマー分子の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）とを反応させる工程であって、この反応性が、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のTGF- $\beta$ -Rポリペプチドが、1つ以上のポリマー分子に結合される条件下で行われる、工程、および（b）反応産物を得る工程、を包含する。最適反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ポリマー分子：タンパク質の比がより大きくなればなるほど、結合したポリマー分子の割合がより多くなる。1つの実施形態において、TGF- $\beta$ -Rポリペプチド誘導体は、アミノ末端に単一のポリマー分子の部分をも有し得る。例えば、米国特許第5,234,784号を参照のこと。

## 【0173】

ポリペプチドのペグ化は、特に、当該分野で公知のペグ化反応のいずれかを使用して実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載されている：Francisら, Focus on Growth Factors, 3:4-10 (1992); 欧州特許第0154316; 同第0401384および米国特許第4,179,337号。例えば、ペグ化は、本明細書において記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子（または、アナログ反応水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。アシル化反応について、選択されたポリマーは、単一反応性エステル基を有するべきである。還元的アルキル化について、選択されたポリマーは、単一反応性アルデヒド基を有するべきである。反応性アルデヒドは、例えば、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド（これは、水溶性である）であるか、またはモノ $C_1 - C_{10}$ アルコキシもしくはそのアリアルオキシ誘導体である（米国特許第5,252,714号を参照のこと）。

## 【0174】

別の実施形態において、TGF- $\beta$ -Rポリペプチドは、ビオチンと化学的に結合し得る。次いで、結合されたビオチン/TGF- $\beta$ -Rポリペプチド分子は、アビジンへの結合が可能となり、その結果、四価のアビジン/ビオチン/TGF- $\beta$ -Rポリペプチド分子

を生じる。TGF-β-Rポリペプチドはまた、ジニトロフェノール(DNP)またはトリニトロフェノール(TNP)に共有結合し得、そして得られた結合体は、抗DNPまたは抗TNP-IgMとともに沈澱して、結合価が10の十量体の結合体を形成し得る。

【0175】

一般に、本発明のTGF-β-Rポリペプチド誘導体の投与によって緩和され得るかまたは調節され得る状態は、TGF-β-Rポリペプチドについて本明細書において記載される状態を含む。しかし、本明細書において開示されるTGF-β-Rポリペプチド誘導体は、誘導体化されていない分子と比較した場合、さらなる活性、増強した生物学的活性もしくは減少した生物学的活性、または他の特性(例えば、増加した半減期もしくは減少した半減期)を有し得る。

10

【0176】

(遺伝子操作した非ヒト動物)

非ヒト動物(例えば、マウス、ラット、または他のげっ歯類;ウサギ、ヤギ、もしくはヒツジ、または他の家畜)は、本発明の範囲内にさらに含まれ、ここで、ネイティブなTGF-β-Rポリペプチドをコードする遺伝子は、破壊(すなわち、「ノックアウト」)され、その結果、TGF-β-Rポリペプチドの発現レベルは、有意に減少するかまたは完全に消失する。このような動物は、米国特許第5,557,032号に記載されるような技術および方法を用いて調製され得る。

【0177】

本発明はさらに、非ヒト動物(例えば、マウス、ラット、または他のげっ歯類、ウサギ;ヤギ、ヒツジ、または他の家畜)を含み、ここで、この動物のTGF-β-R遺伝子のネイティブな形態または異種TGF-β-R遺伝子のいずれかは、この動物によって過剰に発現され、これによって、「トランスジェニック」動物を作製する。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第5,489,743号および国際公開番号WO94/28122に記載されるような、周知の方法を用いて調製され得る。

20

【0178】

本発明はさらに、非ヒト動物を含み、ここで、本発明の1つ以上のTGF-β-Rポリペプチドのプロモーターは、1つ以上のネイティブなTGF-β-Rポリペプチドの発現のレベルを変更するために、(例えば、相同組換え方法を用いることによって)活性化させるかまたは不活性化されるかのいずれかである。

30

【0179】

これらの非ヒト動物は、薬物候補スクリーニングのために用いられ得る。このようなスクリーニングにおいて、動物に対する薬物候補の影響が測定され得る。例えば、薬物候補は、TGF-β-R遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、産生されるTGF-β-Rポリペプチドの量は、薬物候補への動物の曝露後、測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物に対する薬物候補の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、疾患状態もしくは病理学的状態を、生じる得るか、または疾患状態もしくは病理学的状態に関連し得る。このような場合、遺伝子の発現を減少させる薬物候補の能力または病理学的状態を予防または阻害する薬物候補の能力を試験し得る。他の例において、特定の代謝産物(例えば、ポリペプチドのフラグメント)の産生は、疾患状態もしくは病理学的状態を、生じ得るか、または疾患状態もしくは病理学的状態と関連し得る。このような場合、このような代謝産物の産生を減少させる薬物候補の能力または病理学的状態を予防するかまたは防止する薬物候補の能力を試験し得る。

40

【0180】

(TGF-β-Rポリペプチド活性の他のモジュレーターについてのアッセイ)

いくつかの状況において、TGF-β-Rポリペプチドの活性のモジュレーターである分子(すなわち、アゴニストまたはアンタゴニスト)を同定することが所望され得る。TGF-β-Rポリペプチドを調節する天然の分子または合成分子は、1つ以上のスクリーニングアッセイ(例えば、本明細書において記載されるアッセイ)を用いて同定され得る。このような分子は、エキソピボ様式、またはインピボ様式のいずれかで、注射、または経

50

口送達、移植デバイスなどによって投与され得る。

【0181】

「試験分子」とは、TGF- $\beta$  - Rポリペプチドの活性を調節（すなわち、増加または減少）する能力についての評価下にある分子をいう。最も一般的に、試験分子は、TGF- $\beta$  - Rポリペプチドと直接相互作用する。しかし、試験分子はまた、TGF- $\beta$  - Rポリペプチド活性を、例えば、TGF- $\beta$  - R遺伝子発現に影響を与えることによってか、またはTGF- $\beta$  - Rポリペプチド結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）に結合することによって、間接的に調節し得ることも考慮される。1つの実施形態において、試験分子は、少なくとも約 $10^{-6}$  M、好ましくは約 $10^{-8}$  M、より好ましくは約 $10^{-9}$  M、そしてなおより好ましくは約 $10^{-10}$  Mの親和性定数で、TGF- $\beta$  - Rポリペプチドと結合する。 10

【0182】

TGF- $\beta$  - Rポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明によって包含される。特定の実施形態において、TGF- $\beta$  - Rポリペプチドは、試験分子とTGF- $\beta$  - Rポリペプチドとの相互作用を可能にする条件下で試験分子とともにインキュベートされ、そして相互作用の程度が測定される。試験分子は、実質的に精製された形態においてかまたは粗混合物においてスクリーニングされ得る。

【0183】

特定の実施形態において、TGF- $\beta$  - RポリペプチドアゴニストまたはTGF- $\beta$  - Rポリペプチドアンタゴニストは、TGF- $\beta$  - Rポリペプチドと相互作用し、その活性を調節するタンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の分子であり得る。TGF- $\beta$  - Rポリペプチド発現を調節する分子は、TGF- $\beta$  - Rポリペプチドをコードする核酸に対して相補的であるか、またはTGF- $\beta$  - Rポリペプチドの発現を指示するかまたは制御する核酸配列に相補的である核酸、および発現のアンチセンス調節因子として作用する核酸を含む。 20

【0184】

一旦、試験化合物がTGF- $\beta$  - Rポリペプチドと相互作用すると同定されると、この分子は、TGF- $\beta$  - Rポリペプチド活性を増加または減少させる能力についてさらに評価され得る。試験分子とTGF- $\beta$  - Rポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの形態で実施され得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、液相アッセイ、および免疫アッセイが挙げられる。一般に、試験分子は、特定の期間、TGF- $\beta$  - Rポリペプチドと共にインキュベートされ、そしてTGF- $\beta$  - Rポリペプチド活性が、生物学的活性を測定するために1以上のアッセイによって決定される。 30

【0185】

試験分子とTGF- $\beta$  - Rポリペプチドとの相互作用はまた、免疫アッセイにおいて、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を使用して直接的にアッセイされ得る。あるいは、本明細書中に記載されるようなエピトープタグを含むTGF- $\beta$  - Rポリペプチドの改変形態は、溶液および免疫アッセイで使用され得る。

【0186】

TGF- $\beta$  - Rポリペプチドが、結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）との相互作用を介して、生物学的活性を示す場合において、種々のインビトロアッセイが、対応する結合パートナー（例えば、選択的結合因子、レセプター、またはリガンド）へのTGF- $\beta$  - Rポリペプチドの結合を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、その結合パートナーに対するTGF- $\beta$  - Rポリペプチドの結合の速度および/または程度を増加または減少させるそれらの能力について、試験分子をスクリーニングするために使用され得る。1アッセイにおいて、TGF- $\beta$  - Rポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェル中に固定化される。次いで、放射標識したTGF- $\beta$  - Rポリペプチド結合パートナー（例えば、ヨウ素化したTGF- $\beta$  - Rポリペプチド結合パートナー）および試験分子は、このウェルに、一つづつ（いずれかの順序で）または同時に添加され得る。インキュベーション後に、この壁を洗浄し、そしてシンチレーション計数器を使 40 50

用して、放射活性を計数し、結合パートナーが TGF-β-R ポリペプチドに結合する程度を決定する。代表的に、分子は、ある濃度範囲にわたって試験され、そして試験アッセイの 1 以上の要素を欠く一連のコントロールウェルは、結果の評価の正確性のために使用され得る。この方法の代替は、タンパク質の「位置」を逆にする工程（すなわち、マイクロタイタープレートウェルに対して TGF-β-R ポリペプチド結合パートナーを固定化する工程）、試験分子および放射標識した TGF-β-R ポリペプチドをインキュベートする工程、および TGF-β-R ポリペプチド結合の程度を決定する工程を包含する。例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*、第 18 章（Ausubel 編、Green Publishers Inc. ならびに Wiley および Sons 1995）を参照のこと。

10

## 【0187】

放射性標識に対する代替として、TGF-β-R ポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、そしてビオチン化されたタンパク質の存在が、次いで、酵素（例えば、ワサビペルオキシダーゼ（HRP）またはアルカリホスファターゼ（AP））に結合したストレプトアビジン（これらは比色定量的に検出されるか、またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって検出され得る）を使用して検出され得る。TGF-β-R ポリペプチドまたは TGF-β-R ポリペプチド結合パートナーに対する抗体（これらは、ビオチンに結合されている）はまた、AP または HRP に連結した酵素連結ストレプトアビジンとの複合体のインキュベーションに続いて、検出の目的のために使用され得る。

20

## 【0188】

TGF-β-R ポリペプチドまたは TGF-β-R ポリペプチド結合パートナーはまた、アガロースビーズ、アクリルビーズ、または他の型のこのような不活性な固相基材への付着によって固定化され得る。基材-タンパク質複合体は、相補性タンパク質および試験化合物を含む溶液内に配置され得る。インキュベーション後、これらのビーズは、遠心分離によって沈澱され得、そして TGF-β-R ポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合の量が、本明細書中に記載の方法を使用して評価され得る。あるいは、基材-タンパク質複合体は、カラム内に固定化され得、試験分子および相補タンパク質がこのカラムを通過する。TGF-β-R ポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成が、次いで、本明細書中に記載の技術（例えば、放射性標識または抗体結合）のいずれかを使用して評価され得る。

30

## 【0189】

TGF-β-R ポリペプチド結合タンパク質と TGF-β-R ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる試験分子を同定するために有用な別のインビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器システム（例えば、BIAcore アッセイシステム（Pharmacia, Piscataway, NJ））である。BIAcore システムは、製造業者によって指定されるように利用される。このアッセイは、本質的に、TGF-β-R ポリペプチドまたは TGF-β-R ポリペプチド結合パートナーのいずれかの、デキストランでコートされたセンサーチップ（これは、検出器に存在する）への共有結合を含む。次いで、この試験化合物および他の相補性タンパク質が、同時に

40

かまたは連続的にかのいずれかで、センサーチップを含むチャンバーに注入され得る。結合する相補性タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコート側面に物理的に結合する分子の質量の変化に基づいて評価され得、この分子の質量の変化は、検出器システムによって測定される。

## 【0190】

いくつかの場合において、2 つ以上の試験化合物と一緒に、TGF-β-R ポリペプチドと TGF-β-R ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させるそれらの能力について評価することが所望され得る。これらの場合において、本明細書中に記載のアッセイは、第一の試験化合物と同時に、またはそれに続いてのいずれかで、このようなさらなる試験化合物を添加することによって容易に改変され得る。このア

50

ッセイにおける残りの工程は、本明細書中に記載される。

【0191】

インビトロアッセイ（例えば、本明細書中に記載されるもの）は、TGF-β-RポリペプチドとTGF-β-Rポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成に対する効果について、多数の化合物をスクリーニングするために、有利に使用され得る。これらのアッセイは、ファージディスプレイ、合成ペプチド、および化学合成ライブラリーにおいて生成された化合物をスクリーニングするために、自動化され得る。

【0192】

TGF-β-RポリペプチドとTGF-β-Rポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる化合物はまた、TGF-β-RポリペプチドまたはTGF-β-Rポリペプチド結合パートナーのいずれかを発現する細胞および細胞株を使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞株は、任意の哺乳動物から得られ得るが、好ましくは、ヒト、または他の霊長類、イヌ類またはげっ歯類の供給源由来である。TGF-β-Rポリペプチドの、TGF-β-Rポリペプチド結合パートナーを発現する細胞への、その表面での結合は、試験分子の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度が、例えば、TGF-β-Rポリペプチド結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイは、本明細書中に記載されるタンパク質結合アッセイにおいて、陽性であるとスコア付けされる化合物をさらに評価するために有利に使用され得る。

【0193】

細胞培養物はまた、薬物候補の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、TGF-β-R遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、生成されるTGF-β-RポリペプチドまたはTGF-β-Rポリペプチドフラグメントの量は、細胞培養物の薬物候補への曝露の後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物に対する薬物候補の実際の影響が検出され得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物に対する特定の影響を有し得る。このような場合に、遺伝子の発現を増加または減少させる薬物候補の能力、または細胞培養物に対する特定の影響を予防または阻害するその能力が試験され得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメント）の生成が、疾患または病的状態を生じ得るか、またはそれらと関連し得る。このような場合、細胞培養物におけるこのような代謝産物の生成を減少する薬物候補の能力が試験され得る。

【0194】

（内部移行タンパク質）

tatタンパク質配列（HIV由来）が、タンパク質を細胞内に内部移行させるために、使用され得る。例えば、Falwellら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91:664-68を参照のこと。例えば、HIV tatタンパク質の11アミノ酸の配列（Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R；配列番号14）（「タンパク質形質導入ドメイン」、またはTAT-PDTと称される）は、細胞の細胞質膜および核膜を横切る送達を媒介するとして記載されている。Schwarzeら、1999、Science 285:1569-72；およびNagaharaら、1998、Nat. Med. 4:1449-52を参照のこと。これらの手順において、FITC構築物（FITC標識G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R；配列番号15）（これは、腹腔内投与後に、組織を貫通する）が調製され、そしてこのような構築物の細胞への結合が、蛍光細胞分析分離（FACS）分析によって検出される。tat-gal融合タンパク質で処理された細胞は、gal活性を示す。注入に続いて、このような構築物の発現が、多くの組織（肝臓、腎臓、肺、心臓および脳組織）において検出され得る。このような構築物は、細胞に入るためにある程度の変性を受け、そしてそれ自体、細胞内への移入後に、再折り畳みを必要とし得ると考えられる。

【0195】

従って、tatタンパク質配列が、所望されるポリペプチドを細胞中に内部移行するため

に用いられ得ることが、理解される。例えば、t a t タンパク質配列を用いて、T G F - R アントゴニスト（例えば、抗 T G F - R 選択的結合因子、低分子、可溶性レセプター、もしくはアンチセンスオリゴヌクレオチド）が、T G F - R 分子の活性を阻害するために細胞内に投与され得る。本明細書中で使用される場合、用語「T G F - R 分子」は、本明細書中で定義される T G F - R 核酸分子および T G F - R ポリペプチドの両方をいう。所望される場合、T G F - R タンパク質自体もまた、これらの手順を用いて細胞に内部的に投与され得る。S t r a u s、1999、S c i e n c e 285:1466-67もまた参照のこと。

#### 【0196】

（T G F - R ポリペプチドを用いる細胞供給源の同定）

本発明の特定の実施形態に従って、T G F - R ポリペプチドと関連する特定の細胞型の供給源を決定し得ることは、有用であり得る。例えば、疾患または病理学的な状態の起源を決定することは、適切な治療の選択における助けとして有用であり得る。特定の実施形態において、T G F - R ポリペプチドをコードする核酸は、そのようなプローブを用いて細胞の核酸をスクリーニングすることによって、本明細書中に記載される細胞を同定するためにプローブとして用いられ得る。他の実施形態において、細胞における T G F - R ポリペプチドの存在について試験するために抗 T G F - R ポリペプチド抗体が用いられ得、従って、このような細胞が本明細書中に記載される型の細胞であるかどうか、決定され得る。

#### 【0197】

（T G F - R ポリペプチド組成物および投与）

治療組成物は、本発明の範囲内である。このような T G F - R ポリペプチド薬学的組成物は、治療有効量の T G F - R ポリペプチドまたは T G F - R 核酸分子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的または生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物中に、含み得る。薬学的組成物は、治療有効量の 1 以上の T G F - R ポリペプチド選択的結合因子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的または生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物中に、含み得る。

#### 【0198】

受容可能な処方物材料は、好ましくは、使用される投薬量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である。

#### 【0199】

薬学的組成物は、例えば、組成物の pH、浸透圧、粘度、清澄性、色、等張性、におい、無菌性、安定性、解離もしくは放出の速度、吸着、または透過を改変、維持または保存するための処方物材料を含み得る。適切な処方物材料としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン）、抗菌剤、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム（s o d i u m h y d r o g e n - s u l f i t e））、緩衝液（例えば、ホウ酸塩、炭酸水素塩、T r i s - H C l、クエン酸塩、リン酸塩、または他の有機酸）、充填剤（b u l k i n g a g e n t）（例えば、マンニトールまたはグリシン）、キレート化剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（E D T A））、錯化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、 $\beta$ -シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン）、充填剤（f i l l e r）、単糖類、二糖類、および他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン）、タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）、着色剤、芳香剤および希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）、保存剤（例えば、塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、または過酸化水素）、溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール）、糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）、懸濁剤、界面活性剤または湿潤剤（例え

10

20

30

40

50

ば、プルロニック (pluronic) ; PEG ; ソルビタンエステル ; ポリソルベート (例えば、ポリソルベート20またはポリソルベート80) ; トリトン ; トロメタミン ; レシチン ; コレステロールまたはチロキサポール (tyloxapal) )、安定性増強剤 (例えば、スクロースまたはソルビトール) 、張度増強剤 (例えば、ハロゲン化アルカリ金属 (好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム) 、またはマンニトール、ソルビトール) 、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または薬学的なアジュバント。Remington's Pharmaceutical Sciences 第18版, A. R. Gennaro 編, Mack Publishing Company 1990を参照のこと。

#### 【0200】

最適な薬学的組成物は、当業者によって、例えば、意図される投与経路、送達形式、および所望の投薬量に依存して決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、前出を参照のこと。このような組成物は、TGF - - R分子の、物理的な状態、安定性、インビボ放出の速度、およびインビボクリアランスの速度に影響し得る。

#### 【0201】

薬学的組成物における主要なビヒクルまたはキャリアは、事実上、水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、注射のために適切なビヒクルまたはキャリアは、水、生理食塩水溶液、または人工脳脊髄液であり得、非経口投与のための組成物において一般的な他の材料で補充され得る。中性の緩衝化生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。他の例示的な薬学的組成物は、約pH7.0~8.5のTris緩衝液または約pH4.0~5.5の酢酸塩緩衝液を含み、これはさらに、ソルビトールまたは適切な代替物を含み得る。本発明の1つの実施形態において、TGF - - Rポリペプチド組成物は、所望の程度の純度を有する選択された組成物を、任意の処方薬剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出) と混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。さらに、TGF - - Rポリペプチド産物は、スクロースのような適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として処方され得る。

#### 【0202】

このTGF - - Rポリペプチドの薬学的組成物は、非経口送達のために選択され得る。あるいは、これらの組成物は、吸入または消化管を介する (例えば、経口的) 送達のために、選択され得る。このような薬学的に受容可能な組成物の調製は、当該分野の技術の範囲内にある。

#### 【0203】

処方成分は、投与の部位に受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝液は、生理学的pHまたはわずかにより低いpH (代表的に、約5~約8のpH範囲内) にこの組成物を維持するために使用される。

#### 【0204】

非経口投与が企図される場合、本発明における使用のための治療組成物は、薬学的に受容可能なビヒクルに所望のTGF - - R分子を含む、発熱物質を含まない非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注射のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、ここで、TGF - - R分子は、滅菌の等張溶液として処方され、適切に保存される。なお別の調製物は、所望の分子と、薬剤 (例えば、注射可能なマイクロスフェア、生体内腐食可能 (bio-erodible) 粒子、ポリマー化合物 (例えば、ポリ乳酸またはポリグリコール酸) 、ビーズまたはリポソーム) との処方物を含み得、これは、次いで蓄積注射を介して送達され得る産物の制御放出または持続放出を提供する。ヒアルロン酸もまた使用され得、そしてこれは、循環における持続時間を促進する効果を有し得る。所望の分子の導入のための他の適切な手段としては、移植可能な薬物送達デバイスが挙げられる。

#### 【0205】

1つの実施形態において、薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、TGF - Rポリペプチドは、吸入のための乾燥粉剤として処方され得る。TGF - RポリペプチドまたはTGF - R核酸分子の吸入溶液はまた、エアロゾル送達のための噴霧剤と共に処方され得る。なお別の実施形態において、溶液は、噴霧され得る。肺投与が、PCT公開番号WO94/20069にさらに記載され、これは化学的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する。

#### 【0206】

特定の処方物が、経口投与され得ることもまた企図される。本発明の1つの実施形態において、この様式で投与されるTGF - Rポリペプチドが、固体投薬形態（例えば、錠剤またはカプセル）の調合において慣用的に使用されるキャリアを伴うか、または伴わずに処方され得る。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化され、そして前全身的分解（pre-systemic degradation）が最小化される場合に、胃腸管内の地点で処方物の活性部分を放出するように設計され得る。さらなる薬剤が、TGF - Rポリペプチドの吸収を容易にするために含まれ得る。希釈剤、芳香剤、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、および結合因子もまた使用され得る。

10

#### 【0207】

別の薬学的組成物は、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤との混合物中に、有効量のTGF - Rポリペプチドを含み得る。錠剤を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することによって、溶液が、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤としては以下が挙げられるが、これらに限定されない：不活性な希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムまたは炭酸水素ナトリウム、ラクトース、あるいはリン酸カルシウム）；または結合因子（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシア）；あるいは潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク）。

20

#### 【0208】

さらなるTGF - Rポリペプチドの薬学的組成物は、当業者に明らかであり、持続送達処方物または制御送達処方物中にTGF - Rポリペプチドを含む処方物を含む。種々の他の持続送達手段または制御送達手段（例えば、リポソームキャリア、生体内腐食可能な微粒子あるいは多孔性ビーズおよび蓄積注射）を処方するための技術もまた、当業者に公知である。例えば、国際出願番号PCT/US93/00829（これは、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー性微粒子の制御放出を記載する）を参照のこと。

30

#### 【0209】

徐放性調製物のさらなる例としては、成形された物品（例えば、フィルム、またはマイクロカプセル）の形態の半透過性ポリマーマトリクスが挙げられる。徐放性マトリクスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号および欧州特許第058481号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートとのコポリマー（Sidmanら, 1983, Biopolymers 22:547-56）、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)（Langerら, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277およびLanger, 1982, Chem. Tech. 12:98-105）、エチレンビニルアセテート（Langerら, 前出）またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許第133988号）が挙げられ得る。徐放性組成物はまた、リポソームを含み得、これは、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る。例えば、Eppsteinら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-92；および欧州特許第036676号、同第088046号、および同第143949号を参照のこと。

40

#### 【0210】

インピボ投与のために使用されるTGF - R薬学的組成物は、代表的に無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を介する濾過によって達成され得る。組成物が凍結乾燥される場合、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構築の前または後のいずれか

50

で実施され得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥された形態または溶液で保存され得る。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器（例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアル）内に配置される。

#### 【0211】

一旦、薬学的組成物が処方されると、それは、滅菌バイアル中に溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水和粉剤もしくは凍結乾燥粉剤として保存され得る。このような処方物は、すぐに使用できる形態または投与の前に再構成を必要とする形態（例えば、凍結乾燥された形態）のいずれかで保存され得る。

#### 【0212】

特定の実施形態において、本発明は、単一用量投与単位を生成するためのキットを指向する。このキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を含み得る。本発明の範囲内には、単一および多チャンバーの予め充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ（*lyosyringe*））を含むキットがまた含まれる。

#### 【0213】

治療的に使用される TGF- $\beta$ 1-R 薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の内容および目的に依存する。従って、当業者は、処置のための適切な投薬レベルが、送達される分子、TGF- $\beta$ 1-R 分子が使用されている指標、投与の経路、および患者のサイズ（体重、体表面、または器官の大きさ）および状態（年齢および全体的な健康）に、部分的に依存して変化することを理解する。従って、臨床医は、最適な治療効果を得るために、投薬量を力価決定し（*titer*）得、投与の経路を改変し得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約  $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 約  $100 \text{mg}/\text{kg}$  以上までの範囲であり得る。他の実施形態において、この投薬量は、 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 約  $100 \text{mg}/\text{kg}$  まで；または  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 約  $100 \text{mg}/\text{kg}$  まで；または  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 約  $100 \text{mg}/\text{kg}$  までの範囲であり得る。

#### 【0214】

投薬の頻度は、使用される処方物中の TGF- $\beta$ 1-R 分子の薬物動態学的パラメーターに依存する。典型的に、臨床医は、所望の効果を達成する投薬量に達するまで組成物を投与する。従って、組成物は、経時的な単一用量として、2 以上の用量（これは、同量の所望される分子を含んでも、含まなくてもよい）として、あるいは移植デバイスまたはカテーテルを介する連続的な注入として、投与され得る。適切な投薬量のさらなる改良は、当業者によって慣用的になされ、そして当業者によって慣用的に実施される作業の範囲内である。適切な投薬量は、適切な用量-応答データの使用を介して確認され得る。

#### 【0215】

薬学的組成物の投与の経路は、以下のような公知の方法と一致する：例えば、経口的に；静脈内、腹腔内、脳内（実質内の）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、または病巣内の経路による注射を介して；徐放性系によって；または移植デバイスによって。所望される場合、これらの組成物は、ポラス注射によって投与され得るか、または注入によって連続的に投与され得るか、あるいは移植デバイスによって投与され得る。

#### 【0216】

あるいはまたはさらに、組成物は、その上に所望の分子が吸収されたかもしくはカプセル化された膜、スポンジ、または他の適切な材料の移植を介して局所的に投与され得る。移植デバイスが使用される場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され得、そして所望の分子の送達は、拡散、時限放出ポラスまたは連続的な投与を介し得る。

#### 【0217】

いくつかの場合において、エキソピボ様式において、TGF- $\beta$ 1-R ポリペプチド薬学的組成物を使用することが所望され得る。このような例において、患者から取り出された細胞、組織、または器官は、これらの細胞、組織、または器官が引き続いて患者に移植し戻

10

20

30

40

50

された後に TGF- $\beta$  - R ポリペプチド薬学的組成物に曝露される。

【0218】

他の場合において、TGF- $\beta$  - R ポリペプチドは、本明細書中に記載されるような方法を使用して、遺伝子操作されて、TGF- $\beta$  - R ポリペプチドを発現および分泌する特定の細胞を移植することによって送達され得る。このような細胞は、動物細胞またはヒト細胞であり得、そして自己、異種、または外因性の細胞であり得る。必要に応じて、この細胞は、不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少するために、細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するために、カプセル化され得る。カプセル化材料は、代表的に、生体適合性の半浸透性ポリマー性包囲物または膜であり、これらは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系または周囲の組織からの他の有害な因子による細胞の破壊を防止する。

10

【0219】

本明細書中に記載される場合、単離された細胞集団（例えば、幹細胞、リンパ球、赤血球、軟骨細胞、ニューロンなど）を1つ以上のTGF- $\beta$  - R ポリペプチドを用いて処置することが所望され得る。これは、単離された細胞を、細胞膜に対して透過性の形態であるポリペプチドに直接曝露することによって達成され得る。

【0220】

本発明のさらなる実施形態は、治療ポリペプチドのインビトロ産生ならびに遺伝子治療または細胞治療による治療ポリペプチドの産生および送達の両方のための、細胞および方法（例えば、相同組換えおよび/または他の組換え産生方法）に関する。相同組換えおよび他の組換え方法は、通常は転写に対してサイレントなTGF- $\beta$  - R 遺伝子または、過少発現される遺伝子を含む細胞を改変するために使用され得、そしてこれによって、治療有効量のTGF- $\beta$  - R ポリペプチドを発現する細胞を産生し得る。

20

【0221】

相同組換えは、もともとは、遺伝子を標的化して転写活性な遺伝子における変異を誘導するか、または修正するために開発された技術である。Kucherlapati, 1989, *Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol.* 36:301。基本的な技術が、特定の変異を哺乳動物ゲノムの特定の領域に導入するため（Thomasら、1986, *Cell* 44:419-28; ThomasおよびCapecci, 1987, *Cell* 51:503-12; Doetschmanら、1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8583-87）、または欠損遺伝子内の特定の変異を修正するため（Doetschmanら、1987, *Nature* 330:576-78）の方法として、開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5,272,071号；欧州特許第9193051号、および同第505500号；国際出願番号PCT/US90/07642、ならびに国際公開番号WO 91/09955に記載される。

30

【0222】

相同組換えを介して、ゲノムに挿入されるべきDNA配列は、それを標的化DNAに付着させることによって、目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。この標的化DNAは、ゲノムDNAの領域に相補的な（相同な）ヌクレオチド配列である。ゲノムの特定の領域に相補的な標的化DNAの小さな断片は、DNA複製プロセスの間に、親鎖と接触させられる。これは、細胞に挿入されてハイブリダイズするDNAの一般的な特性であり、そしてそれ故、共有される相同領域を介して、内因性DNAの他の断片と組換わる。この相補鎖が、変異もしくは異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに付着される場合、これもまた、組換えの結果として新たに合成された鎖に組み込まれる。ブルーフリーディング機能の結果として、DNAの新たな配列がテンプレートとして作用することが可能である。従って、転移されたDNAは、ゲノムに組み込まれる。

40

【0223】

TGF- $\beta$  - R ポリペプチドと相互作用し得るかまたはTGF- $\beta$  - R の発現を制御し得るDNAの領域（例えば、隣接配列）が、標的化DNAのこれらの断片に付着する。例え

50

ば、プロモーター/エンハンサーエレメント、サプレッサー、または外因性転写調節エレメントが、意図される宿主細胞のゲノムに、所望の TGF-β-R ポリペプチドをコードする DNA の転写に影響を与えるに十分な近位および配向で、挿入される。制御エレメントは、この宿主細胞ゲノムに存在する DNA の部分を制御する。従って、所望の TGF-β-R ポリペプチドの発現は、TGF-β-R 遺伝子自体をコードする DNA のトランスフェクションによってではなく、むしろ、TGF-β-R 遺伝子の転写のための認識可能なシグナルを有する内因性遺伝子配列を提供する DNA 調節セグメントと結合した標的化 DNA (目的の内因性遺伝子と相同の領域を含む) の使用によって、達成され得る。

#### 【0224】

例示的な方法において、細胞における所望の標的遺伝子(すなわち、所望の内因性細胞遺伝子)の発現は、予め選択された部位における細胞ゲノムへの相同組換えを介して、少なくとも調節配列、エキソン、およびスプライスドナー部位を含む DNA の導入によって、変更される。これらの構成成分は、新たな転写ユニットの産生を実際に生じるような様式で、染色体(ゲノム)DNAに導入される(ここで、DNA構築物に存在する調節配列、エキソン、およびスプライスドナー部位は、内因性遺伝子に作動可能に連結する)。染色体DNAへのこれらの構成成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変化する。

10

#### 【0225】

本明細書中で記載されるように、変化された遺伝子発現は、通常は得られたままの細胞においてサイレントな(発現されていない)遺伝子の活性化(または発現させる)、ならびに得られたままの細胞において生理学的に有意なレベルでは発現されない遺伝子の発現の増加を包含する。この実施形態はさらに、調節または誘導のパターンの変化させる工程を包含し、その結果、これは、得られたままの細胞において生じる調節または誘導のパターンとは異なり、そして得られたままの細胞において発現される遺伝子の発現を減少(排除を含む)させる。

20

#### 【0226】

細胞の内在性 TGF-β-R 遺伝子からの TGF-β-R ポリペプチドの産生を増加するかまたはこれを引き起こすために相同組換えが使用され得る1つの方法は、最初に、相同性組換えを使用して、部位特異的組換え系由来の組換え配列(例えば、Cre/loxP、FLP/FRT)(Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5: 521-27; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225: 890-900)を、細胞の内在性ゲノム TGF-β-R ポリペプチドコード領域の上流(すなわち、5')に配置する工程を包含する。ゲノム TGF-β-R ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された部位に対して相同性の組換え部位を含むプラスミドは、適切なリコンビナーゼ酵素と共に、改変された細胞株に導入される。このリコンビナーゼによって、プラスミドは、このプラスミドの組換え部位を介して、この細胞株のゲノム TGF-β-R ポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位に組込まれる(Baubonis および Sauer, 1993, Nucleic Acids Res., 21: 2025-29; O'Gormanら、1991, Science 251: 1351-55)。転写を増加させることが知られている任意の側方配列(例えば、エンハンサー/プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー)は、このプラスミド中に適切に配置される場合、細胞の内在性 TGF-β-R 遺伝子からの、デノボまたは増加した TGF-β-R ポリペプチド産生を生じる、新たなまたは改変された転写単位を作製するような様式で一体化する。

30

40

#### 【0227】

部位特異的組換え配列が細胞の内在性ゲノム TGF-β-R ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された細胞株を使用するさらなる方法は、細胞株のゲノムの他の位置に第2の組換え部位を導入するために相同性組換えを使用することである。適切な組換え酵素は、次いで、二組換え部位細胞株に導入され、組換え現象(欠失、転化、および転移)を生じ(Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5: 521-

50

27; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225: 890-900)、これは、細胞の内在性 TGF-β-R 遺伝子からの、デノボまたは増加した TGF-β-R ポリペプチド産生を生じる新しいかまたは改変された転写ユニットを作製する。

【0228】

細胞の内在性 TGF-β-R 遺伝子からの TGF-β-R ポリペプチドの発現を増加するため、または引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内在性 TGF-β-R 遺伝子からの、デノボまたは増加した TGF-β-R ポリペプチドの産生を生じる様式で、遺伝子（単数または複数）（例えば、転写因子）の発現を増加するかまたは引き起こし、そして/または遺伝子（単数または複数）（例えば、転写リプレッサ）の発現を減少する工程を包含する。この方法は、天然に存在しないポリペプチド（例えば、転写因子ドメインに融合した部位特異的 DNA 結合ドメインを含むポリペプチド）を、細胞の内在性 TGF-β-R 遺伝子からの、デノボまたは増加した TGF-β-R ポリペプチドの産生が起こるように、細胞に導入する工程を包含する。

10

【0229】

本発明はさらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用な DNA 構築物に関する。特定の実施形態において、代表的な DNA 構築物は、以下を含む：(a) 1つ以上の標的配列、(b) 調節配列、(c) エキソン、および (d) 不対スプライスドナー部位。DNA 構築物中の標的配列は、エレメント (a) ~ (d) の細胞中の標的遺伝子への組込みを指向し、その結果、これらのエレメント (b) ~ (d) は、内在性標的遺伝子の配列に作動可能に連結される。別の実施形態において、DNA 構築物は、以下を含む：(a) 1つ以上の標的配列、(b) 調節配列、(c) エキソン、(d) スプライスドナー部位、(e) イントロン、および (f) スプライスアクセプター部位。ここで、標的配列は、エレメント (a) ~ (f) の組込みを指向し、その結果、これらのエレメント (b) ~ (f) は、内在性遺伝子に作動可能に連結される。標的配列は、相同性組換えが生じる細胞染色体 DNA の予め選択された部位に対して相同性である。この構築物において、エキソンは、一般的に、調節配列の 3' 側であり、そしてスプライスドナー部位は、このエキソンの 3' 側である。

20

【0230】

特定の遺伝子の配列（例えば、本明細書中で記載される TGF-β-R ポリペプチドの核酸配列）が公知である場合、遺伝子の選択された領域に対して相補的な DNA の部分は、合成されるか、またはそうでなければ、例えば、目的の領域に結合している特定の認識部位におけるネイティブの DNA の適切な制限等によって得られ得る。この部分は、細胞に挿入された際に、標的配列として働き、そしてそのゲノム内の相同性領域にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションが、DNA 複製の間に生じる場合、この DNA の部分、およびそれに結合した任意のさらなる配列は、Okazaki フラグメントとして作用し、そして DNA の新たに合成された娘鎖に組み込まれる。従って、本発明は、TGF-β-R ポリペプチドをコードするヌクレオチドを含み、このヌクレオチドは、標的配列として使用され得る。

30

【0231】

TGF-β-R ポリペプチド細胞治療（例えば、TGF-β-R ポリペプチドを産生する細胞の移植）もまた意図される。この実施形態は、TGF-β-R ポリペプチドの生物学的に活性な形態を合成および分泌し得る細胞を移植する工程を包含する。このような TGF-β-R ポリペプチド産生細胞は、TGF-β-R ポリペプチドの天然プロデューサーである細胞であり得るか、または組換え細胞であって、その TGF-β-R ポリペプチドを産生する能力が、所望の TGF-β-R ポリペプチドをコードする遺伝子または TGF-β-R ポリペプチドの発現を増大する遺伝子で形質転換することによって増大された、組換え細胞であり得る。このような改変は、遺伝子を送達し、その発現および分泌を促進するために適切なベクターによって達成され得る。TGF-β-R ポリペプチドを投与されている患者における強力な免疫学的反応を最小化するために、異種のポリペプチドの投

40

50

与と共に生じる場合、TGF-β-Rポリペプチドを産生する天然の細胞が、ヒト起源であり、そしてヒトTGF-β-Rポリペプチドを産生することが好ましい。同様に、TGF-β-Rポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒトTGF-β-Rポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが好ましい。

#### 【0232】

移植細胞は、周辺組織の浸透を回避するようにカプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物細胞は、生体適合性の半透性ポリマー封入物または膜（これは、TGF-β-Rポリペプチドの放出を可能にするが、患者の免疫系または周辺組織からの他の有害な因子による細胞の崩壊を防止する）の形態で患者に移植され得る。あるいは、TGF-β-Rポリペプチドをエキソビボで産生するように形質転換された患者自身の細胞が、このようなカプセル化なしで、患者に直接移植され得る。

10

#### 【0233】

生きた細胞をカプセル化するための技術は当該分野で公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製およびそれらの患者への移植は、慣用的に達成され得る。例えば、Baetgeら（国際公開番号WO95/05452および国際出願番号PCT/US94/09299）は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のために遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。このカプセルは、生体適合性であり、そして容易に取り出し可能である。このカプセルは、哺乳動物宿主に移植された際に、インビボで下方制御に供されないプロモーターに作動可能に連結された生物学的に活性な分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化する。このデバイスは、生きた細胞からレシピエント内の特定の部位への分子の送達を提供する。さらに、米国特許第4,892,538号；同第5,011,472号；および同第5,106,627号を参照のこと。生きた細胞をカプセル化するためのシステムは、国際公開番号WO91/10425（Aebischerら）に記載される。国際公開番号WO91/10470（Aebischerら）；Winnら、1991, *Exper. Neurol.* 113:322-29；Aebischerら、1991, *Exper. Neurol.* 111:269-75；およびTrescoら、1992, *ASAIO* 38:17-23もまた参照のこと。

20

#### 【0234】

TGF-β-Rポリペプチドのインビボおよびインビトロの遺伝子治療送達もまた想定される。遺伝子治療技術の一例は、構成的または誘発性プロモーターに作動可能に連結され得るTGF-β-RポリペプチドをコードするTGF-β-R遺伝子（ゲノムDNA、cDNAおよび/または合成DNAのいずれか）を使用して、「遺伝子治療DNA構築物」を形成することである。このプロモーターは、内在性TGF-β-R遺伝子に対して相同であるかまたは異種であり得るが、ただし、これは、構築物が挿入される細胞または組織型において活性である。遺伝子治療DNA構築物の他の成分は、必要に応じて、部位特異的組込みのために設計されるDNA分子（例えば、相同性組換えのために有用な内在性配列）、組織特異的プロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親細胞を越える選択的優性を提供し得るDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子（例えば、細胞標的化について）、細胞特異的內部移行因子、ベクターからの発現を増大する転写因子、およびベクターの産生を可能にする因子を含む。

30

40

#### 【0235】

遺伝子治療DNA構築物は、次いで、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを使用して細胞に導入され得る（エキソビボまたはインビボのいずれか）。遺伝子治療DNA構築物を導入するための1つの方法は、本明細書中に記載されるようなウイルスベクターの使用による。特定のベクター（例えば、レトロウイルスベクター）は、DNA構築物を細胞の染色体DNAに送達し、そしてこの遺伝子は、染色体DNAに組み込まれ得る。他のベクターは、エピソームとして機能し、そして遺伝子治療DNA構築物は、細胞質に残る。

50

## 【0236】

さらに他の実施形態において、調節エレメントが、標的細胞におけるTGF-β-R遺伝子の制御された発現のために含められ得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターに応答して刺激される。このようにして、治療的ポリペプチドは、所望の場合に発現され得る。1つの従来の制御手段は、低分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始し得るドメインを含むキメラタンパク質（例えば、DNA結合タンパク質または転写活性タンパク質）を二量化する低分子二量化剤またはラパログ（rapalog）の使用を包含する（国際公開番号WO96/41865、WO97/31898およびWO97/31899を参照のこと）。タンパク質の二量化は、導入遺伝子の転写を開始するために使用され得る。

10

## 【0237】

代替の調節技術は、目的の遺伝子から発現されたタンパク質を、凝集体またはクラスターとして細胞の内側に貯蔵する方法を使用する。目的の遺伝子は、小胞体における凝集タンパク質の保持を生じる、条件的凝集ドメインを含む融合タンパク質として発現される。貯蔵されたタンパク質は安定であり、そして細胞の内側で不活性である。しかし、このタンパク質は、条件的凝集ドメインを除去する薬物（例えば、低分子リガンド）を投与することによって放出され得、それにより、凝集体またはクラスターを特異的に破壊し、その結果、このタンパク質は細胞から分泌され得る。Aridorら、2000、Science 287: 816-17およびRiveraら、2000、Science 287: 826-30を参照のこと。

20

## 【0238】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、本明細書中で記載される系が挙げられるが、これらに限定されない。Mifepristone（RU486）は、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインのプロゲステロンアンタゴニストへの結合は、2つの転写因子のダイマーを形成することによって転写を活性化し、次いで、核に至り、DNAに結合する。このリガンド結合ドメインは、天然のリガンドに結合するレセプターの能力を排除するように改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系はさらに、米国特許第5,364,791号、ならびに国際公開番号WO96/40911およびWO97/10337に記載される。

30

## 【0239】

さらに別の制御系は、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合し、そしてこれを活性化するエクジソン（ショウジョウバエステロイドホルモン）を使用する。次いで、このレセプターは核に転移し、特定のDNA応答エレメント（エクジソン応答性遺伝子由来のプロモーター）に結合する。エクジソンレセプターは、トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、およびリガンド結合ドメインを含み、転写を開始する。エクジソン系はさらに、米国特許第5,514,578、および国際公開番号WO97/38117、WO96/37609、およびWO93/03162に記載される。

## 【0240】

別の制御手段は、陽性テトラサイクリン制御可能トランス活性化因子を使用する。この系は、転写を活性化するポリペプチドに連結された、変異したtetレプレッサタンパク質DNA結合ドメイン（逆テトラサイクリン調節トランス活性化因子タンパク質を生じた変異したtetR-4アミノ酸の変化、すなわち、これは、テトラサイクリンの存在下でtetオペレーターに結合する）を含む。このような系は、米国特許第5,464,758号、同第5,650,298号、および同第5,654,168号に記載される。

40

## 【0241】

さらなる発現制御系および核酸構築物は、米国特許第5,741,679号および同第5,834,186号（Innovir Laboratories Inc.）に記載される。

## 【0242】

50

インビボの遺伝子治療は、TGF-β-Rポリペプチドをコードする遺伝子を、TGF-β-R核酸分子の局所的な注射を介して、または他の適切なウイルスもしくは非ウイルス送達ベクターによって、細胞に導入することによって達成され得る。Heflitz、1994、Neurobiology、25:1418-35。例えば、TGF-β-Rポリペプチドをコードする核酸分子は、標的細胞への送達のためのアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター中に含まれ得る(例えば、Johnson、国際公開番号WO95/34670;国際出願番号PCT/US95/07178)。組換えAAVゲノムは、代表的には、機能的プロモーターおよびポリアデニル化配列に作動可能に連結したTGF-β-RポリペプチドをコードするDNA配列に隣接する、AAV逆方向末端反復を含む。

#### 【0243】

代替の適切なウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、単純疱疹ウイルス、レンチウイルス、肝炎ウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、およびパピロマウイルスのベクターが挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第5,672,344号は、組換え神経栄養性HSV-1ベクターを含むインビボのウイルス媒介遺伝子移入系を記載する。米国特許第5,399,346号は、治療的タンパク質をコードするDNAセグメントを挿入するためにインビトロで処理されたヒト細胞の送達によって、治療的タンパク質を患者に提供するためのプロセスの例を提供する。遺伝子治療技術の実行のためのさらなる方法および材料は、アデノウイルスベクターに関する米国特許第5,631,236号;レトロウイルスベクターに関する米国特許第5,672,510号;およびサイトカインを発現するレトロウイルスベクターに関する米国特許第5,635,399号に記載される。

#### 【0244】

非ウイルス送達方法は、リポソーム媒介移入、裸のDNAの送達(直接注射)、レセプター媒介移入(リガンド-DNA複合体)、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、および微粒子ボンバードメント(例えば、遺伝子銃)が挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子治療の材料および方法としてはまた、誘導性プロモーター、組織特異的エンハンサー-プロモーター、部位特異的組み込みのために設計されたDNA配列、親細胞を超えて選択的利点を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ選択系および発現制御系(安全な測定)、細胞特異的結合剤(細胞標的化のための)、細胞特異的内在化因子、ならびにベクターによる発現を増強する転写因子の利用、そしてベクター製造のための方法が挙げられ得る。遺伝子治療技術の実行のためのこのようなさらなる方法および材料は、エレクトロポレーション技術に関する米国特許第4,970,154号;遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する米国特許第5,679,559号;リポソームキャリアに関する米国特許第5,676,954号;リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法に関する米国特許第5,593,875号;米国特許第4,945,050号(ここで、生物学的に活性な粒子が、ある速度で細胞に噴射され、それによってこの粒子は細胞の表面を貫通し、そして細胞内部に取り込まれる)および核リガンドに関する国際公開番号WO96/40958に記載される。

#### 【0245】

TGF-β-R遺伝子治療または細胞治療はさらに、同じ細胞または異なる細胞において1以上のさらなるポリペプチドの送達を含み得ることがまた意図される。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、またはこれらの細胞は、単一の移植可能なデバイス(例えば、上記のようなカプセル化膜)中に含まれ得るか、またはこれらの細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

#### 【0246】

遺伝子治療を介して、細胞における内在性のTGF-β-Rポリペプチド発現を増大させる手段は、TGF-β-Rポリペプチドプロモーター中に1以上のエンハンサーエレメントを挿入することであり、ここで、このエンハンサーエレメントは、TGF-β-R遺伝子の転写活性を増大するように作用し得る。使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝

10

20

30

40

50

子を活性化することが所望される組織に基づいて選択される；この組織においてプロモーターの活性化を与えることが公知のエンハンサーエレメントが、選択される。例えば、TGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドをコードする遺伝子が、T細胞において「オンにされる」場合、Ickプロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、添加されるべき転写エレメントの機能的部分は、標準的なクローニング技術を使用して、TGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドプロモーターを含むDNAのフラグメント中に挿入され得る（そして必要に応じて、ベクターならびに5'隣接配列および/もしくは3'隣接配列などの中に挿入される）。次いで、「相同組換え構築物」として公知のこの構築物は、エキソビボまたはインビボのいずれかで所望の細胞に導入され得る。

#### 【0247】

遺伝子治療はまた、内在性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによってTGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドの発現を減少させるために使用され得る。このような改変は、代表的には、相同組換え方法を介して達成される。例えば、不活化のために選択されたTGF- $\beta$ 1-R遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含むDNA分子は、転写を調節するプロモーターの断片を除去および/または置換するように操作され得る。例えば、TATAボックスおよび/またはプロモーターの転写活性化因子の結合部位は、標準的な分子生物学的技術を使用して欠失され得る；このような欠失は、プロモーターの活性を阻害し得、それによって対応するTGF- $\beta$ 1-R遺伝子の転写を抑制する。TATAボックスまたはプロモーターの転写活性化因子結合部位の欠失は、TGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドプロモーター（調節されるべきTGF- $\beta$ 1-R遺伝子と同種または関連の種由来の）の全てまたは関連部分を含むDNA構築物を生成することによって達成され得、ここで、TATAボックスおよび/または転写活性化因子結合部位のヌクレオチドの1以上は、1以上のヌクレオチドの置換、欠失および/または挿入を介して変異される。結果として、TATAボックスおよび/または活性化因子結合部位は、活性を減少させるかまたは完全に不活化される。この構築物は、代表的には、改変されたプロモーターセグメントに隣接するネイティブな（内在性の）5'および3'DNA配列に対応するDNAの少なくとも約500塩基を含む。この構築物は、適切な細胞中に（エキソビボまたはインビボのいずれかで）、直接または本明細書中に記載のウイルスベクターを介してかのいずれかで導入され得る。代表的には、細胞のゲノムDNAへの構築物の組み込みは、相同組換えを介してであり、ここで、プロモーター構築物の5'および3'DNA配列は、内在性の染色体DNAに対するハイブリダイゼーションを介して改変されたプロモーター領域を組み込む際の補助として役立ち得る。

#### 【0248】

（治療的使用）

TGF- $\beta$ 1-R核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストは、多くの疾患、障害、または状態（本発明中に列挙されるものを含む）を処置、診断、改善または予防するために使用され得る。

#### 【0249】

TGF- $\beta$ 1-RポリペプチドアゴニストおよびTGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドアンタゴニストとしては、TGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドの活性を調節し、そしてTGF- $\beta$ 1-Rポリペプチド成熟形態の少なくとも1つの活性を増加または減少させる分子が挙げられる。アゴニストまたはアンタゴニストは、コファクター（例えば、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量分子）であり得、TGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドと相互作用し、それによりTGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドの活性を調節する。潜在的なポリペプチドアゴニストまたはポリペプチドアンタゴニストとしては、TGF- $\beta$ 1-Rタンパク質の細胞外ドメインの一部または全てを含む、可溶性または膜結合形態のいずれかのTGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドと反応する抗体が挙げられる。TGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドの発現を調節する分子としては、代表的に、発現のアンチセンスレギュレーターとして作用し得る、TGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。

#### 【0250】

10

20

30

40

50

配列分析は、本発明の TGF- $\beta$  R ポリペプチドが、ヒト増殖分化因子-3 (GDF-3) およびマウス増殖分化因子-3 (GDF-3) と最大程度の類似性を共有することを示した。この配列類似性は、本発明の TGF- $\beta$  R ポリペプチドが TGF- $\beta$  ファミリーの新規メンバーであることを示唆する。この類似性は、さらに、TGF- $\beta$  R ポリペプチド、TGF- $\beta$  R フラグメント、TGF- $\beta$  R 変体、TGF- $\beta$  R 誘導体、および/または TGF- $\beta$  R アンタゴニストが、TGF- $\beta$  に関連した、疾患、障害、または状態を、処置、診断、改善、または予防するために用いられ得ることを示唆する。それゆえ、TGF- $\beta$  R ポリペプチド、TGF- $\beta$  R フラグメント、TGF- $\beta$  R 変体、TGF- $\beta$  R 誘導体、および/または TGF- $\beta$  R アンタゴニストは、軟骨、骨、歯、または他の組織（例えば、腎臓または肝臓）の変性障害を予防または処置するため；移植における臓器拒絶を予防するため（免疫系サプレッサーとして）；胃潰瘍または十二指腸潰瘍を処置するため；創傷治癒を促進するため；やけどを処置するため；組織修復を促進するため；腫瘍増殖を抑制するため（特定足場依存性細胞を阻害することによって）；または正常に機能しない受胎能を処置するために用いられ得る（あるいは、TGF- $\beta$  R ポリペプチド、TGF- $\beta$  R フラグメント、TGF- $\beta$  R 変体、および/または TGF- $\beta$  R 誘導体は、避妊薬として用いられ得る）。TGF- $\beta$  R ポリペプチド、TGF- $\beta$  R フラグメント、TGF- $\beta$  R 変体、TGF- $\beta$  R 誘導体および/または TGF- $\beta$  R アンタゴニストはまた、骨髄保護剤；抗炎症薬剤；心臓保護のメディエータ、または TGF- $\beta$  依存性腫瘍のアンタゴニストとして用いられ得る。

10

20

#### 【0251】

TGF- $\beta$  R ポリペプチド機能のアゴニストまたはアンタゴニストは、処置される状態に適するように、1つ以上のサイトカイン、増殖因子、抗性物質、抗炎症剤性薬剤および/または化学療法の薬剤と組み合わせて（同時にあるいは連続して）用いられ得る。

#### 【0252】

望ましくないレベルの TGF- $\beta$  R ポリペプチドによって引き起こされるかまたは媒介される他の疾患または障害は、本発明の範囲内に含まれる。望ましくないレベルとしては、TGF- $\beta$  R ポリペプチドの過剰レベルおよび TGF- $\beta$  R ポリペプチドの正常以下レベルが挙げられる。

#### 【0253】

（TGF- $\beta$  R 核酸およびポリペプチドの使用）

本発明の核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）は、染色体上で TGF- $\beta$  R 遺伝子および関連遺伝子の位置をマッピングするために使用され得る。マッピングは、当該分野において公知の技術（例えば、PCR 増幅およびインサイチュハイブリダイゼーション）によってなされ得る。

30

#### 【0254】

TGF- $\beta$  R 核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）は、定量的にまたは定性的にのいずれかで、哺乳動物の組織サンプルまたは体液サンプルにおける TGF- $\beta$  R 核酸分子の存在を試験するための診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

#### 【0255】

1以上の TGF- $\beta$  R ポリペプチドの活性を阻害することが所望される場合、他の方法もまた使用され得る。このような阻害は、発現制御配列（三重らせん形成）または TGF- $\beta$  R mRNA に相補的であり、かつハイブリダイズする核酸分子によってもたらされ得る。例えば、TGF- $\beta$  R 遺伝子の少なくとも一部に対して相補的な配列を有するアンチセンス DNA または アンチセンス RNA 分子が、細胞に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示される TGF- $\beta$  R 遺伝子の配列を使用して、利用可能な技術によって設計され得る。代表的には、このようなアンチセンス分子の各々は、選択された各々の TGF- $\beta$  R 遺伝子の開始部位（5' 末端）に相補的である。次いで、このアンチセンス分子が、対応する TGF- $\beta$  R mRNA にハイブリダイズする場合、この mRNA の翻訳は阻止されるかまたは減少される。アンチセンスインヒビターは、

40

50

細胞または生物体における TGF- $\beta$  - R ポリペプチドの減少または非存在に関連する情報を提供する。

【0256】

あるいは、遺伝子治療は、1以上の TGF- $\beta$  - R ポリペプチドのドミナントネガティブなインヒビターを作製するために使用され得る。この状況において、選択された各々の TGF- $\beta$  - R ポリペプチドの変異体ポリペプチドをコードする DNA が、調製され得、本明細書中に記載のウイルスによる方法またはウイルスによらない方法のいずれかを使用して患者の細胞に導入され得る。このような変異体の各々は、代表的には、その生物学的役割において内在性ポリペプチドと競合するように設計される。

【0257】

さらに、生物学的に活性であるか否かにかかわらず、TGF- $\beta$  - R ポリペプチドは、免疫原、すなわち、抗体を惹起し得る少なくとも1つのエピトープを含むポリペプチドとして使用され得る。TGF- $\beta$  - R ポリペプチド（本明細書中に記載のような）に結合する選択的結合因子は、インビボおよびインビトロでの診断目的のために使用され得、体液または細胞サンプル中で TGF- $\beta$  - R ポリペプチドの存在を検出するための標識形態での使用を含むが、これに限定されない。これらの抗体はまた、多くの疾患および障害（本明細書中で列挙したものを含む）を予防、処置、または診断するために使用され得る。これらの抗体は、TGF- $\beta$  - R ポリペプチドに特徴的な活性の少なくとも1つを減少させるかまたはブロックするように、TGF- $\beta$  - R ポリペプチドに結合し得るか、あるいは、TGF- $\beta$  - R ポリペプチドに特徴的な活性の少なくとも1つを増大するためにポリペプチドに結合し得る（TGF- $\beta$  - R ポリペプチドの薬物動態を増大させることによるものを含む）。

【0258】

本発明の TGF- $\beta$  - R ポリペプチドは、発現クローニングストラテジーを用いて TGF- $\beta$  - R ポリペプチドレセプターをクローニングするために使用され得る。放射線標識（<sup>125</sup>ヨウ素）TGF- $\beta$  - R ポリペプチドまたは親和性/活性-タグ化 TGF- $\beta$  - R ポリペプチド（例えば、Fc 融合物またはアルカリホスファターゼ融合物）を結合アッセイに用いて、TGF- $\beta$  - R ポリペプチドレセプターを発現する細胞型または細胞株または組織を同定し得る。このような細胞または組織から単離された RNA は、cDNA に変換され、哺乳動物発現ベクター中にクローン化され、そして哺乳動物細胞（例えば、COS、または 293 細胞）中にトランスフェクトされて、発現ライブラリーを生成し得る。次いで、放射線標識化またはタグ化された TGF- $\beta$  - R ポリペプチドを親和性リガンドとして用いて、表面上に TGF- $\beta$  - R ポリペプチドレセプターを発現する細胞のサブセットをこのライブラリーから同定し得、そして単離し得る。次いで、DNA が、これらの細胞から単離され、哺乳動物細胞中にトランスフェクトされて、TGF- $\beta$  - R ポリペプチドレセプターを発現する細胞の画分がもとのライブラリーよりも何倍も高い、2次発現ライブラリーを生成し得る。この富化プロセスは、TGF- $\beta$  - R ポリペプチドレセプターを含む単一組換えクローンが単離されるまで、何度も反復され得る。TGF- $\beta$  - R ポリペプチドレセプターの単離は、TGF- $\beta$  - R ポリペプチドシグナル伝達経路の新規アゴニストおよび新規アンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性 TGF- $\beta$  - R ポリペプチドレセプター、抗 TGF- $\beta$  - R ポリペプチドレセプター抗体、低分子、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。そしてこれらは、本明細書中に記載される1つ以上の疾患または障害を処置、予防または診断するために使用され得る。

【0259】

本発明のヒト TGF- $\beta$  - R 核酸はまた、対応する染色体 TGF- $\beta$  - R ポリペプチド遺伝子を単離するために有用なツールである。ヒト TGF- $\beta$  - R ゲノム DNA は、遺伝性の組織変性疾患を同定するために用いられ得る。

【0260】

受託番号 PTA - 2665 または PTA - 2666 を有する、ヒト TGF- $\beta$  - R ポリペ

10

20

30

40

50

ブチドのアイソフォーム1およびアイソフォーム2をコードするcDNA (pGEMTeasyベクターにサブクローニングされている)の寄託を、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に2000年11月10日付で行った。

【0261】

以下の実施例は、例示目的のみを意図しており、いかようにも本発明の範囲を限定するものであると解釈されるべきではない。

【0262】

(実施例1)

(ヒトTGF-β-Rポリペプチド遺伝子のクローニング)

一般に、Sambrookら(前出)に記載される材料および方法を、ヒトTGF-β-Rポリペプチドをコードする遺伝子をクローニングし、そして分析するために使用した。

【0263】

ヒトTGF-β-R遺伝子のアイソフォーム1の部分的転写物は、ヒトゲノムクローン(Celera Genomics, Rockville, MD; GA\_6739417)に由来した。全長ヒトTGF-β-R cDNA配列を得るために、部分的転写物の5'末端および3'末端に対応するいくつかのPCRプライマー(アンプライマー)が、様々なcDNAライブラリーのPCR増幅における使用のために設計された。アンプライマー2445-27(5'-C-T-C-A-T-A-T-T-C-A-A-A-A-T-C-A-G-A-G-G-G-A-G-G-G-3';配列番号16)、2445-28(5'-GT-T-T-A-C-T-C-A-C-G-T-A-T-T-G-G-A-T-G-G-A-G-G-T-G-3';配列番号17)、2445-29(5'-C-T-C-T-A-A-T-G-T-G-G-A-G-C-A-G-C-T-G-A-T-C-3';配列番号18)、および2450-21(5'-C-A-G-C-A-G-A-G-A-A-G-C-T-C-T-G-C-C-A-T-C-T-G-C-3';配列番号19)は、部分的転写物の5'側に対応する。アンプライマー2445-30(5'-G-A-G-C-A-G-C-C-A-C-A-C-G-G-G-T-T-C-T-C-C-A-C-C-A-A-G-3';配列番号20)、2445-31(5'-G-A-A-G-T-G-T-T-C-A-C-A-T-A-G-T-G-C-A-C-A-C-T-C-3';配列番号21)、2445-32(5'-C-T-C-A-T-C-T-T-G-T-G-T-T-C-G-T-C-A-T-C-C-T-G-3';配列番号22)および2445-22(5'-G-A-C-C-A-T-C-A-G-G-G-A-G-A-A-G-A-G-T-C-T-G-A-C-3';配列番号23)は、部分的転写物の3'側に対応する。

【0264】

次に、PCR増幅を、製造メーカーの推奨する手順に従って、鋳型として50ngのcDNA(専売のヒト組織cDNAライブラリーの77つのうちの1つから得られる)、適切な5'アンプライマーおよび3'アンプライマーの各々5pmol、およびReady-To-Go PCR Beads(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)を用いて実行した。反応は、94℃で1分を1サイクル;(94℃で15秒、62℃で30秒、72℃で1分)を40サイクル;および72℃で7分を1サイクルで実行した。339塩基対のPCR産物が、アンプライマー2445-29および2445-32と、胎児卵巣cDNAライブラリー鋳型または胎児皮膚cDNAライブラリー鋳型のいずれかとを含む増幅反応において得られた。

【0265】

ヒトTGF-β-Rポリペプチドの全長cDNA配列を単離するために、5'-RACEおよび3'-RACEを、Advantage-High Fidelity 2 PCR kit(Clontech)、胎児卵巣cDNAライブラリーまたは胎児皮膚cDNAライブラリーのいずれか50ng、「タッチダウン」PCRプロトコール(Donら、

10

20

30

40

50

1991, *Nucleic Acids Res.* 19:4008) を用いて実行した。5' - RACE 反応を、アンプライマー 2445-32 および 1916-83 (5' - G - G - C - T - C - G - T - A - T - G - T - T - G - T - G - T - G - G - A - A - T - T - G - T - G - A - G - C - G - 3' ; 配列番号 24) の 10 pmol を使用して実行した (後者のアンプライマーは、cDNA ライブラリー (pSPORT) を構築するために用いられたベクターの核酸配列に対応する)。3' - RACE 反応を、アンプライマー 2445-29 および 1916-80 (5' - T - G - C - A - A - G - G - C - G - A - T - T - A - A - G - T - T - G - G - G - T - A - A - C - G - C - C - A - G - 3' ; 配列番号 25) の 10 pmol を使用して実行した (後者のアンプライマーは、pSPORT の核酸配列に対応する)。反応を、94 で 2 分を 1 サイクル; (94 で 5 秒および 72 で 4 分) を 5 サイクル; (94 で 5 秒および 69 で 4 分) を 5 サイクル; (94 で 5 秒および 67 で 4 分) を 25 サイクル; および 72 で 7 分を 1 サイクルで実行した。

【0266】

5' - RACE および 3' - RACE の後、ネスト PCR を、Advantage - High Fidelity 2 PCR kit、1:50 に希釈した 1 回目の 5' - RACE 増幅産物または 3' - RACE 増幅産物の 10  $\mu$ l、およびアンプライマーの適切な対を用い、50  $\mu$ l の容積において実行した。5' - RACE 産物の増幅のために、アンプライマー 2450-22 および 1916-82 (5' - C - A - T - G - A - T - T - A - C - G - C - C - A - A - G - C - T - C - T - A - A - T - A - C - G - A - C - T - C - 3' ; 配列番号 26) を使用した。3' - RACE 産物の増幅のために、アンプライマー 2450-21 および 1916-81 (5' - T - C - A - C - G - A - C - G - T - T - G - T - A - A - A - A - C - G - A - C - G - G - C - C - A - G - T - G - 3' ; 配列番号 27) を使用した。反応を、94 で 2 分を 1 サイクル; (94 で 5 秒および 72 で 4 分) を 5 サイクル; (94 で 5 秒および 70 で 4 分) を 5 サイクル; (94 で 5 秒および 68 で 4 分) を 25 サイクル; および 72 で 7 分を 1 サイクルで実行した。1% アガロースゲル上での分離後、十分明確にされた PCR 産物をゲルから単離し、ゲル抽出キット (Qiagen) を用いて精製し、続いて配列決定した。

【0267】

ヒト TGF- $\beta$  - R ポリペプチドのアイソフォーム 1 の全長 cDNA の配列分析によって、このアイソフォーム 1 遺伝子が、140 アミノ酸のタンパク質をコードする 420 塩基対のオープンリーディングフレームを含むことが示された (図 1)。ヒト TGF- $\beta$  - R ポリペプチドのアイソフォーム 2 の全長 cDNA の配列分析によって、このアイソフォーム 2 遺伝子が、195 アミノ酸のタンパク質をコードする 585 塩基対のオープンリーディングフレームを含むことが示された (図 2)。

【0268】

ヒト TGF- $\beta$  - R ポリペプチドのアイソフォーム 1 またはアイソフォーム 2 のアミノ酸配列を使用する、Non-Redundant Protein データベースの検索は、これらのタンパク質が、ヒトの増殖分化因子-3 (GDF-3) およびネズミの増殖分化因子-3 (GDF-3) と最高の類似性の程度を共有することを示した。最も重要なことに、システイン残基 (これは、GDF-3 の構造において重要な役割を果たす) の位置および間隔のパターンは、TGF- $\beta$  - R ポリペプチドと GDF-3 との間で保存される。TGF- $\beta$  - R ポリペプチドと GDF-3 との間の類似性は、TGF- $\beta$  - R ポリペプチドが、TGF- $\beta$  ファミリーの新規のメンバーであることを示唆する。図 3 および図 4 は、ヒト TGF- $\beta$  - R ポリペプチドのアイソフォーム 1 またはヒト TGF- $\beta$  - R ポリペプチドのアイソフォーム 2 のいずれか (各図において下部の配列)、およびヒト GDF-3 (各図において上部の配列) についてのアミノ酸配列アライメントを示す。

【0269】

TGF- $\beta$  - R 遺伝子についてのイントロン-エキソン構造を、ゲノムのクローン GA\_6739417 (Celera Genomics) から予測した。図 5A ~ 図 5C は、

ヒト TGF- $\beta$ 1-R 遺伝子 (配列番号 6) のアイソフォーム 1 についてのエキソン / イントロン構造を示す。エキソン 1 (配列番号 7)、エキソン 2 (配列番号 8)、およびエキソン 3 (配列番号 9) の推定されるアミノ酸配列の位置を示す。図 6A ~ 図 6C は、ヒト TGF- $\beta$ 1-R 遺伝子 (配列番号 10) のアイソフォーム 2 についてのエキソン / イントロン構造を示す。エキソン 1 (配列番号 11)、エキソン 2 (配列番号 12)、およびエキソン 3 (配列番号 13) の推定されるアミノ酸配列の位置を示す。

#### 【0270】

(実施例 2: TGF- $\beta$ 1-R mRNA の発現)

複数のヒト組織ノザンプロット (Clontech) を、アンプリマー (amplicon) 2445 ~ 28 およびアンプリマー 2445 ~ 31 を使用して、ヒト TGF- $\beta$ 1-R cDNA の PCR 増幅によって産生された 540 bp のプローブと、ハイブリダイズした。製造業者の説明書に従って、Redi-Prime II キット (Amersham) を使用して、このプローブを、放射標識した。ノザンプロットを、Rapid-Hyb 緩衝液 (Amersham) 中で、60°C で 30 分間プレハイブリダイズし、次いで、ハイブリダイゼーションオープン (Stratagene) 中において、放射標識したプローブを含有する Rapid-Hyb 緩衝液中において 60°C で 1 時間ハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションに続いて、このプロットを、室温で 2 x SSC および 0.1% SDS 中で 2 回洗浄し、次いで、68°C で 1 時間、0.1 x SSC および 0.5% SDS 中で 1 回洗浄した。ハイブリダイズしたプロットを、オートラジオグラフィによって試験した。

#### 【0271】

ノザンプロット分析は、6 kb の転写産物を、前立腺、精巣、卵巣および脂肪肝、ならびに以下の細胞株: Raji (バーキットリンパ腫)、MOLT-4 (リンパ芽球性白血病)、および G361 (黒色腫) において発現することを示した。

#### 【0272】

TGF- $\beta$ 1-R mRNA の発現を、インサイチュハイブリダイゼーションによって局在化する。正常な胎児マウス組織および正常な成熟マウス組織のパネルを、4% パラホルムアルデヒド中で固定し、パラフィン中に包埋し、そして 5  $\mu$ m で切片化する。切片化した組織を、0.2 M HCl 中で透過処理し、プロテイナーゼ K で消化し、そしてトリエタノールアミンおよび無水酢酸でアセチル化する。切片を、ハイブリダイゼーション溶液 (300 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、pH 8.0、5 mM EDTA、1 x Denhardt 溶液、0.2% SDS、10 mM DTT、0.25 mg/ml tRNA、25  $\mu$ g/ml poly A、25  $\mu$ g/ml poly C および 50% ホルムアミド) 中において 60°C で 1 時間プレハイブリダイズし、次いで、10% デキストラン、およびヒト TGF- $\beta$ 1-R 遺伝子に対して相補的な  $2 \times 10^4$  cpm/ $\mu$ l の <sup>32</sup>P 標識アンチセンスリボプローブを含有する、同一の溶液中で 60°C で一晩ハイブリダイズする。リボプローブを、標準的な技術を使用してヒト TGF- $\beta$ 1-R cDNA 配列を含有する、クローンのインビトロでの転写によって入手する。

#### 【0273】

ハイブリダイゼーションに続いて、切片を、ハイブリダイゼーション溶液中でリンスし、ハイブリダイズしないプローブを消化するために RNase A で処理し、次いで、0.1 x SSC 中において 55°C で 30 分間洗浄する。次いで、切片を、NTB-2 乳濁液 (Kodak, Rochester, NY) 中に浸し、4°C で 3 週間露光し、現像し、そしてヘマトキシリンおよびエオシンで対比染色する。組織形態およびハイブリダイゼーションシグナルを、脳 (1 つの矢状断面および 2 つの冠状断面)、胃腸管 (食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、近位の結腸、および遠位の結腸)、下垂体、肝臓、肺、心臓、脾臓、胸腺、リンパ節、腎臓、副腎、膀胱、膵臓、唾液腺、男性生殖器官および女性生殖器官 (女性では、卵巣、卵管、および子宮; ならびに男性では、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、および精管)、BAT および WAT (皮下の、腎周の)、骨 (大腿)、皮膚、胸部、ならびに骨格筋について、暗視野照明および標準的な照明によって同時に解析した。

## 【0274】

(実施例3: TGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドの産生)

(A. 細菌中でのTGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドの発現)

配列の5'末端および3'末端に対応するプライマーを使用して、TGF- $\beta$ 1-RポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅するために、PCRを使用する。増幅されたDNA産物を、発現ベクター中への挿入を可能にするための制限酵素部位を含有するように改変し得る。PCR産物を、ゲル精製し、そして標準的な組換えDNA方法論を用いて、発現ベクター中へ挿入する。例示的なベクター(例えば、luxプロモーターおよびカナマイシン耐性をコードする遺伝子を含有するpAMG21(ATCC番号98113))を、挿入されたDNAの指向性のクローニングのために、BamHIおよびNdeIで消化する。連結した混合物を、エレクトロポレーションによってE.coli宿主系統中に形質転換し、そして形質転換株を、カナマイシン耐性について選択する。選択されたコロニー由来のプラスミドDNAを、単離し、そして挿入物の存在を確認するために、DNA配列決定に供する。

## 【0275】

形質転換した宿主細胞を、誘導の前に、30 $\mu$ g/mLカナマイシンを含有する2xYT培地中でインキュベートする。遺伝子の発現を、N-(3-オキソヘキサノイル)-DL-ホモセリンラクトンを最終濃度の30ng/mLまで添加することによって誘導し、続いて30または37 $^{\circ}$ Cのいずれかで6時間インキュベートする。TGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドの発現を、培養物の遠心分離、細菌ペレットの再懸濁および溶解、ならびにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による宿主細胞タンパク質の分析によって評価する。

## 【0276】

TGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドを含有する封入体を、以下のように精製する。細菌細胞を、遠心分離によりペレット化し、そして水中に再懸濁する。細胞懸濁物を、超音波破碎により溶解し、そして195,000xgで5~10分間の遠心分離によってペレット化する。上清を捨て、そしてペレットを洗浄し、そしてホモジナイザーに移す。ペレットを、均一に懸濁されるまで5mLのPercoll溶液(75%液体Percollおよび0.15M NaCl)中でホモジナイズし、次いで、希釈し、そして21,600xgで30分間遠心分離する。封入体を含有する勾配画分を、回収しそしてプールする。単離した封入体を、SDS-PAGEによって分析する。

## 【0277】

E.coli産生TGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドに対応する、SDSポリアクリルアミドゲル上の単一のバンドを、ゲルから摘出し、そしてN末端アミノ酸配列を、本質的にMatsuda et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 10~35によって記載されるように決定する。

## 【0278】

(B. 哺乳動物細胞中でのTGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドの発現)

配列の5'末端および3'末端に対応するプライマーを使用して、TGF- $\beta$ 1-RポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅するために、PCRを使用する。増幅されたDNA産物を、発現ベクター中への挿入を可能にするための制限酵素部位を含有するように改変し得る。PCR産物をゲル精製し、そして標準的な組換えDNA方法論を用いて、発現ベクター中へ挿入する。エプスタイン-バーウイルスの複製起点を含有する例示的な発現ベクターpCEP4(Invitrogen, Carlsbad, CA)を、293-EBNA-1細胞におけるTGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドの発現のために使用し得る。増幅しかつゲル精製したPCR産物を、pCEP4ベクターに連結し、そしてリポフェクションによって293-EBNA細胞中に導入する。トランスフェクトした細胞を、100 $\mu$ g/mLハイグロマイシン中で選択し、そして得られる薬物耐性培養物を、コンフルエントにまで増殖させる。次いで、細胞を、無血清培地中で72時間培養する。馴化培地を除去し、そしてTGF- $\beta$ 1-Rポリペプチドの発現を、SDS-PAGEによっ

て分析する。

【0279】

TGF-β-Rポリペプチドの発現を、銀染色によって検出し得る。あるいは、TGF-β-Rポリペプチドを、エピトープタグ（例えば、IgG定常ドメインまたはFLAGエピトープ）とともに融合タンパクとして作製し、これを、ペプチドタグに対する抗体を使用する、ウエスタンブロット分析によって検出し得る。

【0280】

TGF-β-Rポリペプチドを、SDS-ポリアクリルアミドゲルから切り出し得るか、またはTGF-β-R融合タンパクを、エピトープタグに対するアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、そして本明細書中に記載されるようなN末端アミノ酸配列解析に供し得る。

10

【0281】

（C. 哺乳動物細胞中のTGF-β-Rポリペプチドの発現および精製）

TGF-β-Rポリペプチド発現構築物を、リポフェクションまたはリン酸カルシウムプロトコルのいずれかを用いて、293EBNA細胞またはCHO細胞に導入する。

【0282】

産生されるTGF-β-Rポリペプチドに対する機能的研究を行うために、大量の馴化培地を、ハイグロマイシンで選択した293EBNAクローンのプールから生成する。この細胞を、500cmのNunc三連フラスコ（Triple Flask）中で、80%のコンフルエンスまで培養し、その後、この培地を回収する1週間前に、無血清培地に切り替える。馴化培地を回収し、そして、増殖まで-20℃で凍結する。

20

【0283】

馴化培地を、以下に記載されるように、アフィニティークロマトグラフィーによって精製する。培地を解凍し、次いで0.2μmのフィルターを通過させる。プロテインGカラムを、pH7.0のPBSで平衡化し、次いで、濾過した培地を充填する。このカラムを、A<sub>280</sub>での吸収がベースラインに達するまで、PBSで洗浄する。pH2.7の0.1Mグリシン-HClを用いて、TGF-β-Rポリペプチドをこのカラムから溶出し、そして直ちに、pH8.5の1MのTris-HClで中和する。TGF-β-Rポリペプチドを含有する画分をプールし、PBS中で透析し、そして-70℃で貯蔵する。

30

【0284】

ヒトTGF-β-Rポリペプチド-Fc融合ポリペプチドの、Xa因子切断のために、アフィニティークロマトグラフィー精製タンパク質を、pH8.0で、50mMのTris-HCl、100mMのNaCl、2mMのCaCl<sub>2</sub>中で透析する。制限プロテアーゼXa因子を、透析したタンパク質に1/100（重量/重量）で添加し、そしてこのサンプルを室温で一晩消化する。

【0285】

（実施例4：抗TGF-β-Rポリペプチド抗体の生成）

TGF-β-Rポリペプチドに対する抗体は、生合成または化学合成によって産生される、精製タンパク質またはTGF-β-Rペプチドでの免疫化によって得られ得る。抗体を作製するための適切な手順としては、HudsonおよびBay、Practical Immunology（第2版、Blackwell Scientific Publications）に記載される手順が挙げられる。

40

【0286】

抗体の精製のための1つの手段において、動物（代表的には、マウスまたはウサギ）に、TGF-β-R抗原（例えば、TGF-β-Rポリペプチド）を注入し、そして、ELISAによって決定されるような、十分な血清力価レベルを有する動物を、ハイブリドーマ産生のために選択する。免疫化された動物の脾臓を収集し、そして単細胞懸濁液（ここから、脾細胞を収集する）として調製する。この脾細胞を、マウス骨髄腫細胞（例えば、Sp2/0-Ag14細胞）に融合し、そして最初に、200U/mLのペニシリン、200μg/mLの硫酸ストレプトマイシン、および4mMのグルタミンを有するDMEMに

50

においてインキュベートし、次いで、H A T 選択培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン）においてインキュベートする。選択の後、組織培養上清を、各々の融合ウェルから採取し、そしてE L I S A によって、抗 T G F - R 抗体産生について試験する。

【0287】

抗 T G F - R 抗体を得るための代替的な手順（例えば、ヒト抗体の産生のためのヒト I g 遺伝子座を有するトランスジェニックマウスの免疫化）、および、合成抗体ライブラリー（例えば、抗体可変ドメインの変異誘発によって産生される合成抗体ライブラリー）のスクリーニングもまた用いられ得る。

【0288】

（実施例5：トランスジェニックマウスにおける T G F - R ポリペプチドの発現）  
T G F - R ポリペプチドの生物学的活性を評価するために、肝臓特異性 A p o E プロモーターの制御下で、T G F - R ポリペプチド / F c 融合タンパク質をコードする構築物を調製する。この構築物の送達は、T G F - R ポリペプチドの機能についての参考となる、病理学的変化を引き起こすと予測される。同様に、全長 T G F - R ポリペプチドを含有する構築物を、アクチンプロモーターの制御下で調製する。この構築物の送達は、遍在的な発現を生じると予測される。

【0289】

これらの構築物を作製するために、P C R を用いて、所望の配列の5'末端および3'末端に対応するプライマーを用いて T G F - R ポリペプチドをコードし、そして制限酵素部位を導入して、増幅された生成物の、発現ベクターへの挿入を可能にする、テンプレート D N A 配列を増幅する。増幅の後、P C R 生成物をゲル精製し、適切な制限酵素で消化し、そして標準的な組換え D N A 技術を用いて、発現ベクター中に連結する。例えば、G r a h a m ら、1997、N a t u r e G e n e t i c s、17:272~74、および、R a y ら、1991、G e n e s D e v . 5:2265~73に記載されるように、増幅された T G F - R ポリペプチド配列は、ヒト - アクチンプロモーターの制御下で、発現ベクター中にクローン化され得る。

【0290】

連結の後、反応混合物を用いて、エレクトロポレーションによって E . c o l i 宿主株を形質転換させ、そして形質転換体を、薬物耐性について選択する。選択されたコロニー由来するプラスミド D N A を単離し、そして D N A 配列決定に供して、適切な挿入の存在および変異の欠如を確認する。この T G F - R ポリペプチド発現ベクターを、2回の C s C l 密度勾配遠心分離を介して精製し、適切な制限酵素で切断し、そして、T G F - R ポリペプチド導入遺伝子を含有する直線化フラグメントを、ゲル電気泳動によって精製する。この精製フラグメントを、5 m M の T r i s ( p H 7 . 4 ) および 0 . 2 m M の E D T A 中に、2 m g / m L の濃度で再懸濁させる。

【0291】

B D F 1 x B D F 1 交配マウス由来の単細胞胚を、記載されるように注入する（国際公開番号 W O 9 7 / 2 3 6 1 4 ）。C O <sub>2</sub> インキュベーター内で胚を一晩培養し、そして15~20個の二細胞胚を、偽妊娠 C D 1 雌マウスの卵管に移す。微量注入した胚の移植から得られた子孫を、以下のように、ゲノム D N A サンプル中の統合導入遺伝子の P C R 増幅によって、スクリーニングする。耳の小片（e a r p i e c e ）を、20 m L の耳緩衝液（20 m M の T r i s ( p H 8 . 0 )、10 m M の E D T A、0 . 5 % の S D S、および 500 m l / m L の プロテイナーゼ K ）中で、55 で一晩消化する。次いで、このサンプルを 200 m L の T E で希釈し、そして、2 m L の耳サンプルを、適切なプライマーを用いる P C R 反応において用いる。

【0292】

8週齢で、トランスジェニック創始動物およびコントロール動物を、剖検および病理学的分析のために屠殺する。脾臓の一部を取り出し、そして T o t a l R N A E x t r a c t i o n K i t ( Q i a g e n ) を用いて、この脾臓から総細胞 D N A を単離し、そ

10

20

30

40

50

して導入遺伝子発現を、RT-PCRによって決定する。脾臓から取り出されたRNAを、SuperScript<sup>TM</sup> Pre-amplification System (Gibco-BRL)を用いて、以下のようにcDNAに変換する。適切なプライマー（発現ベクター配列に位置し、そしてTGF-β-Rポリペプチド導入遺伝子に対して3'側に位置する）を用いて、導入遺伝子転写物からのcDNA合成を開始する。トランスジェニック創始動物およびコントロールに由来する10mgの脾臓総RNAを、1mMのプライマーと共に70℃で10分間インキュベートし、そして氷上に置く。次いで、この反応物に、10mMのTris-HCl (pH 8.3)、50mMのKCl、2.5mMのMgCl<sub>2</sub>、10mMの各dNTP、0.1mMのDTT、および200UのSuperScript II逆転写酵素を補充する。42℃での50分間のインキュベーションの後、この反応を、72℃で15分間加熱することによって停止し、そして反応物を、2UのRNase Hで、37℃で20分間消化する。次いで、TGF-β-Rポリペプチドに対して特異的なプライマーを用いるPCRによって、サンプルを増幅する。

10

## 【0293】

（実施例6：トランスジェニックマウスにおけるTGF-β-Rポリペプチドの生物学的活性）

安楽死の前に、トランスジェニック動物を秤量し、イソフルオレンによって麻酔し、そして心臓穿刺によって血液を引き出す。このサンプルを、血液学分析および血清化学分析に供する。最後の失血の後、ラジオグラフィーを行う。全体の解剖において、主要な内臓器官を重量分析に供する。

20

## 【0294】

全体の解剖の後、組織（すなわち、肝臓、脾臓、膵臓、胃、胃腸管全体、腎臓、生殖器、皮膚および乳腺、骨、脳、心臓、肺、胸腺、気管、食道、甲状腺、副腎、膀胱、リンパ節ならびに骨格筋）を取り出し、組織学的検査のために、10%緩衝されたZn-ホルマリン中に固定する。固定の後、これらの組織をパラフィンブロックに加工し、そして3mmの切片を得る。全ての切片を、ヘマトキシリンおよびエキソシン (exosin) で染色し、次いで組織学的分析に供する。

## 【0295】

トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスの両方の脾臓、リンパ節、およびパイアー斑を、B細胞特異性抗体およびT細胞特異性抗体と共に、以下のように、免疫組織学的分析に供する。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を、脱パラフィン化 (deparaffinized) し、そして脱イオン水中で水和させる。この切片を、3%の過酸化水素でクエンチし、Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA) でブロックし、そしてラットモノクローナル抗マウスB220およびCD3 (Harlan, Indianapolis, IN) においてインキュベートする。抗体結合を、ビオチン標識化ウサギ抗ラット免疫グロブリン、および、発色原 (chromagen) としてDAB (BioTec, Santa Barbara, CA) を用いるペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジン (BioGenex, San Ramon, CA) によって、検出する。切片を、ヘマトキシリンで対比染色する。

30

## 【0296】

剖検の後、MLNと、トランスジェニック動物およびコントロール同腹仔に由来する脾臓ならびに胸腺の切片とを取り出す。単細胞懸濁液を、100mmのナイロン細胞染色剤 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) の底において、シリンジの平坦な端でこれらの組織を徐々に粉碎することによって、調製する。細胞を2回洗浄し、計数し、次いで、各組織に由来する約 $1 \times 10^6$ 個の細胞を、20μLの体積中で、0.5μgのCD16/32 (Fc III/II) Fcブロックとともに10分間インキュベートする。次いでサンプルを、0.5μgの、FITCの抗体またはCD90.2 (Thy-1.2)、CD45R (B220)、CD11b (Mac-1)、Gr-1、CD4、もしくはCD8 (PharMingen, San Diego, CA) に対するPE結合体化モノクローナル抗体を有する、100μLの体積のPBS (Ca

40

50

+ および Mg<sup>+</sup> を欠く)、0.1%のウシ血清アルブミン、および0.01%のアジ化ナトリウム中で、2~8 で30分間染色する。抗体結合の後、これらの細胞を洗浄し、次いで、FACScan (Becton Dickinson) におけるフローサイトメトリーによって分析する。

【0297】

本発明は、好ましい実施形態によって記述されているが、変形および改変が生じることは当業者に理解される。したがって、添付の特許請求の範囲は、特許請求されるような本発明の範囲内に生じる、このような等価な変形を網羅することを意図する。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1A~図1Bは、ヒトTGF-β-R遺伝子のアイソフォーム1についてのcDNA配列(配列番号1)、およびこの遺伝子によってコードされるポリペプチドの推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。

10

【図2A】

図2Aは、ヒトTGF-β-R遺伝子のアイソフォーム2についてのcDNA配列(配列番号3)、およびこの遺伝子によってコードされるポリペプチドの推定アミノ酸配列(配列番号4)を示す。

【図2B】

図2Bは、ヒトTGF-β-R遺伝子のアイソフォーム2についてのcDNA配列(配列番号3)、およびこの遺伝子によってコードされるポリペプチドの推定アミノ酸配列(配列番号4)を示す。

20

【図3】

図3は、ヒトTGF-β-Rポリペプチド、アイソフォーム1(下の配列;配列番号2)とヒト成長分化因子-3(GDF-3)(上の配列;配列番号5)とのアミノ酸配列アライメントを示す。

【図4】

図4は、ヒトTGF-β-Rポリペプチド、アイソフォーム2(下の配列;配列番号4)とヒト成長分化因子-3(GDF-3)(上の配列;配列番号5)とのアミノ酸配列アライメントを示す。

【図5A】

図5Aは、ヒトTGF-β-Rポリペプチド、アイソフォーム1(配列番号6)のエキソン/イントロン構造を示す。エキソン1(配列番号7)、エキソン2(配列番号8)、およびエキソン3(配列番号9)の推定アミノ酸配列の位置が示される。

30

【図5B】

図5Bは、ヒトTGF-β-Rポリペプチド、アイソフォーム1(配列番号6)のエキソン/イントロン構造を示す。エキソン1(配列番号7)、エキソン2(配列番号8)、およびエキソン3(配列番号9)の推定アミノ酸配列の位置が示される。

【図5C】

図5Cは、ヒトTGF-β-Rポリペプチド、アイソフォーム1(配列番号6)のエキソン/イントロン構造を示す。エキソン1(配列番号7)、エキソン2(配列番号8)、およびエキソン3(配列番号9)の推定アミノ酸配列の位置が示される。

40

【図6A】

図6Aは、ヒトTGF-β-Rポリペプチド、アイソフォーム2(配列番号10)のエキソン/イントロン構造を示す。エキソン1(配列番号11)、エキソン2(配列番号12)、およびエキソン3(配列番号13)の推定アミノ酸配列の位置が示される。

【図6B】

図6Bは、ヒトTGF-β-Rポリペプチド、アイソフォーム2(配列番号10)のエキソン/イントロン構造を示す。エキソン1(配列番号11)、エキソン2(配列番号12)、およびエキソン3(配列番号13)の推定アミノ酸配列の位置が示される。

【図6C】

50

図 6 C は、ヒト TGF - R ポリペプチド、アイソフォーム 2 (配列番号 10) のエキソン / イントロン構造を示す。エキソン 1 (配列番号 11)、エキソン 2 (配列番号 12)、およびエキソン 3 (配列番号 13) の推定アミノ酸配列の位置が示される。

【 図 3 】

FIG. 3

```

201 FLEILVKEDRDGSGVNFQPEDTCARLRCSLHASLLVVTLNPDQC...HPSR 247
1 .....MVLPSYSKKPLIS.NVEQLILGIPGQ 25
248 KRRAAIPVPKL.SCKNLCHRHQLPINFRDLGHWIILAPKGFMANCHGE 296
26 NRREIGHGQDIFPAEKLCHELDKRVNLHRAAWGECIVAPKTLSPSYCQGT 75
297 CPFSLTISLNSNYAFMQALMHAVDPEIPQ..AVCIPTKLSPISMLYQDN 344
76 CP.ALNSBLRHSSP...ECYKRAV.PTCPWLQTCRPTMVRVLSLMVQDD 120
345 NDNVILRHYEDMVVDECGCG 364
121 EHKMSVHYVNTSLVCKCGCS 140

```

パーセント類似性 : 36.567      パーセント同一性 : 26.866

【 図 4 】

FIG. 4

```

151 QEPHVWGQTFKPGKMFVLRSEVWVQGVAFHFNLLDVAKDWNNDNPRKNFGL 200
1 .....MREFFSARQHGF 11
201 FLEILVKEDRDGSGVNFQPEDTCARLRCSLHASLLVVTLN...PDQCH... 244
12 TLIFPKTKIPATDVADASLNECSSTERKQDVVLLFVTLSTQPPPLPHLPY 61
245 ...P..SRKRAAIPVPK.....LSCKNLCHRHQLPINFRDLG 277
62 VQKPLISNVEQLILGIPGQNRREIGHGQDIFPAEKLCHELDKRVNLHRAA 111
278 HWKIILAPKGFMANCHGECPFSLTISLNSNYAFMQALMHAVDPEIPQ. 326
112 WGEIVAPKTLSPSYCQGTCP.ALNSBLRHSSP...ECYKRAV.PTCPWL 156
327 .AVCIPTKLSPISMLYQDNNDNVILRHYEDMVVDECGCG 364
157 QTCTCRPTMVRVLSLMVQDDDEHKMSVHYVNTSLVCKCGCS 195

```

パーセント類似性 : 32.941      パーセント同一性 : 26.471

## 【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
6 June 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/44379 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/495
- (21) International Application Number: PCT/US01/44366
- (22) International Filing Date: 28 November 2001 (28.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/253,476 28 November 2000 (28.11.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): AMGEN, INC. [US/US], One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320 (US).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): JING, Shunqian [US/US], 3254 Bordero Lane, Thousand Oaks, CA 91362 (US).
- (74) Agent: ZUHN, Donald, L., McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, 300 South Wacker Drive, Suite 5200, Chicago, IL 60606 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/44379 A2

(54) Title: TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA-RELATED MOLECULES AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention provides Transforming Growth Factor-Beta-Related (TGF- $\beta$ -R) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also provides selective binding agents, vectors, host cells, and methods for producing TGF- $\beta$ -R polypeptides. The invention further provides pharmaceutical compositions and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or prevention of diseases, disorders, and conditions associated with TGF- $\beta$ -R polypeptides.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

**TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA-RELATED MOLECULES  
AND USES THEREOF**

This application claims the benefit of priority from U.S. Provisional Patent  
5 Application No. 60/253,476, filed on November 28, 2000, the disclosure of which is  
explicitly incorporated by reference herein.

Field of the Invention

The present invention relates to Transforming Growth Factor-Beta-Related  
10 (TGF- $\beta$ -R) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The  
invention also relates to selective binding agents, vectors, host cells, and methods for  
producing TGF- $\beta$ -R polypeptides. The invention further relates to pharmaceutical  
compositions and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or  
prevention of diseases, disorders, and conditions associated with TGF- $\beta$ -R  
15 polypeptides.

Background of the Invention

Technical advances in the identification, cloning, expression, and  
manipulation of nucleic acid molecules and the deciphering of the human genome  
20 have greatly accelerated the discovery of novel therapeutics. Rapid nucleic acid  
sequencing techniques can now generate sequence information at unprecedented rates  
and, coupled with computational analyses, allow the assembly of overlapping  
sequences into partial and entire genomes and the identification of polypeptide-  
encoding regions. A comparison of a predicted amino acid sequence against a  
25 database compilation of known amino acid sequences allows one to determine the  
extent of homology to previously identified sequences and/or structural landmarks.  
The cloning and expression of a polypeptide-encoding region of a nucleic acid  
molecule provides a polypeptide product for structural and functional analyses. The  
manipulation of nucleic acid molecules and encoded polypeptides may confer  
30 advantageous properties on a product for use as a therapeutic.

In spite of the significant technical advances in genome research over the past  
decade, the potential for the development of novel therapeutics based on the human

WO 02/44379

PCT/US01/44866

genome is still largely unrealized. Many genes encoding potentially beneficial polypeptide therapeutics or those encoding polypeptides, which may act as "targets" for therapeutic molecules, have still not been identified. Accordingly, it is an object of the invention to identify novel polypeptides, and nucleic acid molecules encoding the same, which have diagnostic or therapeutic benefit.

#### Summary of the Invention

The present invention relates to novel TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecules and encoded polypeptides.

10 The invention provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) the nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3;

15 (b) the nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-2665 or PTA-2666;

(c) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

20 (d) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of any of (a) - (c); and

(e) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of any of (a) - (c).

25 The invention also provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

30 (b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of the nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, the

WO 02/44379

PCT/US01/44866

DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-2665 or PTA-2666, or the nucleotide sequence of (a);

(c) a region of the nucleotide sequence of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-2665 or PTA-2666, or the nucleotide sequence of (a) or (b) encoding a polypeptide fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein the polypeptide fragment has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or is antigenic;

(d) a region of the nucleotide sequence of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-2665 or PTA-2666, or the nucleotide sequence of any of (a) - (c) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

(e) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of any of (a) - (d); and

(f) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of any of (a) - (d).

The invention further provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one amino acid insertion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one amino acid deletion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

WO 02/44379

PCT/US01/44866

- (d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 that has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;
- 5 (e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or
- 10 SEQ ID NO: 4;
- (f) a nucleotide sequence of any of (a) - (e) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;
- (g) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of any of (a) - (f);
- 15 and
- (h) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of any of (a) - (e).

The present invention provides for an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

- 20 (a) the amino acid as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4; and
- (b) the amino acid sequence encoded by the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-2665 or PTA-2666.

25 The invention also provides for an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

- (a) an amino acid sequence for an ortholog of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;
- 30 (b) an amino acid sequence that is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, wherein the

WO 02/44379

PCT/US01/44866

polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

5 (c) a fragment of the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or is antigenic; and

(d) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-2665 or PTA-2666, or the amino acid sequence of  
10 either (a) or (b).

The invention further provides for an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the  
15 polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(b) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an  
20 activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(c) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(d) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 that has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the polypeptide has an  
25 activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4; and

(e) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation,  
30 and N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

Also provided are fusion polypeptides comprising TGF- $\beta$ -R amino acid sequences.

The present invention also provides for an expression vector comprising the isolated nucleic acid molecules as set forth herein, recombinant host cells comprising the recombinant nucleic acid molecules as set forth herein, and a method of producing a TGF- $\beta$ -R polypeptide comprising culturing the host cells and optionally isolating the polypeptide so produced.

A transgenic non-human animal comprising a nucleic acid molecule encoding a TGF- $\beta$ -R polypeptide is also encompassed by the invention. The TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecules are introduced into the animal in a manner that allows expression and increased levels of a TGF- $\beta$ -R polypeptide, which may include increased circulating levels. Alternatively, the TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecules are introduced into the animal in a manner that prevents expression of endogenous TGF- $\beta$ -R polypeptide (*i.e.*, generates a transgenic animal possessing a TGF- $\beta$ -R polypeptide gene knockout). The transgenic non-human animal is preferably a mammal, and more preferably a rodent, such as a rat or a mouse.

Also provided are derivatives of the TGF- $\beta$ -R polypeptides of the present invention.

Additionally provided are selective binding agents such as antibodies and peptides capable of specifically binding the TGF- $\beta$ -R polypeptides of the invention. Such antibodies and peptides may be agonistic or antagonistic.

Pharmaceutical compositions comprising the nucleotides, polypeptides, or selective binding agents of the invention and one or more pharmaceutically acceptable formulation agents are also encompassed by the invention. The pharmaceutical compositions are used to provide therapeutically effective amounts of the nucleotides or polypeptides of the present invention. The invention is also directed to methods of using the polypeptides, nucleic acid molecules, and selective binding agents.

The TGF- $\beta$ -R polypeptides and nucleic acid molecules of the present invention may be used to treat, prevent, ameliorate, and/or detect diseases and disorders, including those recited herein.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

The present invention also provides a method of assaying test molecules to identify a test molecule that binds to a TGF- $\beta$ -R polypeptide. The method comprises contacting a TGF- $\beta$ -R polypeptide with a test molecule to determine the extent of binding of the test molecule to the polypeptide. The method further comprises  
5 determining whether such test molecules are agonists or antagonists of a TGF- $\beta$ -R polypeptide. The present invention further provides a method of testing the impact of molecules on the expression of TGF- $\beta$ -R polypeptide or on the activity of TGF- $\beta$ -R polypeptide.

Methods of regulating expression and modulating (*i.e.*, increasing or  
10 decreasing) levels of a TGF- $\beta$ -R polypeptide are also encompassed by the invention. One method comprises administering to an animal a nucleic acid molecule encoding a TGF- $\beta$ -R polypeptide. In another method, a nucleic acid molecule comprising elements that regulate or modulate the expression of a TGF- $\beta$ -R polypeptide may be administered. Examples of these methods include gene therapy, cell therapy, and  
15 anti-sense therapy as further described herein.

In another aspect of the present invention, the TGF- $\beta$ -R polypeptides may be used for identifying receptors thereof ("TGF- $\beta$ -R polypeptide receptors"). Various forms of "expression cloning" have been extensively used to clone receptors for protein ligands. *See, e.g.*, Simonsen and Lodish, 1994, *Trends Pharmacol. Sci.*  
20 15:437-41 and Tartaglia *et al.*, 1995, *Cell* 83:1263-71. The isolation of a TGF- $\beta$ -R polypeptide receptor is useful for identifying or developing novel agonists and antagonists of the TGF- $\beta$ -R polypeptide signaling pathway. Such agonists and antagonists include soluble TGF- $\beta$ -R polypeptide receptors, anti-TGF- $\beta$ -R polypeptide receptor-selective binding agents (such as antibodies and derivatives  
25 thereof), small molecules, and antisense oligonucleotides, any of which can be used for treating one or more disease or disorder, including those disclosed herein.

#### Brief Description of the Figures

Figures 1A-1B illustrate the cDNA sequence for isoform 1 of the human TGF- $\beta$ -R  
30 gene (SEQ ID NO: 1) and the deduced amino acid sequence (SEQ ID NO: 2) of the polypeptide encoded by this gene.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

Figures 2A-2B illustrate the cDNA sequence for isoform 2 of the human TGF- $\beta$ -R gene (SEQ ID NO: 3) and the deduced amino acid sequence (SEQ ID NO: 4) of the polypeptide encoded by this gene;

5 Figure 3 illustrates the amino acid sequence alignment of human TGF- $\beta$ -R polypeptide, isoform 1 (lower sequence; SEQ ID NO: 2) and human Growth Differentiation Factor-3 (GDF-3) (upper sequence; SEQ ID NO: 5).

10 Figure 4 illustrates the amino acid sequence alignment of human TGF- $\beta$ -R polypeptide, isoform 2 (lower sequence; SEQ ID NO: 4) and human Growth Differentiation Factor-3 (GDF-3) (upper sequence; SEQ ID NO: 5).

15 Figures 5A-5C illustrate the exon/intron structure of human TGF- $\beta$ -R polypeptide, isoform 1 (SEQ ID NO: 6). The locations of the deduced amino acid sequence of exons 1 (SEQ ID NO: 7), 2 (SEQ ID NO: 8), and 3 (SEQ ID NO: 9) are indicated.

20 Figures 6A-6C illustrate the exon/intron structure of human TGF- $\beta$ -R polypeptide, isoform 2 (SEQ ID NO: 10). The locations of the deduced amino acid sequence of exons 1 (SEQ ID NO: 11), 2 (SEQ ID NO: 12), and 3 (SEQ ID NO: 13) are indicated.

#### Detailed Description of the Invention

The section headings used herein are for organizational purposes only and are not to be construed as limiting the subject matter described. All references cited in this application are expressly incorporated by reference herein.

#### Definitions

25 The terms "TGF- $\beta$ -R gene" or "TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecule" or "TGF- $\beta$ -R polynucleotide" refer to a nucleic acid molecule comprising or consisting of a nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, a nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-2665 or PTA-2666, and nucleic acid molecules as defined herein.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

The term "TGF- $\beta$ -R polypeptide allelic variant" refers to one of several possible naturally occurring alternate forms of a gene occupying a given locus on a chromosome of an organism or a population of organisms.

5 The term "TGF- $\beta$ -R polypeptide splice variant" refers to a nucleic acid molecule, usually RNA, which is generated by alternative processing of intron sequences in an RNA transcript of TGF- $\beta$ -R polypeptide amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.

The term "isolated nucleic acid molecule" refers to a nucleic acid molecule of the invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of proteins, lipids, carbohydrates, or other materials with which it is naturally found when total  
10 nucleic acid is isolated from the source cells, (2) is not linked to all or a portion of a polynucleotide to which the "isolated nucleic acid molecule" is linked in nature, (3) is operably linked to a polynucleotide which it is not linked to in nature, or (4) does not occur in nature as part of a larger polynucleotide sequence. Preferably, the isolated  
15 nucleic acid molecule of the present invention is substantially free from any other contaminating nucleic acid molecule(s) or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its use in polypeptide production or its therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

The term "nucleic acid sequence" or "nucleic acid molecule" refers to a DNA  
20 or RNA sequence. The term encompasses molecules formed from any of the known base analogs of DNA and RNA such as, but not limited to 4-acetylcytosine, 8-hydroxy-N6-methyladenosine, aziridinyl-cytosine, pseudoisocytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-carboxy-methylaminomethyluracil,  
25 dihydrouracil, inosine, N6-iso-pentenyladenine, 1-methyladenine, 1-methylpseudouracil, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethyl-guanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-methyladenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyamino-methyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarbonyl-methyluracil, 5-  
30 methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, oxybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, N-

WO 02/44379

PCT/US01/44866

uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, pseudouracil, qucosine, 2-thiocytosine, and 2,6-diaminopurine.

The term "vector" is used to refer to any molecule (*e.g.*, nucleic acid, plasmid, or virus) used to transfer coding information to a host cell.

5 The term "expression vector" refers to a vector that is suitable for transformation of a host cell and contains nucleic acid sequences that direct and/or control the expression of inserted heterologous nucleic acid sequences. Expression includes, but is not limited to, processes such as transcription, translation, and RNA splicing, if introns are present.

10 The term "operably linked" is used herein to refer to an arrangement of flanking sequences wherein the flanking sequences so described are configured or assembled so as to perform their usual function. Thus, a flanking sequence operably linked to a coding sequence may be capable of effecting the replication, transcription and/or translation of the coding sequence. For example, a coding sequence is  
15 operably linked to a promoter when the promoter is capable of directing transcription of that coding sequence. A flanking sequence need not be contiguous with the coding sequence, so long as it functions correctly. Thus, for example, intervening untranslated yet transcribed sequences can be present between a promoter sequence and the coding sequence and the promoter sequence can still be considered "operably  
20 linked" to the coding sequence.

The term "host cell" is used to refer to a cell which has been transformed, or is capable of being transformed with a nucleic acid sequence and then of expressing a selected gene of interest. The term includes the progeny of the parent cell, whether or not the progeny is identical in morphology or in genetic make-up to the original  
25 parent, so long as the selected gene is present.

The term "TGF- $\beta$ -R polypeptide" refers to a polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 and related polypeptides. Related polypeptides include TGF- $\beta$ -R polypeptide fragments, TGF- $\beta$ -R polypeptide orthologs, TGF- $\beta$ -R polypeptide variants, and TGF- $\beta$ -R  
30 polypeptide derivatives, which possess at least one activity of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. TGF- $\beta$ -R polypeptides may be

WO 02/44379

PCT/US01/44866

mature polypeptides, as defined herein, and may or may not have an amino-terminal methionine residue, depending on the method by which they are prepared.

The term "TGF- $\beta$ -R polypeptide fragment" refers to a polypeptide that comprises a truncation at the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or a truncation at the carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. The term "TGF- $\beta$ -R polypeptide fragment" also refers to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of TGF- $\beta$ -R polypeptide orthologs, TGF- $\beta$ -R polypeptide derivatives, or TGF- $\beta$ -R polypeptide variants, or to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of the polypeptides encoded by TGF- $\beta$ -R polypeptide allelic variants or TGF- $\beta$ -R polypeptide splice variants. TGF- $\beta$ -R polypeptide fragments may result from alternative RNA splicing or from *in vivo* protease activity. Membrane-bound forms of a TGF- $\beta$ -R polypeptide are also contemplated by the present invention. In preferred embodiments, truncations and/or deletions comprise about 10 amino acids, or about 20 amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or more than about 100 amino acids. The polypeptide fragments so produced will comprise about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or more than about 100 amino acids. Such TGF- $\beta$ -R polypeptide fragments may optionally comprise an amino-terminal methionine residue. It will be appreciated that such fragments can be used, for example, to generate antibodies to TGF- $\beta$ -R polypeptides.

The term "TGF- $\beta$ -R polypeptide ortholog" refers to a polypeptide from another species that corresponds to TGF- $\beta$ -R polypeptide amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. For example, mouse and human TGF- $\beta$ -R polypeptides are considered orthologs of each other.

The term "TGF- $\beta$ -R polypeptide variants" refers to TGF- $\beta$ -R polypeptides comprising amino acid sequences having one or more amino acid sequence substitutions, deletions (such as internal deletions and/or TGF- $\beta$ -R polypeptide fragments), and/or additions (such as internal additions and/or TGF- $\beta$ -R fusion polypeptides) as compared to the TGF- $\beta$ -R polypeptide amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 (with or without a leader sequence). Variants may be naturally occurring (*e.g.*, TGF- $\beta$ -R polypeptide allelic variants,

WO 02/44379

PCT/US01/44866

TGF- $\beta$ -R polypeptide orthologs, and TGF- $\beta$ -R polypeptide splice variants) or artificially constructed. Such TGF- $\beta$ -R polypeptide variants may be prepared from the corresponding nucleic acid molecules having a DNA sequence that varies accordingly from the DNA sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3. In preferred embodiments, the variants have from 1 to 3, or from 1 to 5, or from 1 to 10, or from 1 to 15, or from 1 to 20, or from 1 to 25, or from 1 to 50, or from 1 to 75, or from 1 to 100, or more than 100 amino acid substitutions, insertions, additions and/or deletions, wherein the substitutions may be conservative, or non-conservative, or any combination thereof.

10 The term "TGF- $\beta$ -R polypeptide derivatives" refers to the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, TGF- $\beta$ -R polypeptide fragments, TGF- $\beta$ -R polypeptide orthologs, or TGF- $\beta$ -R polypeptide variants, as defined herein, that have been chemically modified. The term "TGF- $\beta$ -R polypeptide derivatives" also refers to the polypeptides encoded by TGF- $\beta$ -R polypeptide allelic variants or TGF- $\beta$ -R polypeptide splice variants, as defined herein, that have been chemically modified.

15 The term "mature TGF- $\beta$ -R polypeptide" refers to a TGF- $\beta$ -R polypeptide lacking a leader sequence. A mature TGF- $\beta$ -R polypeptide may also include other modifications such as proteolytic processing of the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or the carboxyl-terminus, cleavage of a smaller polypeptide from a larger precursor, N-linked and/or O-linked glycosylation, and the like.

20 The term "TGF- $\beta$ -R fusion polypeptide" refers to a fusion of one or more amino acids (such as a heterologous protein or peptide) at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, TGF- $\beta$ -R polypeptide fragments, TGF- $\beta$ -R polypeptide orthologs, TGF- $\beta$ -R polypeptide variants, or TGF- $\beta$ -R derivatives, as defined herein. The term "TGF- $\beta$ -R fusion polypeptide" also refers to a fusion of one or more amino acids at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide encoded by TGF- $\beta$ -R polypeptide allelic variants or TGF- $\beta$ -R polypeptide splice variants, as defined herein.

30 The term "biologically active TGF- $\beta$ -R polypeptides" refers to TGF- $\beta$ -R polypeptides having at least one activity characteristic of the polypeptide comprising

WO 02/44379

PCT/US01/44866

the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. In addition, a TGF- $\beta$ -R polypeptide may be active as an immunogen; that is, the TGF- $\beta$ -R polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised.

5 The term "isolated polypeptide" refers to a polypeptide of the present invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of polynucleotides, lipids, carbohydrates, or other materials with which it is naturally found when isolated from the source cell, (2) is not linked (by covalent or noncovalent interaction) to all or a portion of a polypeptide to which the "isolated polypeptide" is linked in nature, (3) is operably linked (by covalent or noncovalent  
10 interaction) to a polypeptide with which it is not linked in nature, or (4) does not occur in nature. Preferably, the isolated polypeptide is substantially free from any other contaminating polypeptides or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

15 The term "identity," as known in the art, refers to a relationship between the sequences of two or more polypeptide molecules or two or more nucleic acid molecules, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between nucleic acid molecules or polypeptides, as the case may be, as determined by the match between strings of two  
20 or more nucleotide or two or more amino acid sequences. "Identity" measures the percent of identical matches between the smaller of two or more sequences with gap alignments (if any) addressed by a particular mathematical model or computer program (*i.e.*, "algorithms").

The term "similarity" is a related concept, but in contrast to "identity,"  
25 "similarity" refers to a measure of relatedness that includes both identical matches and conservative substitution matches. If two polypeptide sequences have, for example, 10/20 identical amino acids, and the remainder are all non-conservative substitutions, then the percent identity and similarity would both be 50%. If in the same example, there are five more positions where there are conservative  
30 substitutions, then the percent identity remains 50%, but the percent similarity would be 75% (15/20). Therefore, in cases where there are conservative substitutions, the

WO 02/44379

PCT/US01/44866

percent similarity between two polypeptides will be higher than the percent identity between those two polypeptides.

The term "naturally occurring" or "native" when used in connection with biological materials such as nucleic acid molecules, polypeptides, host cells, and the like, refers to materials which are found in nature and are not manipulated by man. Similarly, "non-naturally occurring" or "non-native" as used herein refers to a material that is not found in nature or that has been structurally modified or synthesized by man.

The terms "effective amount" and "therapeutically effective amount" each refer to the amount of a TGF- $\beta$ -R polypeptide or TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecule used to support an observable level of one or more biological activities of the TGF- $\beta$ -R polypeptides as set forth herein.

The term "pharmaceutically acceptable carrier" or "physiologically acceptable carrier" as used herein refers to one or more formulation materials suitable for accomplishing or enhancing the delivery of the TGF- $\beta$ -R polypeptide, TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecule, or TGF- $\beta$ -R selective binding agent as a pharmaceutical composition.

The term "antigen" refers to a molecule or a portion of a molecule capable of being bound by a selective binding agent, such as an antibody, and additionally capable of being used in an animal to produce antibodies capable of binding to an epitope of that antigen. An antigen may have one or more epitopes.

The term "selective binding agent" refers to a molecule or molecules having specificity for a TGF- $\beta$ -R polypeptide. As used herein, the terms, "specific" and "specificity" refer to the ability of the selective binding agents to bind to human TGF- $\beta$ -R polypeptides and not to bind to human non-TGF- $\beta$ -R polypeptides. It will be appreciated, however, that the selective binding agents may also bind orthologs of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, that is, interspecies versions thereof, such as mouse and rat TGF- $\beta$ -R polypeptides.

The term "transduction" is used to refer to the transfer of genes from one bacterium to another, usually by a phage. "Transduction" also refers to the acquisition and transfer of eukaryotic cellular sequences by retroviruses.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

The term "transfection" is used to refer to the uptake of foreign or exogenous DNA by a cell, and a cell has been "transfected" when the exogenous DNA has been introduced inside the cell membrane. A number of transfection techniques are well known in the art and are disclosed herein. See, e.g., Graham *et al.*, 1973, *Virology* 52:456; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986); and Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13:197. Such techniques can be used to introduce one or more exogenous DNA moieties into suitable host cells.

The term "transformation" as used herein refers to a change in a cell's genetic characteristics, and a cell has been transformed when it has been modified to contain a new DNA. For example, a cell is transformed where it is genetically modified from its native state. Following transfection or transduction, the transforming DNA may recombine with that of the cell by physically integrating into a chromosome of the cell, may be maintained transiently as an episomal element without being replicated, or may replicate independently as a plasmid. A cell is considered to have been stably transformed when the DNA is replicated with the division of the cell.

#### Relatedness of Nucleic Acid Molecules and/or Polypeptides

It is understood that related nucleic acid molecules include allelic or splice variants of the nucleic acid molecule of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, and include sequences which are complementary to any of the above nucleotide sequences. Related nucleic acid molecules also include a nucleotide sequence encoding a polypeptide comprising or consisting essentially of a substitution, modification, addition and/or deletion of one or more amino acid residues compared to the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. Such related TGF- $\beta$ -R polypeptides may comprise, for example, an addition and/or a deletion of one or more N-linked or O-linked glycosylation sites or an addition and/or a deletion of one or more cysteine residues.

Related nucleic acid molecules also include fragments of TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecules which encode a polypeptide of at least about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or

WO 02/44379

PCT/US01/44866

more than 100 amino acid residues of the TGF- $\beta$ -R polypeptide of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.

In addition, related TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecules also include those molecules which comprise nucleotide sequences which hybridize under moderately or highly stringent conditions as defined herein with the fully complementary sequence of the TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecule of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, or of a molecule encoding a polypeptide, which polypeptide comprises the amino acid sequence as shown in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or of a nucleic acid fragment as defined herein, or of a nucleic acid fragment encoding a polypeptide as defined herein. Hybridization probes may be prepared using the TGF- $\beta$ -R sequences provided herein to screen cDNA, genomic or synthetic DNA libraries for related sequences. Regions of the DNA and/or amino acid sequence of TGF- $\beta$ -R polypeptide that exhibit significant identity to known sequences are readily determined using sequence alignment algorithms as described herein and those regions may be used to design probes for screening.

The term "highly stringent conditions" refers to those conditions that are designed to permit hybridization of DNA strands whose sequences are highly complementary, and to exclude hybridization of significantly mismatched DNAs. Hybridization stringency is principally determined by temperature, ionic strength, and the concentration of denaturing agents such as formamide. Examples of "highly stringent conditions" for hybridization and washing are 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate at 65-68°C or 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate, and 50% formamide at 42°C. See Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* Ch. 4 (IRL Press Limited).

More stringent conditions (such as higher temperature, lower ionic strength, higher formamide, or other denaturing agent) may also be used – however, the rate of hybridization will be affected. Other agents may be included in the hybridization and washing buffers for the purpose of reducing non-specific and/or background hybridization. Examples are 0.1% bovine serum albumin, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% sodium pyrophosphate, 0.1% sodium dodecylsulfate, NaDodSO<sub>4</sub>,

WO 02/44379

PCT/US01/44866

(SDS), ficoll, Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (or another non-complementary DNA), and dextran sulfate, although other suitable agents can also be used. The concentration and types of these additives can be changed without substantially affecting the stringency of the hybridization conditions. Hybridization experiments are usually carried out at pH 6.8-7.4; however, at typical ionic strength conditions, the rate of hybridization is nearly independent of pH. See Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* Ch. 4 (IRL Press Limited).

Factors affecting the stability of DNA duplex include base composition, length, and degree of base pair mismatch. Hybridization conditions can be adjusted by one skilled in the art in order to accommodate these variables and allow DNAs of different sequence relatedness to form hybrids. The melting temperature of a perfectly matched DNA duplex can be estimated by the following equation:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G+C) - 600/N - 0.72(\%\text{formamide})$$

where N is the length of the duplex formed,  $[\text{Na}^+]$  is the molar concentration of the sodium ion in the hybridization or washing solution, %G+C is the percentage of (guanine+cytosine) bases in the hybrid. For imperfectly matched hybrids, the melting temperature is reduced by approximately 1°C for each 1% mismatch.

The term "moderately stringent conditions" refers to conditions under which a DNA duplex with a greater degree of base pair mismatching than could occur under "highly stringent conditions" is able to form. Examples of typical "moderately stringent conditions" are 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate at 50-65°C or 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate, and 20% formamide at 37-50°C. By way of example, "moderately stringent conditions" of 50°C in 0.015 M sodium ion will allow about a 21% mismatch.

It will be appreciated by those skilled in the art that there is no absolute distinction between "highly stringent conditions" and "moderately stringent conditions." For example, at 0.015 M sodium ion (no formamide), the melting temperature of perfectly matched long DNA is about 71°C. With a wash at 65°C (at the same ionic strength), this would allow for approximately a 6% mismatch. To capture more distantly related sequences, one skilled in the art can simply lower the temperature or raise the ionic strength.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

A good estimate of the melting temperature in 1M NaCl\* for oligonucleotide probes up to about 20nt is given by:

$$T_m = 2^\circ\text{C per A-T base pair} + 4^\circ\text{C per G-C base pair}$$

\*The sodium ion concentration in 6X salt sodium citrate (SSC) is 1M. See Suggs *et al.*, *Developmental Biology Using Purified Genes* 683 (Brown and Fox, eds., 1981).

High stringency washing conditions for oligonucleotides are usually at a temperature of 0-5°C below the  $T_m$  of the oligonucleotide in 6X SSC, 0.1% SDS.

In another embodiment, related nucleic acid molecules comprise or consist of a nucleotide sequence that is at least about 70 percent identical to the nucleotide sequence as shown in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3. In preferred embodiments, the nucleotide sequences are about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the nucleotide sequence as shown in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3. Related nucleic acid molecules encode polypeptides possessing at least one activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.

Differences in the nucleic acid sequence may result in conservative and/or non-conservative modifications of the amino acid sequence relative to the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.

Conservative modifications to the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 (and the corresponding modifications to the encoding nucleotides) will produce a polypeptide having functional and chemical characteristics similar to those of TGF- $\beta$ -R polypeptides. In contrast, substantial modifications in the functional and/or chemical characteristics of TGF- $\beta$ -R polypeptides may be accomplished by selecting substitutions in the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 8 that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the molecular backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain.

For example, a "conservative amino acid substitution" may involve a substitution of a native amino acid residue with a nonnative residue such that there is little or no effect on the polarity or charge of the amino acid residue at that position.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

Furthermore, any native residue in the polypeptide may also be substituted with alanine, as has been previously described for "alanine scanning mutagenesis."

Conservative amino acid substitutions also encompass non-naturally occurring amino acid residues that are typically incorporated by chemical peptide synthesis rather than by synthesis in biological systems. These include peptidomimetics, and  
5 other reversed or inverted forms of amino acid moieties.

Naturally occurring residues may be divided into classes based on common side chain properties:

- 1) hydrophobic: norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 10 2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr;
- 3) acidic: Asp, Glu;
- 4) basic: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- 5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and
- 6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

15 For example, non-conservative substitutions may involve the exchange of a member of one of these classes for a member from another class. Such substituted residues may be introduced into regions of the human TGF- $\beta$ -R polypeptide that are homologous with non-human TGF- $\beta$ -R polypeptides, or into the non-homologous regions of the molecule.

20 In making such changes, the hydropathic index of amino acids may be considered. Each amino acid has been assigned a hydropathic index on the basis of its hydrophobicity and charge characteristics. The hydropathic indices are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-  
25 0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

The importance of the hydropathic amino acid index in conferring interactive biological function on a protein is generally understood in the art (Kyte *et al.*, 1982, *J. Mol. Biol.* 157:105-31). It is known that certain amino acids may be substituted for  
30 other amino acids having a similar hydropathic index or score and still retain a similar biological activity. In making changes based upon the hydropathic index, the

WO 02/44379

PCT/US01/44866

substitution of amino acids whose hydrophobic indices are within  $\pm 2$  is preferred, those that are within  $\pm 1$  are particularly preferred, and those within  $\pm 0.5$  are even more particularly preferred.

It is also understood in the art that the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophilicity, particularly where the biologically functionally equivalent protein or peptide thereby created is intended for use in immunological embodiments, as in the present case. The greatest local average hydrophilicity of a protein, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with its immunogenicity and antigenicity, *i.e.*, with a biological property of the protein.

The following hydrophilicity values have been assigned to these amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate ( $+3.0 \pm 1$ ); glutamate ( $+3.0 \pm 1$ ); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline ( $-0.5 \pm 1$ ); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); and tryptophan (-3.4). In making changes based upon similar hydrophilicity values, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within  $\pm 2$  is preferred, those that are within  $\pm 1$  are particularly preferred, and those within  $\pm 0.5$  are even more particularly preferred. One may also identify epitopes from primary amino acid sequences on the basis of hydrophilicity. These regions are also referred to as "epitopic core regions."

Desired amino acid substitutions (whether conservative or non-conservative) can be determined by those skilled in the art at the time such substitutions are desired. For example, amino acid substitutions can be used to identify important residues of the TGF- $\beta$ -R polypeptide, or to increase or decrease the affinity of the TGF- $\beta$ -R polypeptides described herein. Exemplary amino acid substitutions are set forth in Table I.

Table I

Amino Acid Substitutions

Original Residues	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
-------------------	-------------------------	-------------------------

WO 02/44379

PCT/US01/44866

Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 Diamino-butyric Acid, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucine	Leu

A skilled artisan will be able to determine suitable variants of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 using well-known techniques. For identifying suitable areas of the molecule that may be changed without destroying biological activity, one skilled in the art may target areas not believed to be important 5 for activity. For example, when similar polypeptides with similar activities from the

WO 02/44379

PCT/US01/44866

same species or from other species are known, one skilled in the art may compare the amino acid sequence of a TGF- $\beta$ -R polypeptide to such similar polypeptides. With such a comparison, one can identify residues and portions of the molecules that are conserved among similar polypeptides. It will be appreciated that changes in areas of the TGF- $\beta$ -R molecule that are not conserved relative to such similar polypeptides would be less likely to adversely affect the biological activity and/or structure of a TGF- $\beta$ -R polypeptide. One skilled in the art would also know that, even in relatively conserved regions, one may substitute chemically similar amino acids for the naturally occurring residues while retaining activity (conservative amino acid residue substitutions). Therefore, even areas that may be important for biological activity or for structure may be subject to conservative amino acid substitutions without destroying the biological activity or without adversely affecting the polypeptide structure.

Additionally, one skilled in the art can review structure-function studies identifying residues in similar polypeptides that are important for activity or structure. In view of such a comparison, one can predict the importance of amino acid residues in a TGF- $\beta$ -R polypeptide that correspond to amino acid residues that are important for activity or structure in similar polypeptides. One skilled in the art may opt for chemically similar amino acid substitutions for such predicted important amino acid residues of TGF- $\beta$ -R polypeptides.

One skilled in the art can also analyze the three-dimensional structure and amino acid sequence in relation to that structure in similar polypeptides. In view of such information, one skilled in the art may predict the alignment of amino acid residues of TGF- $\beta$ -R polypeptide with respect to its three dimensional structure. One skilled in the art may choose not to make radical changes to amino acid residues predicted to be on the surface of the protein, since such residues may be involved in important interactions with other molecules. Moreover, one skilled in the art may generate test variants containing a single amino acid substitution at each amino acid residue. The variants could be screened using activity assays known to those with skill in the art. Such variants could be used to gather information about suitable variants. For example, if one discovered that a change to a particular amino acid residue resulted in destroyed, undesirably reduced, or unsuitable activity, variants

WO 02/44379

PCT/US01/44866

with such a change would be avoided. In other words, based on information gathered from such routine experiments, one skilled in the art can readily determine the amino acids where further substitutions should be avoided either alone or in combination with other mutations.

5 A number of scientific publications have been devoted to the prediction of secondary structure. See Moulton, 1996, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:422-27; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 13:222-45; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 113:211-22; Chou *et al.*, 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-48; Chou *et al.*, 1978, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; and Chou *et al.*, 1979, *Biophys. J.* 26:367-84. Moreover, 10 computer programs are currently available to assist with predicting secondary structure. One method of predicting secondary structure is based upon homology modeling. For example, two polypeptides or proteins that have a sequence identity of greater than 30%, or similarity greater than 40%, often have similar structural topologies. The recent growth of the protein structural database (PDB) has provided 15 enhanced predictability of secondary structure, including the potential number of folds within the structure of a polypeptide or protein. See Holm *et al.*, 1999, *Nucleic Acids Res.* 27:244-47. It has been suggested that there are a limited number of folds in a given polypeptide or protein and that once a critical number of structures have been resolved, structural prediction will become dramatically more accurate (Brenner 20 *et al.*, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:369-76).

Additional methods of predicting secondary structure include "threading" (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87; Sippl *et al.*, 1996, *Structure* 4:15-19), "profile analysis" (Bowie *et al.*, 1991, *Science*, 253:164-70; Gribskov *et al.*, 1990, *Methods Enzymol.* 183:146-59; Gribskov *et al.*, 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4355-58), and "evolutionary linkage" (See Holm *et al.*, *supra*, and Brenner *et al.*, *supra*).

Preferred TGF- $\beta$ -R polypeptide variants include glycosylation variants wherein the number and/or type of glycosylation sites have been altered compared to the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. In one 30 embodiment, TGF- $\beta$ -R polypeptide variants comprise a greater or a lesser number of N-linked glycosylation sites than the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. An N-linked glycosylation site is characterized by the

WO 02/44379

PCT/US01/44866

sequence: Asn-X-Ser or Asn-X-Thr, wherein the amino acid residue designated as X may be any amino acid residue except proline. The substitution of amino acid residues to create this sequence provides a potential new site for the addition of an N-linked carbohydrate chain. Alternatively, substitutions that eliminate this sequence will remove an existing N-linked carbohydrate chain. Also provided is a rearrangement of N-linked carbohydrate chains wherein one or more N-linked glycosylation sites (typically those that are naturally occurring) are eliminated and one or more new N-linked sites are created. Additional preferred TGF- $\beta$ -R variants include cysteine variants, wherein one or more cysteine residues are deleted or substituted with another amino acid (*e.g.*, serine) as compared to the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. Cysteine variants are useful when TGF- $\beta$ -R polypeptides must be refolded into a biologically active conformation such as after the isolation of insoluble inclusion bodies. Cysteine variants generally have fewer cysteine residues than the native protein, and typically have an even number to minimize interactions resulting from unpaired cysteines.

In other embodiments, TGF- $\beta$ -R polypeptide variants comprise an amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one amino acid insertion and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or an amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one amino acid deletion and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. TGF- $\beta$ -R polypeptide variants also comprise an amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 wherein the polypeptide has a carboxyl- and/or amino-terminal truncation and further wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. TGF- $\beta$ -R polypeptide variants further comprise an amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, carboxyl-terminal truncations, and amino-terminal truncations and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

In further embodiments, TGF- $\beta$ -R polypeptide variants comprise an amino acid sequence that is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. In preferred embodiments, TGF- $\beta$ -R polypeptide variants comprise an amino acid sequence that is at least about  
5 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical percent to the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. TGF- $\beta$ -R polypeptide variants possess at least one activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.

10 In addition, the polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or other TGF- $\beta$ -R polypeptide, may be fused to a homologous polypeptide to form a homodimer or to a heterologous polypeptide to form a heterodimer. Heterologous peptides and polypeptides include, but are not limited to: an epitope to allow for the detection and/or isolation of a TGF- $\beta$ -R fusion  
15 polypeptide; a transmembrane receptor protein or a portion thereof, such as an extracellular domain or a transmembrane and intracellular domain; a ligand or a portion thereof which binds to a transmembrane receptor protein; an enzyme or portion thereof which is catalytically active; a polypeptide or peptide which promotes oligomerization, such as a leucine zipper domain; a polypeptide or peptide which  
20 increases stability, such as an immunoglobulin constant region; and a polypeptide which has a therapeutic activity different from the polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or other TGF- $\beta$ -R polypeptide.

Fusions can be made either at the amino-terminus or at the carboxyl-terminus  
25 of the polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or other TGF- $\beta$ -R polypeptide. Fusions may be direct with no linker or adapter molecule or may be through a linker or adapter molecule. A linker or adapter molecule may be one or more amino acid residues, typically from about 20 to about 50 amino acid residues. A linker or adapter molecule may also be  
30 designed with a cleavage site for a DNA restriction endonuclease or for a protease to allow for the separation of the fused moieties. It will be appreciated that once

WO 02/44379

PCT/US01/44866

constructed, the fusion polypeptides can be derivatized according to the methods described herein.

In a further embodiment of the invention, the polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or other TGF- $\beta$ -R polypeptide, is fused to one or more domains of an Fc region of human IgG. Antibodies comprise two functionally independent parts, a variable domain known as "Fab," that binds an antigen, and a constant domain known as "Fc," that is involved in effector functions such as complement activation and attack by phagocytic cells. An Fc has a long serum half-life, whereas an Fab is short-lived. Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337:525-31. When constructed together with a therapeutic protein, an Fc domain can provide longer half-life or incorporate such functions as Fc receptor binding, protein A binding, complement fixation, and perhaps even placental transfer. *Id.* Table II summarizes the use of certain Fc fusions known in the art.

15

Table II  
Fc Fusion with Therapeutic Proteins

Form of Fc	Fusion partner	Therapeutic implications	Reference
IgG1	N-terminus of CD30-L	Hodgkin's disease; anaplastic lymphoma; T-cell leukemia	U.S. Patent No. 5,480,981
Murine Fc $\gamma$ 2a	IL-10	anti-inflammatory; transplant rejection	Zheng <i>et al.</i> , 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNF receptor	septic shock	Fisher <i>et al.</i> , 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697-1702; Van Zee <i>et al.</i> , 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, or IgE (excluding the first domain)	TNF receptor	inflammation, autoimmune disorders	U.S. Patent No. 5,808,029
IgG1	CD4 receptor	AIDS	Capon <i>et al.</i> , 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	N-terminus of IL-2	anti-cancer, antiviral	Harvill <i>et al.</i> , 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	C-terminus of OPG	osteoarthritis; bone density	WO 97/23614
IgG1	N-terminus of leptin	anti-obesity	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997

WO 02/44379

PCT/US01/44866

Human Ig C $\gamma$ 1	CTLA-4	autoimmune disorders	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69
-----------------------	--------	----------------------	---

In one example, a human IgG hinge, CH2, and CH3 region may be fused at either the amino-terminus or carboxyl-terminus of the TGF- $\beta$ -R polypeptides using methods known to the skilled artisan. In another example, a human IgG hinge, CH2, and CH3 region may be fused at either the amino-terminus or carboxyl-terminus of a TGF- $\beta$ -R polypeptide fragment (e.g., the predicted extracellular portion of TGF- $\beta$ -R polypeptide).

The resulting TGF- $\beta$ -R fusion polypeptide may be purified by use of a Protein A affinity column. Peptides and proteins fused to an Fc region have been found to exhibit a substantially greater half-life *in vivo* than the unfused counterpart. Also, a fusion to an Fc region allows for dimerization/multimerization of the fusion polypeptide. The Fc region may be a naturally occurring Fc region, or may be altered to improve certain qualities, such as therapeutic qualities, circulation time, or reduced aggregation.

Identity and similarity of related nucleic acid molecules and polypeptides are readily calculated by known methods. Such methods include, but are not limited to those described in *Computational Molecular Biology* (A.M. Lesk, ed., Oxford University Press 1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (D.W. Smith, ed., Academic Press 1993); *Computer Analysis of Sequence Data* (Part 1, A.M. Griffin and H.G. Griffin, eds., Humana Press 1994); G. von Heinle, *Sequence Analysis in Molecular Biology* (Academic Press 1987); *Sequence Analysis Primer* (M. Gribskov and J. Devereux, eds., M. Stockton Press 1991); and Carillo *et al.*, 1988, *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073.

Preferred methods to determine identity and/or similarity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine identity and similarity are described in publicly available computer programs. Preferred computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package, including GAP (Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Res.* 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul *et al.*, 1990, *J.*

WO 02/44379

PCT/US01/44866

*Mol. Biol.* 215:403-10). The BLASTX program is publicly available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and other sources (Altschul *et al.*, *BLAST Manual* (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschul *et al.*, 1990, *supra*). The well-known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

5 Certain alignment schemes for aligning two amino acid sequences may result in the matching of only a short region of the two sequences, and this small aligned region may have very high sequence identity even though there is no significant relationship between the two full-length sequences. Accordingly, in a preferred embodiment, the selected alignment method (GAP program) will result in an  
10 alignment that spans at least 50 contiguous amino acids of the claimed polypeptide.

For example, using the computer algorithm GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), two polypeptides for which the percent sequence identity is to be determined are aligned for optimal matching of their respective amino acids (the "matched span," as determined by the algorithm). A gap  
15 opening penalty (which is calculated as 3X the average diagonal; the "average diagonal" is the average of the diagonal of the comparison matrix being used; the "diagonal" is the score or number assigned to each perfect amino acid match by the particular comparison matrix) and a gap extension penalty (which is usually 0.1X the gap opening penalty), as well as a comparison matrix such as PAM 250 or BLOSUM  
20 62 are used in conjunction with the algorithm. A standard comparison matrix is also used by the algorithm (see Dayhoff *et al.*, 5 *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Supp. 3 1978)(PAM250 comparison matrix); Henikoff *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:10915-19 (BLOSUM 62 comparison matrix)).

Preferred parameters for polypeptide sequence comparison include the  
25 following:

Algorithm: Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443-53;

Comparison matrix: BLOSUM 62 (Henikoff *et al.*, *supra*);

Gap Penalty: 12

30 Gap Length Penalty: 4

Threshold of Similarity: 0

WO 02/44379

PCT/US01/44866

The GAP program is useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for polypeptide comparisons (along with no penalty for end gaps) using the GAP algorithm.

5 Preferred parameters for nucleic acid molecule sequence comparison include the following:

Algorithm: Needleman and Wunsch, *supra*;  
Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0  
Gap Penalty: 50  
10 Gap Length Penalty: 3

The GAP program is also useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for nucleic acid molecule comparisons.

15 Other exemplary algorithms, gap opening penalties, gap extension penalties, comparison matrices, and thresholds of similarity may be used, including those set forth in the Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997. The particular choices to be made will be apparent to those of skill in the art and will depend on the specific comparison to be made, such as DNA-to-DNA, protein-to-protein, protein-to-DNA; and additionally, whether the comparison is between given  
20 pairs of sequences (in which case GAP or BestFit are generally preferred) or between one sequence and a large database of sequences (in which case FASTA or BLASTA are preferred).

#### Nucleic Acid Molecules

25 The nucleic acid molecules encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence of a TGF- $\beta$ -R polypeptide can readily be obtained in a variety of ways including, without limitation, chemical synthesis, cDNA or genomic library screening, expression library screening, and/or PCR amplification of cDNA.

30 Recombinant DNA methods used herein are generally those set forth in Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) and/or *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994). The invention provides

WO 02/44379

PCT/US01/44866

for nucleic acid molecules as described herein and methods for obtaining such molecules.

Where a gene encoding the amino acid sequence of a TGF- $\beta$ -R polypeptide has been identified from one species, all or a portion of that gene may be used as a probe to identify orthologs or related genes from the same species. The probes or primers may be used to screen cDNA libraries from various tissue sources believed to express the TGF- $\beta$ -R polypeptide. In addition, part or all of a nucleic acid molecule having the sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3 may be used to screen a genomic library to identify and isolate a gene encoding the amino acid sequence of a TGF- $\beta$ -R polypeptide. Typically, conditions of moderate or high stringency will be employed for screening to minimize the number of false positives obtained from the screening.

Nucleic acid molecules encoding the amino acid sequence of TGF- $\beta$ -R polypeptides may also be identified by expression cloning which employs the detection of positive clones based upon a property of the expressed protein. Typically, nucleic acid libraries are screened by the binding an antibody or other binding partner (*e.g.*, receptor or ligand) to cloned proteins that are expressed and displayed on a host cell surface. The antibody or binding partner is modified with a detectable label to identify those cells expressing the desired clone.

Recombinant expression techniques conducted in accordance with the descriptions set forth below may be followed to produce these polynucleotides and to express the encoded polypeptides. For example, by inserting a nucleic acid sequence that encodes the amino acid sequence of a TGF- $\beta$ -R polypeptide into an appropriate vector, one skilled in the art can readily produce large quantities of the desired nucleotide sequence. The sequences can then be used to generate detection probes or amplification primers. Alternatively, a polynucleotide encoding the amino acid sequence of a TGF- $\beta$ -R polypeptide can be inserted into an expression vector. By introducing the expression vector into an appropriate host, the encoded TGF- $\beta$ -R polypeptide may be produced in large amounts.

Another method for obtaining a suitable nucleic acid sequence is the polymerase chain reaction (PCR). In this method, cDNA is prepared from poly(A)-RNA or total RNA using the enzyme reverse transcriptase. Two primers,

WO 02/44379

PCT/US01/44866

typically complementary to two separate regions of cDNA encoding the amino acid sequence of a TGF- $\beta$ -R polypeptide, are then added to the cDNA along with a polymerase such as *Taq* polymerase, and the polymerase amplifies the cDNA region between the two primers.

5 Another means of preparing a nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a TGF- $\beta$ -R polypeptide is chemical synthesis using methods well known to the skilled artisan such as those described by Engels *et al.*, 1989, *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28:716-34. These methods include, *inter alia*, the phosphotriester, phosphoramidite, and H-phosphonate methods for nucleic acid synthesis. A preferred  
10 method for such chemical synthesis is polymer-supported synthesis using standard phosphoramidite chemistry. Typically, the DNA encoding the amino acid sequence of a TGF- $\beta$ -R polypeptide will be several hundred nucleotides in length. Nucleic acids larger than about 100 nucleotides can be synthesized as several fragments using these methods. The fragments can then be ligated together to form the full-length  
15 nucleotide sequence of a TGF- $\beta$ -R gene. Usually, the DNA fragment encoding the amino-terminus of the polypeptide will have an ATG, which encodes a methionine residue. This methionine may or may not be present on the mature form of the TGF- $\beta$ -R polypeptide, depending on whether the polypeptide produced in the host cell is designed to be secreted from that cell. Other methods known to the skilled  
20 artisan may be used as well.

In certain embodiments, nucleic acid variants contain codons which have been altered for optimal expression of a TGF- $\beta$ -R polypeptide in a given host cell. Particular codon alterations will depend upon the TGF- $\beta$ -R polypeptide and host cell selected for expression. Such "codon optimization" can be carried out by a variety of  
25 methods, for example, by selecting codons which are preferred for use in highly expressed genes in a given host cell. Computer algorithms which incorporate codon frequency tables such as "Eco\_high.Cod" for codon preference of highly expressed bacterial genes may be used and are provided by the University of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI). Other useful codon  
30 frequency tables include "Celegans\_high.cod," "Celegans\_low.cod," "Drosophila\_high.cod," "Human\_high.cod," "Maize\_high.cod," and "Yeast\_high.cod."

WO 02/44379

PCT/US01/44866

In some cases, it may be desirable to prepare nucleic acid molecules encoding TGF- $\beta$ -R polypeptide variants. Nucleic acid molecules encoding variants may be produced using site directed mutagenesis, PCR amplification, or other appropriate methods, where the primer(s) have the desired point mutations (see Sambrook *et al.*,  
5 *supra*, and Ausubel *et al.*, *supra*, for descriptions of mutagenesis techniques). Chemical synthesis using methods described by Engels *et al.*, *supra*, may also be used to prepare such variants. Other methods known to the skilled artisan may be used as well.

#### 10 Vectors and Host Cells

A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a TGF- $\beta$ -R polypeptide is inserted into an appropriate expression vector using standard ligation techniques. The vector is typically selected to be functional in the particular host cell employed (*i.e.*, the vector is compatible with the host cell machinery such that  
15 amplification of the gene and/or expression of the gene can occur). A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a TGF- $\beta$ -R polypeptide may be amplified/expressed in prokaryotic, yeast, insect (baculovirus systems) and/or eukaryotic host cells. Selection of the host cell will depend in part on whether a TGF- $\beta$ -R polypeptide is to be post-translationally modified (*e.g.*, glycosylated and/or  
20 phosphorylated). If so, yeast, insect, or mammalian host cells are preferable. For a review of expression vectors, see *Meth. Enz.*, vol. 185 (D.V. Goeddel, ed., Academic Press 1990).

Typically, expression vectors used in any of the host cells will contain sequences for plasmid maintenance and for cloning and expression of exogenous  
25 nucleotide sequences. Such sequences, collectively referred to as "flanking sequences" in certain embodiments will typically include one or more of the following nucleotide sequences: a promoter, one or more enhancer sequences, an origin of replication, a transcriptional termination sequence, a complete intron sequence containing a donor and acceptor splice site, a sequence encoding a leader  
30 sequence for polypeptide secretion, a ribosome binding site, a polyadenylation sequence, a polylinker region for inserting the nucleic acid encoding the polypeptide

WO 02/44379

PCT/US01/44866

to be expressed, and a selectable marker element. Each of these sequences is discussed below.

Optionally, the vector may contain a "tag"-encoding sequence, *i.e.*, an oligonucleotide molecule located at the 5' or 3' end of the TGF- $\beta$ -R polypeptide coding sequence; the oligonucleotide sequence encodes polyHis (such as hexaHis), or another "tag" such as FLAG, HA (hemagglutinin influenza virus), or *myc* for which commercially available antibodies exist. This tag is typically fused to the polypeptide upon expression of the polypeptide, and can serve as a means for affinity purification of the TGF- $\beta$ -R polypeptide from the host cell. Affinity purification can be accomplished, for example, by column chromatography using antibodies against the tag as an affinity matrix. Optionally, the tag can subsequently be removed from the purified TGF- $\beta$ -R polypeptide by various means such as using certain peptidases for cleavage.

Flanking sequences may be homologous (*i.e.*, from the same species and/or strain as the host cell), heterologous (*i.e.*, from a species other than the host cell species or strain), hybrid (*i.e.*, a combination of flanking sequences from more than one source), or synthetic, or the flanking sequences may be native sequences that normally function to regulate TGF- $\beta$ -R polypeptide expression. As such, the source of a flanking sequence may be any prokaryotic or eukaryotic organism, any vertebrate or invertebrate organism, or any plant, provided that the flanking sequence is functional in, and can be activated by, the host cell machinery.

Flanking sequences useful in the vectors of this invention may be obtained by any of several methods well known in the art. Typically, flanking sequences useful herein -- other than the TGF- $\beta$ -R gene flanking sequences -- will have been previously identified by mapping and/or by restriction endonuclease digestion and can thus be isolated from the proper tissue source using the appropriate restriction endonucleases. In some cases, the full nucleotide sequence of a flanking sequence may be known. Here, the flanking sequence may be synthesized using the methods described herein for nucleic acid synthesis or cloning.

Where all or only a portion of the flanking sequence is known, it may be obtained using PCR and/or by screening a genomic library with a suitable oligonucleotide and/or flanking sequence fragment from the same or another species.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

Where the flanking sequence is not known, a fragment of DNA containing a flanking sequence may be isolated from a larger piece of DNA that may contain, for example, a coding sequence or even another gene or genes. Isolation may be accomplished by restriction endonuclease digestion to produce the proper DNA fragment followed by  
5 isolation using agarose gel purification, Qiagen® column chromatography (Chatsworth, CA), or other methods known to the skilled artisan. The selection of suitable enzymes to accomplish this purpose will be readily apparent to one of ordinary skill in the art.

An origin of replication is typically a part of those prokaryotic expression  
10 vectors purchased commercially, and the origin aids in the amplification of the vector in a host cell. Amplification of the vector to a certain copy number can, in some cases, be important for the optimal expression of a TGF-β-R polypeptide. If the vector of choice does not contain an origin of replication site, one may be chemically synthesized based on a known sequence, and ligated into the vector. For example,  
15 the origin of replication from the plasmid pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) is suitable for most gram-negative bacteria and various origins (*e.g.*, SV40, polyoma, adenovirus, vesicular stomatitis virus (VSV), or papillomaviruses such as HPV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells. Generally, the origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors (for  
20 example, the SV40 origin is often used only because it contains the early promoter).

A transcription termination sequence is typically located 3' of the end of a polypeptide coding region and serves to terminate transcription. Usually, a transcription termination sequence in prokaryotic cells is a G-C rich fragment followed by a poly-T sequence. While the sequence is easily cloned from a library or  
25 even purchased commercially as part of a vector, it can also be readily synthesized using methods for nucleic acid synthesis such as those described herein.

A selectable marker gene element encodes a protein necessary for the survival and growth of a host cell grown in a selective culture medium. Typical selection marker genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins,  
30 *e.g.*, ampicillin, tetracycline, or kanamycin for prokaryotic host cells; (b) complement auxotrophic deficiencies of the cell; or (c) supply critical nutrients not available from complex media. Preferred selectable markers are the kanamycin resistance gene, the

WO 02/44379

PCT/US01/44866

ampicillin resistance gene, and the tetracycline resistance gene. A neomycin resistance gene may also be used for selection in prokaryotic and eukaryotic host cells.

Other selection genes may be used to amplify the gene that will be expressed.

- 5 Amplification is the process wherein genes that are in greater demand for the production of a protein critical for growth are reiterated in tandem within the chromosomes of successive generations of recombinant cells. Examples of suitable selectable markers for mammalian cells include dihydrofolate reductase (DHFR) and thymidine kinase. The mammalian cell transformants are placed under selection  
10 pressure wherein only the transformants are uniquely adapted to survive by virtue of the selection gene present in the vector. Selection pressure is imposed by culturing the transformed cells under conditions in which the concentration of selection agent in the medium is successively changed, thereby leading to the amplification of both the selection gene and the DNA that encodes a TGF- $\beta$ -R polypeptide. As a result,  
15 increased quantities of TGF- $\beta$ -R polypeptide are synthesized from the amplified DNA.

- A ribosome binding site is usually necessary for translation initiation of mRNA and is characterized by a Shine-Dalgarno sequence (prokaryotes) or a Kozak sequence (eukaryotes). The element is typically located 3' to the promoter and 5' to  
20 the coding sequence of a TGF- $\beta$ -R polypeptide to be expressed. The Shine-Dalgarno sequence is varied but is typically a polypurine (*i.e.*, having a high A-G content). Many Shine-Dalgarno sequences have been identified, each of which can be readily synthesized using methods set forth herein and used in a prokaryotic vector.

- 25 A leader, or signal, sequence may be used to direct a TGF- $\beta$ -R polypeptide out of the host cell. Typically, a nucleotide sequence encoding the signal sequence is positioned in the coding region of a TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecule, or directly at the 5' end of a TGF- $\beta$ -R polypeptide coding region. Many signal sequences have been identified, and any of those that are functional in the selected host cell may be  
30 used in conjunction with a TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecule. Therefore, a signal sequence may be homologous (naturally occurring) or heterologous to the TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecule. Additionally, a signal sequence may be chemically

WO 02/44379

PCT/US01/44866

synthesized using methods described herein. In most cases, the secretion of a TGF- $\beta$ -R polypeptide from the host cell via the presence of a signal peptide will result in the removal of the signal peptide from the secreted TGF- $\beta$ -R polypeptide. The signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of a

5 TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecule that is inserted into the vector.

Included within the scope of this invention is the use of either a nucleotide sequence encoding a native TGF- $\beta$ -R polypeptide signal sequence joined to a TGF- $\beta$ -R polypeptide coding region or a nucleotide sequence encoding a heterologous signal sequence joined to a TGF- $\beta$ -R polypeptide coding region. The

10 heterologous signal sequence selected should be one that is recognized and processed, *i.e.*, cleaved by a signal peptidase, by the host cell. For prokaryotic host cells that do not recognize and process the native TGF- $\beta$ -R polypeptide signal sequence, the signal sequence is substituted by a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, or heat-stable enterotoxin II

15 leaders. For yeast secretion, the native TGF- $\beta$ -R polypeptide signal sequence may be substituted by the yeast invertase, alpha factor, or acid phosphatase leaders. In mammalian cell expression the native signal sequence is satisfactory, although other mammalian signal sequences may be suitable.

In some cases, such as where glycosylation is desired in a eukaryotic host cell

20 expression system, one may manipulate the various presequences to improve glycosylation or yield. For example, one may alter the peptidase cleavage site of a particular signal peptide, or add pro-sequences, which also may affect glycosylation. The final protein product may have, in the -1 position (relative to the first amino acid of the mature protein) one or more additional amino acids incident to expression,

25 which may not have been totally removed. For example, the final protein product may have one or two amino acid residues found in the peptidase cleavage site, attached to the amino-terminus. Alternatively, use of some enzyme cleavage sites may result in a slightly truncated form of the desired TGF- $\beta$ -R polypeptide, if the enzyme cuts at such area within the mature polypeptide.

30 In many cases, transcription of a nucleic acid molecule is increased by the presence of one or more introns in the vector; this is particularly true where a polypeptide is produced in eukaryotic host cells, especially mammalian host cells.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

The introns used may be naturally occurring within the TGF- $\beta$ -R gene especially where the gene used is a full-length genomic sequence or a fragment thereof. Where the intron is not naturally occurring within the gene (as for most cDNAs), the intron may be obtained from another source. The position of the intron with respect to flanking sequences and the TGF- $\beta$ -R gene is generally important, as the intron must be transcribed to be effective. Thus, when a TGF- $\beta$ -R cDNA molecule is being transcribed, the preferred position for the intron is 3' to the transcription start site and 5' to the poly-A transcription termination sequence. Preferably, the intron or introns will be located on one side or the other (*i.e.*, 5' or 3') of the cDNA such that it does not interrupt the coding sequence. Any intron from any source, including viral, prokaryotic and eukaryotic (plant or animal) organisms, may be used to practice this invention, provided that it is compatible with the host cell into which it is inserted. Also included herein are synthetic introns. Optionally, more than one intron may be used in the vector.

The expression and cloning vectors of the present invention will typically contain a promoter that is recognized by the host organism and operably linked to the molecule encoding the TGF- $\beta$ -R polypeptide. Promoters are untranscribed sequences located upstream (*i.e.*, 5') to the start codon of a structural gene (generally within about 100 to 1000 bp) that control the transcription of the structural gene. Promoters are conventionally grouped into one of two classes: inducible promoters and constitutive promoters. Inducible promoters initiate increased levels of transcription from DNA under their control in response to some change in culture conditions, such as the presence or absence of a nutrient or a change in temperature. Constitutive promoters, on the other hand, initiate continual gene product production; that is, there is little or no control over gene expression. A large number of promoters, recognized by a variety of potential host cells, are well known. A suitable promoter is operably linked to the DNA encoding TGF- $\beta$ -R polypeptide by removing the promoter from the source DNA by restriction enzyme digestion and inserting the desired promoter sequence into the vector. The native TGF- $\beta$ -R promoter sequence may be used to direct amplification and/or expression of a TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecule. A heterologous promoter is preferred, however, if it permits greater transcription and higher yields of the expressed protein as compared to the native

WO 02/44379

PCT/US01/44866

promoter, and if it is compatible with the host cell system that has been selected for use.

Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the beta-lactamase and lactose promoter systems; alkaline phosphatase; a tryptophan (trp) promoter system; and hybrid promoters such as the tac promoter. Other known bacterial promoters are also suitable. Their sequences have been published, thereby enabling one skilled in the art to ligate them to the desired DNA sequence, using linkers or adapters as needed to supply any useful restriction sites.

Suitable promoters for use with yeast hosts are also well known in the art. Yeast enhancers are advantageously used with yeast promoters. Suitable promoters for use with mammalian host cells are well known and include, but are not limited to, those obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, retroviruses, hepatitis-B virus and most preferably Simian Virus 40 (SV40). Other suitable mammalian promoters include heterologous mammalian promoters, for example, heat-shock promoters and the actin promoter.

Additional promoters which may be of interest in controlling TGF- $\beta$ -R gene expression include, but are not limited to: the SV40 early promoter region (Bernoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-10); the CMV promoter; the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-97); the herpes thymidine kinase promoter (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-45); the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); prokaryotic expression vectors such as the beta-lactamase promoter (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-31); or the tac promoter (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25). Also of interest are the following animal transcriptional control regions, which exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals: the elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-46; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); the insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-22); the immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid

WO 02/44379

PCT/US01/44866

cells (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-58; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-38; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-44); the mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:435-95); the albumin gene control region which is active in liver (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-76); the alpha-feto-protein gene control region which is active in liver (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-48; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 235:53-58); the alpha 1-antitrypsin gene control region which is active in the liver (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-71); the beta-globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogram *et al.*, 10 1985, *Nature* 315:338-40; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); the myelin basic protein gene control region which is active in oligodendrocyte cells in the brain (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-12); the myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, 1985, *Nature* 314:283-86); and the gonadotropic releasing hormone gene control region which is active in the 15 hypothalamus (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-78).

An enhancer sequence may be inserted into the vector to increase the transcription of a DNA encoding a TGF- $\beta$ -R polypeptide of the present invention by higher eukaryotes. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about 10-300 bp in length, that act on the promoter to increase transcription. Enhancers are 20 relatively orientation and position independent. They have been found 5' and 3' to the transcription unit. Several enhancer sequences available from mammalian genes are known (*e.g.*, globin, elastase, albumin, alpha-feto-protein and insulin). Typically, however, an enhancer from a virus will be used. The SV40 enhancer, the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer, and adenovirus 25 enhancers are exemplary enhancing elements for the activation of eukaryotic promoters. While an enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to a TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecule, it is typically located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors of the invention may be constructed from a starting vector 30 such as a commercially available vector. Such vectors may or may not contain all of the desired flanking sequences. Where one or more of the flanking sequences described herein are not already present in the vector, they may be individually

WO 02/44379

PCT/US01/44866

obtained and ligated into the vector. Methods used for obtaining each of the flanking sequences are well known to one skilled in the art.

Preferred vectors for practicing this invention are those that are compatible with bacterial, insect, and mammalian host cells. Such vectors include, *inter alia*, pCRII, pCR3, and pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA), pBSII (Stratagene, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-alpha (International Pub. No. WO 90/14363) and pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY).

Additional suitable vectors include, but are not limited to, cosmids, plasmids, or modified viruses, but it will be appreciated that the vector system must be compatible with the selected host cell. Such vectors include, but are not limited to plasmids such as Bluescript<sup>®</sup> plasmid derivatives (a high copy number ColE1-based phagemid; Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA), PCR cloning plasmids designed for cloning Taq-amplified PCR products (*e.g.*, TOPO<sup>™</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kit and PCR2.1<sup>®</sup> plasmid derivatives; Invitrogen), and mammalian, yeast or virus vectors such as a baculovirus expression system (pBacPAK plasmid derivatives; Clontech).

After the vector has been constructed and a nucleic acid molecule encoding a TGF- $\beta$ -R polypeptide has been inserted into the proper site of the vector, the completed vector may be inserted into a suitable host cell for amplification and/or polypeptide expression. The transformation of an expression vector for a TGF- $\beta$ -R polypeptide into a selected host cell may be accomplished by well known methods including methods such as transfection, infection, calcium chloride, electroporation, microinjection, lipofection, DEAE-dextran method, or other known techniques. The method selected will in part be a function of the type of host cell to be used. These methods and other suitable methods are well known to the skilled artisan, and are set forth, for example, in Sambrook *et al.*, *supra*.

Host cells may be prokaryotic host cells (such as *E. coli*) or eukaryotic host cells (such as a yeast, insect, or vertebrate cell). The host cell, when cultured under appropriate conditions, synthesizes a TGF- $\beta$ -R polypeptide that can subsequently be collected from the culture medium (if the host cell secretes it into the medium) or directly from the host cell producing it (if it is not secreted). The selection of an

WO 02/44379

PCT/US01/44866

appropriate host cell will depend upon various factors, such as desired expression levels, polypeptide modifications that are desirable or necessary for activity (such as glycosylation or phosphorylation) and ease of folding into a biologically active molecule.

5 A number of suitable host cells are known in the art and many are available from the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA. Examples include, but are not limited to, mammalian cells, such as Chinese hamster ovary cells (CHO), CHO DHFR(-) cells (Urlaub *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:4216-20), human embryonic kidney (HEK) 293 or 293T cells, or 3T3 cells. The  
10 selection of suitable mammalian host cells and methods for transformation, culture, amplification, screening, product production, and purification are known in the art. Other suitable mammalian cell lines, are the monkey COS-1 and COS-7 cell lines, and the CV-1 cell line. Further exemplary mammalian host cells include primate cell lines and rodent cell lines, including transformed cell lines. Normal diploid cells, cell  
15 strains derived from *in vitro* culture of primary tissue, as well as primary explants, are also suitable. Candidate cells may be genotypically deficient in the selection gene, or may contain a dominantly acting selection gene. Other suitable mammalian cell lines include but are not limited to, mouse neuroblastoma N2A cells, HeLa, mouse L-929 cells, 3T3 lines derived from Swiss, Balb-c or NIH mice, BHK or HaK hamster cell  
20 lines. Each of these cell lines is known by and available to those skilled in the art of protein expression.

Similarly useful as host cells suitable for the present invention are bacterial cells. For example, the various strains of *E. coli* (*e.g.*, HB101, DH5 $\alpha$ , DH10, and MC1061) are well-known as host cells in the field of biotechnology. Various strains  
25 of *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, other *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, and the like may also be employed in this method.

Many strains of yeast cells known to those skilled in the art are also available as host cells for the expression of the polypeptides of the present invention. Preferred yeast cells include, for example, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*.

30 Additionally, where desired, insect cell systems may be utilized in the methods of the present invention. Such systems are described, for example, in Kitts *et al.*, 1993, *Biotechniques*, 14:810-17; Lucklow, 1993, *Curr. Opin. Biotechnol.*

WO 02/44379

PCT/US01/44866

4:564-72; and Lucklow *et al.*, 1993, *J. Virol.*, 67:4566-79. Preferred insect cells are Sf-9 and Hi5 (Invitrogen).

One may also use transgenic animals to express glycosylated TGF- $\beta$ -R polypeptides. For example, one may use a transgenic milk-producing animal (a cow or goat, for example) and obtain the present glycosylated polypeptide in the animal milk. One may also use plants to produce TGF- $\beta$ -R polypeptides, however, in general, the glycosylation occurring in plants is different from that produced in mammalian cells, and may result in a glycosylated product which is not suitable for human therapeutic use.

10

#### Polypeptide Production

Host cells comprising a TGF- $\beta$ -R polypeptide expression vector may be cultured using standard media well known to the skilled artisan. The media will usually contain all nutrients necessary for the growth and survival of the cells. Suitable media for culturing *E. coli* cells include, for example, Luria Broth (LB) and/or Terrific Broth (TB). Suitable media for culturing eukaryotic cells include Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640), Minimal Essential Medium (MEM) and/or Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), all of which may be supplemented with serum and/or growth factors as necessary for the particular cell line being cultured. A suitable medium for insect cultures is Grace's medium supplemented with yeastolate, lactalbumin hydrolysate, and/or fetal calf serum as necessary.

Typically, an antibiotic or other compound useful for selective growth of transfected or transformed cells is added as a supplement to the media. The compound to be used will be dictated by the selectable marker element present on the plasmid with which the host cell was transformed. For example, where the selectable marker element is kanamycin resistance, the compound added to the culture medium will be kanamycin. Other compounds for selective growth include ampicillin, tetracycline, and neomycin.

The amount of a TGF- $\beta$ -R polypeptide produced by a host cell can be evaluated using standard methods known in the art. Such methods include, without limitation, Western blot analysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, non-

WO 02/44379

PCT/US01/44866

denaturing gel electrophoresis, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation, immunoprecipitation, and/or activity assays such as DNA binding gel shift assays.

5 If a TGF- $\beta$ -R polypeptide has been designed to be secreted from the host cells, the majority of polypeptide may be found in the cell culture medium. If however, the TGF- $\beta$ -R polypeptide is not secreted from the host cells, it will be present in the cytoplasm and/or the nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for gram-negative bacteria host cells).

10 For a TGF- $\beta$ -R polypeptide situated in the host cell cytoplasm and/or nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for bacterial host cells), the intracellular material (including inclusion bodies for gram-negative bacteria) can be extracted from the host cell using any standard technique known to the skilled artisan. For example, the host cells can be lysed to release the contents of the periplasm/cytoplasm by French press, homogenization, and/or sonication followed by  
15 centrifugation.

If a TGF- $\beta$ -R polypeptide has formed inclusion bodies in the cytosol, the inclusion bodies can often bind to the inner and/or outer cellular membranes and thus will be found primarily in the pellet material after centrifugation. The pellet material can then be treated at pH extremes or with a chaotropic agent such as a detergent,  
20 guanidine, guanidine derivatives, urea, or urea derivatives in the presence of a reducing agent such as dithiothreitol at alkaline pH or tris carboxyethyl phosphine at acid pH to release, break apart, and solubilize the inclusion bodies. The solubilized TGF- $\beta$ -R polypeptide can then be analyzed using gel electrophoresis, immunoprecipitation, or the like. If it is desired to isolate the TGF- $\beta$ -R polypeptide,  
25 isolation may be accomplished using standard methods such as those described herein and in Marston *et al.*, 1990, *Meth. Enz.*, 182:264-75.

In some cases, a TGF- $\beta$ -R polypeptide may not be biologically active upon isolation. Various methods for "refolding" or converting the polypeptide to its tertiary structure and generating disulfide linkages can be used to restore biological  
30 activity. Such methods include exposing the solubilized polypeptide to a pH usually above 7 and in the presence of a particular concentration of a chaotrope. The selection of chaotrope is very similar to the choices used for inclusion body

WO 02/44379

PCT/US01/44866

solubilization, but usually the chaotrope is used at a lower concentration and is not necessarily the same as chaotropes used for the solubilization. In most cases the refolding/oxidation solution will also contain a reducing agent or the reducing agent plus its oxidized form in a specific ratio to generate a particular redox potential allowing for disulfide shuffling to occur in the formation of the protein's cysteine bridges. Some of the commonly used redox couples include cysteine/cystamine, glutathione (GSH)/dithiois GSH, cupric chloride, dithiothreitol(DTT)/dithiane DTT, and 2-2-mercaptoethanol(bME)/dithio-b(ME). In many instances, a cosolvent may be used or may be needed to increase the efficiency of the refolding, and the more common reagents used for this purpose include glycerol, polyethylene glycol of various molecular weights, arginine and the like.

If inclusion bodies are not formed to a significant degree upon expression of a TGF- $\beta$ -R polypeptide, then the polypeptide will be found primarily in the supernatant after centrifugation of the cell homogenate. The polypeptide may be further isolated from the supernatant using methods such as those described herein.

The purification of a TGF- $\beta$ -R polypeptide from solution can be accomplished using a variety of techniques. If the polypeptide has been synthesized such that it contains a tag such as Hexahistidine (TGF- $\beta$ -R polypeptide/hexaHis) or other small peptide such as FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) or *myc* (Invitrogen) at either its carboxyl- or amino-terminus, it may be purified in a one-step process by passing the solution through an affinity column where the column matrix has a high affinity for the tag.

For example, polyhistidine binds with great affinity and specificity to nickel. Thus, an affinity column of nickel (such as the Qiagen<sup>®</sup> nickel columns) can be used for purification of TGF- $\beta$ -R polypeptide/polyHis. See, e.g., *Current Protocols in Molecular Biology* § 10.11.8 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1993).

Additionally, TGF- $\beta$ -R polypeptides may be purified through the use of a monoclonal antibody that is capable of specifically recognizing and binding to a TGF- $\beta$ -R polypeptide.

Other suitable procedures for purification include, without limitation, affinity chromatography, immunoaffinity chromatography, ion exchange chromatography,

WO 02/44379

PCT/US01/44866

molecular sieve chromatography, HPLC, electrophoresis (including native gel electrophoresis) followed by gel elution, and preparative isoelectric focusing ("Isoprime" machine/technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA). In some cases, two or more purification techniques may be combined to achieve increased  
5 purity.

TGF- $\beta$ -R polypeptides may also be prepared by chemical synthesis methods (such as solid phase peptide synthesis) using techniques known in the art such as those set forth by Merrifield *et al.*, 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149; Houghten *et al.*, 1985, *Proc Natl Acad. Sci. USA* 82:5132; and Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co. 1984). Such polypeptides may be  
10 synthesized with or without a methionine on the amino-terminus. Chemically synthesized TGF- $\beta$ -R polypeptides may be oxidized using methods set forth in these references to form disulfide bridges. Chemically synthesized TGF- $\beta$ -R polypeptides are expected to have comparable biological activity to the corresponding TGF- $\beta$ -R  
15 polypeptides produced recombinantly or purified from natural sources, and thus may be used interchangeably with a recombinant or natural TGF- $\beta$ -R polypeptide.

Another means of obtaining TGF- $\beta$ -R polypeptide is via purification from biological samples such as source tissues and/or fluids in which the TGF- $\beta$ -R polypeptide is naturally found. Such purification can be conducted using methods for  
20 protein purification as described herein. The presence of the TGF- $\beta$ -R polypeptide during purification may be monitored, for example, using an antibody prepared against recombinantly produced TGF- $\beta$ -R polypeptide or peptide fragments thereof.

A number of additional methods for producing nucleic acids and polypeptides are known in the art, and the methods can be used to produce polypeptides having  
25 specificity for TGF- $\beta$ -R polypeptide. *See, e.g.*, Roberts *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12297-303, which describes the production of fusion proteins between an mRNA and its encoded peptide. *See also*, Roberts, 1999, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:268-73. Additionally, U.S. Patent No. 5,824,469 describes methods for obtaining oligonucleotides capable of carrying out a specific biological function. The  
30 procedure involves generating a heterogeneous pool of oligonucleotides, each having a 5' randomized sequence, a central preselected sequence, and a 3' randomized sequence. The resulting heterogeneous pool is introduced into a population of cells

WO 02/44379

PCT/US01/44866

that do not exhibit the desired biological function. Subpopulations of the cells are then screened for those that exhibit a predetermined biological function. From that subpopulation, oligonucleotides capable of carrying out the desired biological function are isolated.

5 U.S. Patent Nos. 5,763,192; 5,814,476; 5,723,323; and 5,817,483 describe processes for producing peptides or polypeptides. This is done by producing stochastic genes or fragments thereof, and then introducing these genes into host cells which produce one or more proteins encoded by the stochastic genes. The host cells are then screened to identify those clones producing peptides or polypeptides having  
10 the desired activity.

Another method for producing peptides or polypeptides is described in International Pub. No. WO99/15650, filed by Athersys, Inc. Known as "Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery" (RAGE-GD), the process involves the activation of endogenous gene expression or over-expression of a gene  
15 by *in situ* recombination methods. For example, expression of an endogenous gene is activated or increased by integrating a regulatory sequence into the target cell that is capable of activating expression of the gene by non-homologous or illegitimate recombination. The target DNA is first subjected to radiation, and a genetic promoter inserted. The promoter eventually locates a break at the front of a gene, initiating  
20 transcription of the gene. This results in expression of the desired peptide or polypeptide.

It will be appreciated that these methods can also be used to create comprehensive TGF- $\beta$ -R polypeptide expression libraries, which can subsequently be used for high throughput phenotypic screening in a variety of assays, such as  
25 biochemical assays, cellular assays, and whole organism assays (*e.g.*, plant, mouse, etc.).

#### Synthesis

It will be appreciated by those skilled in the art that the nucleic acid and  
30 polypeptide molecules described herein may be produced by recombinant and other means.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

Selective Binding Agents

The term "selective binding agent" refers to a molecule that has specificity for one or more TGF- $\beta$ -R polypeptides. Suitable selective binding agents include, but are not limited to, antibodies and derivatives thereof, polypeptides, and small molecules. Suitable selective binding agents may be prepared using methods known in the art. An exemplary TGF- $\beta$ -R polypeptide selective binding agent of the present invention is capable of binding a certain portion of the TGF- $\beta$ -R polypeptide thereby inhibiting the binding of the polypeptide to a TGF- $\beta$ -R polypeptide receptor.

Selective binding agents such as antibodies and antibody fragments that bind TGF- $\beta$ -R polypeptides are within the scope of the present invention. The antibodies may be polyclonal including monospecific polyclonal; monoclonal (MAbs); recombinant; chimeric; humanized, such as complementarity-determining region (CDR)-grafted; human; single chain; and/or bispecific; as well as fragments; variants; or derivatives thereof. Antibody fragments include those portions of the antibody that bind to an epitope on the TGF- $\beta$ -R polypeptide. Examples of such fragments include Fab and F(ab') fragments generated by enzymatic cleavage of full-length antibodies. Other binding fragments include those generated by recombinant DNA techniques, such as the expression of recombinant plasmids containing nucleic acid sequences encoding antibody variable regions.

Polyclonal antibodies directed toward a TGF- $\beta$ -R polypeptide generally are produced in animals (*e.g.*, rabbits or mice) by means of multiple subcutaneous or intraperitoneal injections of TGF- $\beta$ -R polypeptide and an adjuvant. It may be useful to conjugate a TGF- $\beta$ -R polypeptide to a carrier protein that is immunogenic in the species to be immunized, such as keyhole limpet hemocyanin, serum, albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor. Also, aggregating agents such as alum are used to enhance the immune response. After immunization, the animals are bled and the serum is assayed for anti-TGF- $\beta$ -R antibody titer.

Monoclonal antibodies directed toward TGF- $\beta$ -R polypeptides are produced using any method that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. Examples of suitable methods for preparing monoclonal antibodies include the hybridoma methods of Kohler *et al.*, 1975, *Nature* 256:495-97 and the human B-cell hybridoma method (Kozbor, 1984, *J. Immunol.*

WO 02/44379

PCT/US01/44866

133:3001; Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). Also provided by the invention are hybridoma cell lines that produce monoclonal antibodies reactive with TGF- $\beta$ -R polypeptides.

5 Monoclonal antibodies of the invention may be modified for use as therapeutics. One embodiment is a "chimeric" antibody in which a portion of the heavy (H) and/or light (L) chain is identical with or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is/are identical with or  
10 homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass. Also included are fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity. See U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-55.

In another embodiment, a monoclonal antibody of the invention is a  
15 "humanized" antibody. Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. See U.S. Patent Nos. 5,585,089 and 5,693,762. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source that is non-human. Humanization can be performed, for example, using methods described in the art (Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-25; Riechmann *et al.*, 1998, *Nature* 332:323-27; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-36), by  
20 substituting at least a portion of a rodent complementarity-determining region for the corresponding regions of a human antibody.

Also encompassed by the invention are human antibodies that bind TGF- $\beta$ -R polypeptides. Using transgenic animals (*e.g.*, mice) that are capable of producing a  
25 repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production such antibodies are produced by immunization with a TGF- $\beta$ -R polypeptide antigen (*i.e.*, having at least 6 contiguous amino acids), optionally conjugated to a carrier. See, *e.g.*, Jakobovits *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:2551-55; Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 362:255-58; Bruggermann *et al.*, 1993, *Year in Immuno.* 7:33. In one method, such transgenic animals are produced by  
30 incapacitating the endogenous loci encoding the heavy and light immunoglobulin chains therein, and inserting loci encoding human heavy and light chain proteins into

WO 02/44379

PCT/US01/44866

the genome thereof. Partially modified animals (*i.e.*, those having less than the full complement of modifications) are then cross-bred to obtain an animal having all of the desired immune system modifications. When administered an immunogen, these transgenic animals produce antibodies with human (rather than, *e.g.*, murine) amino acid sequences, including variable regions that are immunospecific for these antigens. *See* International App. Nos. PCT/US96/05928 and PCT/US93/06926. Additional methods are described in U.S. Patent No. 5,545,807, International App. Nos. PCT/US91/245 and PCT/GB89/01207, and in European Patent Nos. 546073B1 and 546073A1. Human antibodies can also be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

In an alternative embodiment, human antibodies can also be produced from phage-display libraries (Hoogenboom *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581). These processes mimic immune selection through the display of antibody repertoires on the surface of filamentous bacteriophage, and subsequent selection of phage by their binding to an antigen of choice. One such technique is described in International App. No. PCT/US98/17364, which describes the isolation of high affinity and functional agonistic antibodies for MPL- and msk-receptors using such an approach.

Chimeric, CDR grafted, and humanized antibodies are typically produced by recombinant methods. Nucleic acids encoding the antibodies are introduced into host cells and expressed using materials and procedures described herein. In a preferred embodiment, the antibodies are produced in mammalian host cells, such as CHO cells. Monoclonal (*e.g.*, human) antibodies may be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

The anti-TGF- $\beta$ -R antibodies of the invention may be employed in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays (Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)) for the detection and quantitation of TGF- $\beta$ -R polypeptides. The antibodies will bind TGF- $\beta$ -R polypeptides with an affinity that is appropriate for the assay method being employed.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

For diagnostic applications, in certain embodiments, anti-TGF- $\beta$ -R antibodies may be labeled with a detectable moiety. The detectable moiety can be any one that is capable of producing, either directly or indirectly, a detectable signal. For example, the detectable moiety may be a radioisotope, such as  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ , or  $^{67}\text{Ga}$ ; a fluorescent or chemiluminescent compound, such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, or luciferin; or an enzyme, such as alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase, or horseradish peroxidase (Bayer, *et al.*, 1990, *Meth. Enz.* 184:138-63).

Competitive binding assays rely on the ability of a labeled standard (*e.g.*, a TGF- $\beta$ -R polypeptide, or an immunologically reactive portion thereof) to compete with the test sample analyte (an TGF- $\beta$ -R polypeptide) for binding with a limited amount of anti-TGF- $\beta$ -R antibody. The amount of a TGF- $\beta$ -R polypeptide in the test sample is inversely proportional to the amount of standard that becomes bound to the antibodies. To facilitate determining the amount of standard that becomes bound, the antibodies typically are insolubilized before or after the competition, so that the standard and analyte that are bound to the antibodies may conveniently be separated from the standard and analyte that remain unbound.

Sandwich assays typically involve the use of two antibodies, each capable of binding to a different immunogenic portion, or epitope, of the protein to be detected and/or quantitated. In a sandwich assay, the test sample analyte is typically bound by a first antibody that is immobilized on a solid support, and thereafter a second antibody binds to the analyte, thus forming an insoluble three-part complex. *See, e.g.*, U.S. Patent No. 4,376,110. The second antibody may itself be labeled with a detectable moiety (direct sandwich assays) or may be measured using an anti-immunoglobulin antibody that is labeled with a detectable moiety (indirect sandwich assays). For example, one type of sandwich assay is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in which case the detectable moiety is an enzyme.

The selective binding agents, including anti-TGF- $\beta$ -R antibodies, are also useful for *in vivo* imaging. An antibody labeled with a detectable moiety may be administered to an animal, preferably into the bloodstream, and the presence and location of the labeled antibody in the host assayed. The antibody may be labeled

WO 02/44379

PCT/US01/44866

with any moiety that is detectable in an animal, whether by nuclear magnetic resonance, radiology, or other detection means known in the art.

Selective binding agents of the invention, including antibodies, may be used as therapeutics. These therapeutic agents are generally agonists or antagonists, in that they either enhance or reduce, respectively, at least one of the biological activities of a TGF- $\beta$ -R polypeptide. In one embodiment, antagonist antibodies of the invention are antibodies or binding fragments thereof which are capable of specifically binding to a TGF- $\beta$ -R polypeptide and which are capable of inhibiting or eliminating the functional activity of a TGF- $\beta$ -R polypeptide *in vivo* or *in vitro*. In preferred 10 embodiments, the selective binding agent, *e.g.*, an antagonist antibody, will inhibit the functional activity of a TGF- $\beta$ -R polypeptide by at least about 50%, and preferably by at least about 80%. In another embodiment, the selective binding agent may be an anti-TGF- $\beta$ -R polypeptide antibody that is capable of interacting with a TGF- $\beta$ -R polypeptide binding partner (a ligand or receptor) thereby inhibiting or eliminating 15 TGF- $\beta$ -R polypeptide activity *in vitro* or *in vivo*. Selective binding agents, including agonist and antagonist anti-TGF- $\beta$ -R polypeptide antibodies, are identified by screening assays that are well known in the art.

The invention also relates to a kit comprising TGF- $\beta$ -R selective binding agents (such as antibodies) and other reagents useful for detecting TGF- $\beta$ -R 20 polypeptide levels in biological samples. Such reagents may include a detectable label, blocking serum, positive and negative control samples, and detection reagents.

#### Microarrays

It will be appreciated that DNA microarray technology can be utilized in accordance with the present invention. DNA microarrays are miniature, high-density 25 arrays of nucleic acids positioned on a solid support, such as glass. Each cell or element within the array contains numerous copies of a single nucleic acid species that acts as a target for hybridization with a complementary nucleic acid sequence (*e.g.*, mRNA). In expression profiling using DNA microarray technology, mRNA is 30 first extracted from a cell or tissue sample and then converted enzymatically to fluorescently labeled cDNA. This material is hybridized to the microarray and unbound cDNA is removed by washing. The expression of discrete genes

WO 02/44379

PCT/US01/44866

represented on the array is then visualized by quantitating the amount of labeled cDNA that is specifically bound to each target nucleic acid molecule. In this way, the expression of thousands of genes can be quantitated in a high throughput, parallel manner from a single sample of biological material.

5 This high throughput expression profiling has a broad range of applications with respect to the TGF- $\beta$ -R molecules of the invention, including, but not limited to: the identification and validation of TGF- $\beta$ -R disease-related genes as targets for therapeutics; molecular toxicology of related TGF- $\beta$ -R molecules and inhibitors thereof; stratification of populations and generation of surrogate markers for clinical  
10 trials; and enhancing related TGF- $\beta$ -R polypeptide small molecule drug discovery by aiding in the identification of selective compounds in high throughput screens.

#### Chemical Derivatives

Chemically modified derivatives of TGF- $\beta$ -R polypeptides may be prepared  
15 by one skilled in the art, given the disclosures described herein. TGF- $\beta$ -R polypeptide derivatives are modified in a manner that is different – either in the type or location of the molecules naturally attached to the polypeptide. Derivatives may include molecules formed by the deletion of one or more naturally-attached chemical groups. The polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO:  
20 2 or SEQ ID NO: 4, or other TGF- $\beta$ -R polypeptide, may be modified by the covalent attachment of one or more polymers. For example, the polymer selected is typically water-soluble so that the protein to which it is attached does not precipitate in an aqueous environment, such as a physiological environment. Included within the scope of suitable polymers is a mixture of polymers. Preferably, for therapeutic use  
25 of the end-product preparation, the polymer will be pharmaceutically acceptable.

The polymers each may be of any molecular weight and may be branched or unbranched. The polymers each typically have an average molecular weight of between about 2 kDa to about 100 kDa (the term “about” indicating that in preparations of a water-soluble polymer, some molecules will weigh more, some less,  
30 than the stated molecular weight). The average molecular weight of each polymer is preferably between about 5 kDa and about 50 kDa, more preferably between about 12 kDa and about 40 kDa and most preferably between about 20 kDa and about 35 kDa.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

Suitable water-soluble polymers or mixtures thereof include, but are not limited to, N-linked or O-linked carbohydrates, sugars, phosphates, polyethylene glycol (PEG) (including the forms of PEG that have been used to derivatize proteins, including mono-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), alkoxy-, or aryloxy-polyethylene glycol), monomethoxy-polyethylene glycol, dextran (such as low molecular weight dextran of, for example, 5 about 6 kD), cellulose, or other carbohydrate based polymers, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols (e.g., glycerol), and polyvinyl alcohol. Also encompassed by the present invention are bifunctional 10 crosslinking molecules that may be used to prepare covalently attached TGF- $\beta$ -R polypeptide multimers.

In general, chemical derivatization may be performed under any suitable condition used to react a protein with an activated polymer molecule. Methods for preparing chemical derivatives of polypeptides will generally comprise the steps of: 15 (a) reacting the polypeptide with the activated polymer molecule (such as a reactive ester or aldehyde derivative of the polymer molecule) under conditions whereby the polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or other TGF- $\beta$ -R polypeptide, becomes attached to one or more polymer molecules, and (b) obtaining the reaction products. The optimal reaction conditions 20 will be determined based on known parameters and the desired result. For example, the larger the ratio of polymer molecules to protein, the greater the percentage of attached polymer molecule. In one embodiment, the TGF- $\beta$ -R polypeptide derivative may have a single polymer molecule moiety at the amino-terminus. See, e.g., U.S. Patent No. 5,234,784.

The pegylation of a polypeptide may be specifically carried out using any of 25 the pegylation reactions known in the art. Such reactions are described, for example, in the following references: Francis *et al.*, 1992, *Focus on Growth Factors* 3:4-10; European Patent Nos. 0154316 and 0401384; and U.S. Patent No. 4,179,337. For example, pegylation may be carried out via an acylation reaction or an alkylation 30 reaction with a reactive polyethylene glycol molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer) as described herein. For the acylation reactions, a selected polymer should have a single reactive ester group. For reductive alkylation, a

WO 02/44379

PCT/US01/44866

selected polymer should have a single reactive aldehyde group. A reactive aldehyde is, for example, polyethylene glycol propionaldehyde, which is water stable, or mono C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkoxy or aryloxy derivatives thereof (see U.S. Patent No. 5,252,714).

5 In another embodiment, TGF- $\beta$ -R polypeptides may be chemically coupled to biotin. The biotin/TGF- $\beta$ -R polypeptide molecules are then allowed to bind to avidin, resulting in tetravalent avidin/biotin/TGF- $\beta$ -R polypeptide molecules. TGF- $\beta$ -R polypeptides may also be covalently coupled to dinitrophenol (DNP) or trinitrophenol (TNP) and the resulting conjugates precipitated with anti-DNP or anti-TNP-IgM to form decameric conjugates with a valency of 10.

10 Generally, conditions that may be alleviated or modulated by the administration of the present TGF- $\beta$ -R polypeptide derivatives include those described herein for TGF- $\beta$ -R polypeptides. However, the TGF- $\beta$ -R polypeptide derivatives disclosed herein may have additional activities, enhanced or reduced biological activity, or other characteristics, such as increased or decreased half-life, as  
15 compared to the non-derivatized molecules.

#### Genetically Engineered Non-Human Animals

Additionally included within the scope of the present invention are non-human animals such as mice, rats, or other rodents; rabbits, goats, sheep, or other  
20 farm animals, in which the genes encoding native TGF- $\beta$ -R polypeptide have been disrupted (*i.e.*, "knocked out") such that the level of expression of TGF- $\beta$ -R polypeptide is significantly decreased or completely abolished. Such animals may be prepared using techniques and methods such as those described in U.S. Patent No. 5,557,032.

25 The present invention further includes non-human animals such as mice, rats, or other rodents; rabbits, goats, sheep, or other farm animals, in which either the native form of a TGF- $\beta$ -R gene for that animal or a heterologous TGF- $\beta$ -R gene is over-expressed by the animal, thereby creating a "transgenic" animal. Such transgenic animals may be prepared using well known methods such as those  
30 described in U.S. Patent No 5,489,743 and International Pub. No. WO 94/28122.

The present invention further includes non-human animals in which the promoter for one or more of the TGF- $\beta$ -R polypeptides of the present invention is

WO 02/44379

PCT/US01/44866

either activated or inactivated (*e.g.*, by using homologous recombination methods) to alter the level of expression of one or more of the native TGF- $\beta$ -R polypeptides.

These non-human animals may be used for drug candidate screening. In such screening, the impact of a drug candidate on the animal may be measured. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the TGF- $\beta$ -R gene. In certain embodiments, the amount of TGF- $\beta$ -R polypeptide that is produced may be measured after the exposure of the animal to the drug candidate. Additionally, in certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the animal. For example, over-expression of a particular gene may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a pathological condition. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product or its ability to prevent or inhibit a pathological condition.

#### Assaying for Other Modulators of TGF- $\beta$ -R Polypeptide Activity

In some situations, it may be desirable to identify molecules that are modulators, *i.e.*, agonists or antagonists, of the activity of TGF- $\beta$ -R polypeptide. Natural or synthetic molecules that modulate TGF- $\beta$ -R polypeptide may be identified using one or more screening assays, such as those described herein. Such molecules may be administered either in an *ex vivo* manner or in an *in vivo* manner by injection, or by oral delivery, implantation device, or the like.

"Test molecule" refers to a molecule that is under evaluation for the ability to modulate (*i.e.*, increase or decrease) the activity of a TGF- $\beta$ -R polypeptide. Most commonly, a test molecule will interact directly with a TGF- $\beta$ -R polypeptide. However, it is also contemplated that a test molecule may also modulate TGF- $\beta$ -R polypeptide activity indirectly, such as by affecting TGF- $\beta$ -R gene expression, or by binding to a TGF- $\beta$ -R polypeptide binding partner (*e.g.*, receptor or ligand). In one embodiment, a test molecule will bind to a TGF- $\beta$ -R polypeptide with an affinity

WO 02/44379

PCT/US01/44866

constant of at least about  $10^{-6}$  M, preferably about  $10^{-8}$  M, more preferably about  $10^{-9}$  M, and even more preferably about  $10^{-10}$  M.

Methods for identifying compounds that interact with TGF- $\beta$ -R polypeptides are encompassed by the present invention. In certain embodiments, a TGF- $\beta$ -R polypeptide is incubated with a test molecule under conditions that permit the interaction of the test molecule with a TGF- $\beta$ -R polypeptide, and the extent of the interaction is measured. The test molecule can be screened in a substantially purified form or in a crude mixture.

In certain embodiments, a TGF- $\beta$ -R polypeptide agonist or antagonist may be a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule that interacts with TGF- $\beta$ -R polypeptide to regulate its activity. Molecules which regulate TGF- $\beta$ -R polypeptide expression include nucleic acids which are complementary to nucleic acids encoding a TGF- $\beta$ -R polypeptide, or are complementary to nucleic acids sequences which direct or control the expression of TGF- $\beta$ -R polypeptide, and which act as anti-sense regulators of expression.

Once a test molecule has been identified as interacting with a TGF- $\beta$ -R polypeptide, the molecule may be further evaluated for its ability to increase or decrease TGF- $\beta$ -R polypeptide activity. The measurement of the interaction of a test molecule with TGF- $\beta$ -R polypeptide may be carried out in several formats, including cell-based binding assays, membrane binding assays, solution-phase assays, and immunoassays. In general, a test molecule is incubated with a TGF- $\beta$ -R polypeptide for a specified period of time, and TGF- $\beta$ -R polypeptide activity is determined by one or more assays for measuring biological activity.

The interaction of test molecules with TGF- $\beta$ -R polypeptides may also be assayed directly using polyclonal or monoclonal antibodies in an immunoassay. Alternatively, modified forms of TGF- $\beta$ -R polypeptides containing epitope tags as described herein may be used in solution and immunoassays.

In the event that TGF- $\beta$ -R polypeptides display biological activity through an interaction with a binding partner (e.g., a receptor or a ligand), a variety of *in vitro* assays may be used to measure the binding of a TGF- $\beta$ -R polypeptide to the corresponding binding partner (such as a selective binding agent, receptor, or ligand). These assays may be used to screen test molecules for their ability to increase or

WO 02/44379

PCT/US01/44866

decrease the rate and/or the extent of binding of a TGF- $\beta$ -R polypeptide to its binding partner. In one assay, a TGF- $\beta$ -R polypeptide is immobilized in the wells of a microtiter plate. Radiolabeled TGF- $\beta$ -R polypeptide binding partner (for example, iodinated TGF- $\beta$ -R polypeptide binding partner) and a test molecule can then be added either one at a time (in either order) or simultaneously to the wells. After incubation, the wells can be washed and counted for radioactivity, using a scintillation counter, to determine the extent to which the binding partner bound to the TGF- $\beta$ -R polypeptide. Typically, a molecule will be tested over a range of concentrations, and a series of control wells lacking one or more elements of the test assays can be used for accuracy in the evaluation of the results. An alternative to this method involves reversing the "positions" of the proteins, *i.e.*, immobilizing TGF- $\beta$ -R polypeptide binding partner to the microtiter plate wells, incubating with the test molecule and radiolabeled TGF- $\beta$ -R polypeptide, and determining the extent of TGF- $\beta$ -R polypeptide binding. *See, e.g., Current Protocols in Molecular Biology*, chap. 18 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1995).

As an alternative to radiolabeling, a TGF- $\beta$ -R polypeptide or its binding partner may be conjugated to biotin, and the presence of biotinylated protein can then be detected using streptavidin linked to an enzyme, such as horse radish peroxidase (HRP) or alkaline phosphatase (AP), which can be detected colorometrically, or by fluorescent tagging of streptavidin. An antibody directed to a TGF- $\beta$ -R polypeptide or to a TGF- $\beta$ -R polypeptide binding partner, and which is conjugated to biotin, may also be used for purposes of detection following incubation of the complex with enzyme-linked streptavidin linked to AP or HRP.

A TGF- $\beta$ -R polypeptide or a TGF- $\beta$ -R polypeptide binding partner can also be immobilized by attachment to agarose beads, acrylic beads, or other types of such inert solid phase substrates. The substrate-protein complex can be placed in a solution containing the complementary protein and the test compound. After incubation, the beads can be precipitated by centrifugation, and the amount of binding between a TGF- $\beta$ -R polypeptide and its binding partner can be assessed using the methods described herein. Alternatively, the substrate-protein complex can be immobilized in a column with the test molecule and complementary protein passing through the column. The formation of a complex between a TGF- $\beta$ -R polypeptide

WO 02/44379

PCT/US01/44866

and its binding partner can then be assessed using any of the techniques described herein (e.g., radiolabelling or antibody binding).

Another *in vitro* assay that is useful for identifying a test molecule that increases or decreases the formation of a complex between a TGF- $\beta$ -R polypeptide binding protein and a TGF- $\beta$ -R polypeptide binding partner is a surface plasmon resonance detector system such as the BIAcore assay system (Pharmacia, Piscataway, NJ). The BIAcore system is utilized as specified by the manufacturer. This assay essentially involves the covalent binding of either TGF- $\beta$ -R polypeptide or a TGF- $\beta$ -R polypeptide binding partner to a dextran-coated sensor chip that is located in a detector. The test compound and the other complementary protein can then be injected, either simultaneously or sequentially, into the chamber containing the sensor chip. The amount of complementary protein that binds can be assessed based on the change in molecular mass that is physically associated with the dextran-coated side of the sensor chip, with the change in molecular mass being measured by the detector system.

In some cases, it may be desirable to evaluate two or more test compounds together for their ability to increase or decrease the formation of a complex between a TGF- $\beta$ -R polypeptide and a TGF- $\beta$ -R polypeptide binding partner. In these cases, the assays set forth herein can be readily modified by adding such additional test compound(s) either simultaneously with, or subsequent to, the first test compound. The remainder of the steps in the assay are as set forth herein.

*In vitro* assays such as those described herein may be used advantageously to screen large numbers of compounds for an effect on the formation of a complex between a TGF- $\beta$ -R polypeptide and TGF- $\beta$ -R polypeptide binding partner. The assays may be automated to screen compounds generated in phage display, synthetic peptide, and chemical synthesis libraries.

Compounds which increase or decrease the formation of a complex between a TGF- $\beta$ -R polypeptide and a TGF- $\beta$ -R polypeptide binding partner may also be screened in cell culture using cells and cell lines expressing either TGF- $\beta$ -R polypeptide or TGF- $\beta$ -R polypeptide binding partner. Cells and cell lines may be obtained from any mammal, but preferably will be from human or other primate, canines, or rodent sources. The binding of a TGF- $\beta$ -R polypeptide to cells expressing

WO 02/44379

PCT/US01/44866

TGF- $\beta$ -R polypeptide binding partner at the surface is evaluated in the presence or absence of test molecules, and the extent of binding may be determined by, for example, flow cytometry using a biotinylated antibody to a TGF- $\beta$ -R polypeptide binding partner. Cell culture assays can be used advantageously to further evaluate  
5 compounds that score positive in protein binding assays described herein.

Cell cultures can also be used to screen the impact of a drug candidate. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the TGF- $\beta$ -R gene. In certain embodiments, the amount of TGF- $\beta$ -R polypeptide or a TGF- $\beta$ -R polypeptide fragment that is produced may be measured after exposure of the cell  
10 culture to the drug candidate. In certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the cell culture. For example, the over-expression of a particular gene may have a particular impact on the cell culture. In such cases, one may test a drug candidate's ability to increase or decrease the expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a particular impact on the cell culture. In other  
15 examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product in a cell culture.

#### 20 Internalizing Proteins

The *tat* protein sequence (from HIV) can be used to internalize proteins into a cell. See, e.g., Falwell *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:664-68. For example, an 11 amino acid sequence (Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 14) of the HIV *tat* protein (termed the "protein transduction domain," or TAT PDT) has  
25 been described as mediating delivery across the cytoplasmic membrane and the nuclear membrane of a cell. See Schwarze *et al.*, 1999, *Science* 285:1569-72; and Nagahara *et al.*, 1998, *Nat. Med.* 4:1449-52. In these procedures, FITC-constructs (FITC-labeled G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 15), which penetrate tissues following intraperitoneal administration, are prepared, and the  
30 binding of such constructs to cells is detected by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. Cells treated with a *tat*- $\beta$ -gal fusion protein will demonstrate  $\beta$ -gal activity. Following injection, expression of such a construct can be detected in a

WO 02/44379

PCT/US01/44866

number of tissues, including liver, kidney, lung, heart, and brain tissue. It is believed that such constructs undergo some degree of unfolding in order to enter the cell, and as such, may require a refolding following entry into the cell.

It will thus be appreciated that the *tat* protein sequence may be used to internalize a desired polypeptide into a cell. For example, using the *tat* protein sequence, a TGF- $\beta$ -R antagonist (such as an anti-TGF- $\beta$ -R selective binding agent, small molecule, soluble receptor, or antisense oligonucleotide) can be administered intracellularly to inhibit the activity of a TGF- $\beta$ -R molecule. As used herein, the term "TGF- $\beta$ -R molecule" refers to both TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecules and TGF- $\beta$ -R polypeptides as defined herein. Where desired, the TGF- $\beta$ -R protein itself may also be internally administered to a cell using these procedures. *See also*, Straus, 1999, *Science* 285:1466-67.

#### Cell Source Identification Using TGF- $\beta$ -R Polypeptide

In accordance with certain embodiments of the invention, it may be useful to be able to determine the source of a certain cell type associated with a TGF- $\beta$ -R polypeptide. For example, it may be useful to determine the origin of a disease or pathological condition as an aid in selecting an appropriate therapy. In certain embodiments, nucleic acids encoding a TGF- $\beta$ -R polypeptide can be used as a probe to identify cells described herein by screening the nucleic acids of the cells with such a probe. In other embodiments, one may use anti-TGF- $\beta$ -R polypeptide antibodies to test for the presence of TGF- $\beta$ -R polypeptide in cells, and thus, determine if such cells are of the types described herein.

#### TGF- $\beta$ -R Polypeptide Compositions and Administration

Therapeutic compositions are within the scope of the present invention. Such TGF- $\beta$ -R polypeptide pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically effective amount of a TGF- $\beta$ -R polypeptide or a TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecule in admixture with a pharmaceutically or physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration. Pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically effective amount of one or more TGF- $\beta$ -R polypeptide selective binding agents in admixture with a pharmaceutically or

WO 02/44379

PCT/US01/44866

physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration.

Acceptable formulation materials preferably are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed.

5 The pharmaceutical composition may contain formulation materials for modifying, maintaining, or preserving, for example, the pH, osmolarity, viscosity, clarity, color, isotonicity, odor, sterility, stability, rate of dissolution or release, adsorption, or penetration of the composition. Suitable formulation materials include, but are not limited to, amino acids (such as glycine, glutamine, asparagine, arginine,  
10 or lysine), antimicrobials, antioxidants (such as ascorbic acid, sodium sulfite, or sodium hydrogen-sulfite), buffers (such as borate, bicarbonate, Tris-HCl, citrates, phosphates, or other organic acids), bulking agents (such as mannitol or glycine), chelating agents (such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)), complexing agents (such as caffeine, polyvinylpyrrolidone, beta-cyclodextrin, or hydroxypropyl-  
15 beta-cyclodextrin), fillers, monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates (such as glucose, mannose, or dextrans), proteins (such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins), coloring, flavoring and diluting agents, emulsifying agents, hydrophilic polymers (such as polyvinylpyrrolidone), low molecular weight polypeptides, salt-forming counterions (such as sodium), preservatives (such as  
20 benzalkonium chloride, benzoic acid, salicylic acid, thimerosal, phenethyl alcohol, methylparaben, propylparaben, chlorhexidine, sorbic acid, or hydrogen peroxide), solvents (such as glycerin, propylene glycol, or polyethylene glycol), sugar alcohols (such as mannitol or sorbitol), suspending agents, surfactants or wetting agents (such as pluronics; PEG; sorbitan esters; polysorbates such as polysorbate 20 or polysorbate  
25 80; triton; tromethamine; lecithin; cholesterol or tyloxapal), stability enhancing agents (such as sucrose or sorbitol), tonicity enhancing agents (such as alkali metal halides – preferably sodium or potassium chloride – or mannitol sorbitol), delivery vehicles, diluents, excipients and/or pharmaceutical adjuvants. *See Remington's Pharmaceutical Sciences* (18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company  
30 1990.

The optimal pharmaceutical composition will be determined by a skilled artisan depending upon, for example, the intended route of administration, delivery

WO 02/44379

PCT/US01/44866

format, and desired dosage. See, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*. Such compositions may influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of the TGF- $\beta$ -R molecule.

The primary vehicle or carrier in a pharmaceutical composition may be either  
5 aqueous or non-aqueous in nature. For example, a suitable vehicle or carrier for injection may be water, physiological saline solution, or artificial cerebrospinal fluid, possibly supplemented with other materials common in compositions for parenteral administration. Neutral buffered saline or saline mixed with serum albumin are further exemplary vehicles. Other exemplary pharmaceutical compositions comprise  
10 Tris buffer of about pH 7.0-8.5, or acetate buffer of about pH 4.0-5.5, which may further include sorbitol or a suitable substitute. In one embodiment of the present invention, TGF- $\beta$ -R polypeptide compositions may be prepared for storage by mixing the selected composition having the desired degree of purity with optional formulation agents (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*) in the form of a  
15 lyophilized cake or an aqueous solution. Further, the TGF- $\beta$ -R polypeptide product may be formulated as a lyophilizate using appropriate excipients such as sucrose.

The TGF- $\beta$ -R polypeptide pharmaceutical compositions can be selected for parenteral delivery. Alternatively, the compositions may be selected for inhalation or for delivery through the digestive tract, such as orally. The preparation of such  
20 pharmaceutically acceptable compositions is within the skill of the art.

The formulation components are present in concentrations that are acceptable to the site of administration. For example, buffers are used to maintain the composition at physiological pH or at a slightly lower pH, typically within a pH range of from about 5 to about 8.

When parenteral administration is contemplated, the therapeutic compositions  
25 for use in this invention may be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable, aqueous solution comprising the desired TGF- $\beta$ -R molecule in a pharmaceutically acceptable vehicle. A particularly suitable vehicle for parenteral injection is sterile distilled water in which a TGF- $\beta$ -R molecule is formulated as a  
30 sterile, isotonic solution, properly preserved. Yet another preparation can involve the formulation of the desired molecule with an agent, such as injectable microspheres, bio-erodible particles, polymeric compounds (such as polylactic acid or polyglycolic

WO 02/44379

PCT/US01/44866

acid), beads, or liposomes, that provides for the controlled or sustained release of the product which may then be delivered via a depot injection. Hyaluronic acid may also be used, and this may have the effect of promoting sustained duration in the circulation. Other suitable means for the introduction of the desired molecule include  
5 implantable drug delivery devices.

In one embodiment, a pharmaceutical composition may be formulated for inhalation. For example, TGF- $\beta$ -R polypeptide may be formulated as a dry powder for inhalation. TGF- $\beta$ -R polypeptide or nucleic acid molecule inhalation solutions may also be formulated with a propellant for aerosol delivery. In yet another  
10 embodiment, solutions may be nebulized. Pulmonary administration is further described in International Pub. No. WO 94/20069, which describes the pulmonary delivery of chemically modified proteins.

It is also contemplated that certain formulations may be administered orally. In one embodiment of the present invention, TGF- $\beta$ -R polypeptides that are  
15 administered in this fashion can be formulated with or without those carriers customarily used in the compounding of solid dosage forms such as tablets and capsules. For example, a capsule may be designed to release the active portion of the formulation at the point in the gastrointestinal tract when bioavailability is maximized and pre-systemic degradation is minimized. Additional agents can be included to  
20 facilitate absorption of the TGF- $\beta$ -R polypeptide. Diluents, flavorings, low melting point waxes, vegetable oils, lubricants, suspending agents, tablet disintegrating agents, and binders may also be employed.

Another pharmaceutical composition may involve an effective quantity of TGF- $\beta$ -R polypeptides in a mixture with non-toxic excipients that are suitable for the  
25 manufacture of tablets. By dissolving the tablets in sterile water, or another appropriate vehicle, solutions can be prepared in unit-dose form. Suitable excipients include, but are not limited to, inert diluents, such as calcium carbonate, sodium carbonate or bicarbonate, lactose, or calcium phosphate; or binding agents, such as starch, gelatin, or acacia; or lubricating agents such as magnesium stearate, stearic  
30 acid, or talc.

Additional TGF- $\beta$ -R polypeptide pharmaceutical compositions will be evident to those skilled in the art, including formulations involving TGF- $\beta$ -R

WO 02/44379

PCT/US01/44866

polypeptides in sustained- or controlled-delivery formulations. Techniques for formulating a variety of other sustained- or controlled-delivery means, such as liposome carriers, bio-erodible microparticles or porous beads and depot injections, are also known to those skilled in the art. *See, e.g.*, International App. No. 5 PCT/US93/00829, which describes the controlled release of porous polymeric microparticles for the delivery of pharmaceutical compositions.

Additional examples of sustained-release preparations include semipermeable polymer matrices in the form of shaped articles, *e.g.* films, or microcapsules. Sustained release matrices may include polycesters, hydrogels, polylactides (U.S. 10 Patent No. 3,773,919 and European Patent No. 058481), copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers* 22:547-56), poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) (Langer *et al.*, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 and Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), ethylene vinyl acetate (Langer *et al.*, *supra*) or poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid (European Patent No. 15 133988). Sustained-release compositions may also include liposomes, which can be prepared by any of several methods known in the art. *See, e.g.*, Eppstein *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-92; and European Patent Nos. 036676, 088046, and 143949.

The TGF- $\beta$ -R pharmaceutical composition to be used for *in vivo* 20 administration typically must be sterile. This may be accomplished by filtration through sterile filtration membranes. Where the composition is lyophilized, sterilization using this method may be conducted either prior to, or following, lyophilization and reconstitution. The composition for parenteral administration may be stored in lyophilized form or in a solution. In addition, parenteral compositions 25 generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

Once the pharmaceutical composition has been formulated, it may be stored in sterile vials as a solution, suspension, gel, emulsion, solid, or as a dehydrated or 30 lyophilized powder. Such formulations may be stored either in a ready-to-use form or in a form (*e.g.*, lyophilized) requiring reconstitution prior to administration.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

In a specific embodiment, the present invention is directed to kits for producing a single-dose administration unit. The kits may each contain both a first container having a dried protein and a second container having an aqueous formulation. Also included within the scope of this invention are kits containing  
5 single and multi-chambered pre-filled syringes (*e.g.*, liquid syringes and lyosyringes).

The effective amount of a TGF- $\beta$ -R pharmaceutical composition to be employed therapeutically will depend, for example, upon the therapeutic context and objectives. One skilled in the art will appreciate that the appropriate dosage levels for treatment will thus vary depending, in part, upon the molecule delivered, the  
10 indication for which the TGF- $\beta$ -R molecule is being used, the route of administration, and the size (body weight, body surface, or organ size) and condition (the age and general health) of the patient. Accordingly, the clinician may titer the dosage and modify the route of administration to obtain the optimal therapeutic effect. A typical dosage may range from about 0.1  $\mu$ g/kg to up to about 100 mg/kg or  
15 more, depending on the factors mentioned above. In other embodiments, the dosage may range from 0.1  $\mu$ g/kg up to about 100 mg/kg; or 1  $\mu$ g/kg up to about 100 mg/kg; or 5  $\mu$ g/kg up to about 100 mg/kg.

The frequency of dosing will depend upon the pharmacokinetic parameters of the TGF- $\beta$ -R molecule in the formulation being used. Typically, a clinician will  
20 administer the composition until a dosage is reached that achieves the desired effect. The composition may therefore be administered as a single dose, as two or more doses (which may or may not contain the same amount of the desired molecule) over time, or as a continuous infusion via an implantation device or catheter. Further refinement of the appropriate dosage is routinely made by those of ordinary skill in  
25 the art and is within the ambit of tasks routinely performed by them. Appropriate dosages may be ascertained through use of appropriate dose-response data.

The route of administration of the pharmaceutical composition is in accord with known methods, *e.g.*, orally; through injection by intravenous, intraperitoneal, intracerebral (intraparenchymal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular,  
30 intraarterial, intraportal, or intralesional routes; by sustained release systems; or by implantation devices. Where desired, the compositions may be administered by bolus injection or continuously by infusion, or by implantation device.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

Alternatively or additionally, the composition may be administered locally via implantation of a membrane, sponge, or other appropriate material onto which the desired molecule has been absorbed or encapsulated. Where an implantation device is used, the device may be implanted into any suitable tissue or organ, and delivery of the desired molecule may be via diffusion, timed-release bolus, or continuous administration.

In some cases, it may be desirable to use TGF- $\beta$ -R polypeptide pharmaceutical compositions in an *ex vivo* manner. In such instances, cells, tissues, or organs that have been removed from the patient are exposed to TGF- $\beta$ -R polypeptide pharmaceutical compositions after which the cells, tissues, or organs are subsequently implanted back into the patient.

In other cases, a TGF- $\beta$ -R polypeptide can be delivered by implanting certain cells that have been genetically engineered, using methods such as those described herein, to express and secrete the TGF- $\beta$ -R polypeptide. Such cells may be animal or human cells, and may be autologous, heterologous, or xenogeneic. Optionally, the cells may be immortalized. In order to decrease the chance of an immunological response, the cells may be encapsulated to avoid infiltration of surrounding tissues. The encapsulation materials are typically biocompatible, semi-permeable polymeric enclosures or membranes that allow the release of the protein product(s) but prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissues.

As discussed herein, it may be desirable to treat isolated cell populations (such as stem cells, lymphocytes, red blood cells, chondrocytes, neurons, and the like) with one or more TGF- $\beta$ -R polypeptides. This can be accomplished by exposing the isolated cells to the polypeptide directly, where it is in a form that is permeable to the cell membrane.

Additional embodiments of the present invention relate to cells and methods (e.g., homologous recombination and/or other recombinant production methods) for both the *in vitro* production of therapeutic polypeptides and for the production and delivery of therapeutic polypeptides by gene therapy or cell therapy. Homologous and other recombination methods may be used to modify a cell that contains a normally transcriptionally-silent TGF- $\beta$ -R gene, or an under-expressed gene, and

WO 02/44379

PCT/US01/44866

thereby produce a cell which expresses therapeutically efficacious amounts of TGF- $\beta$ -R polypeptides.

Homologous recombination is a technique originally developed for targeting genes to induce or correct mutations in transcriptionally active genes. Kucherlapati, 5 1989, *Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol.* 36:301. The basic technique was developed as a method for introducing specific mutations into specific regions of the mammalian genome (Thomas *et al.*, 1986, *Cell* 44:419-28; Thomas and Capecchi, 1987, *Cell* 51:503-12; Doetschman *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8583-87) or to correct specific mutations within defective genes (Doetschman *et* 10 *al.*, 1987, *Nature* 330:576-78). Exemplary homologous recombination techniques are described in U.S. Patent No. 5,272,071; European Patent Nos. 9193051 and 505500; International App. No. PCT/US90/07642, and International Pub No. WO 91/09955).

Through homologous recombination, the DNA sequence to be inserted into the genome can be directed to a specific region of the gene of interest by attaching it 15 to targeting DNA. The targeting DNA is a nucleotide sequence that is complementary (homologous) to a region of the genomic DNA. Small pieces of targeting DNA that are complementary to a specific region of the genome are put in contact with the parental strand during the DNA replication process. It is a general property of DNA that has been inserted into a cell to hybridize, and therefore, 20 recombine with other pieces of endogenous DNA through shared homologous regions. If this complementary strand is attached to an oligonucleotide that contains a mutation or a different sequence or an additional nucleotide, it too is incorporated into the newly synthesized strand as a result of the recombination. As a result of the proofreading function, it is possible for the new sequence of DNA to serve as the 25 template. Thus, the transferred DNA is incorporated into the genome.

Attached to these pieces of targeting DNA are regions of DNA that may interact with or control the expression of a TGF- $\beta$ -R polypeptide, *e.g.*, flanking sequences. For example, a promoter/enhancer element, a suppressor, or an exogenous transcription modulatory element is inserted in the genome of the intended host cell in 30 proximity and orientation sufficient to influence the transcription of DNA encoding the desired TGF- $\beta$ -R polypeptide. The control element controls a portion of the DNA present in the host cell genome. Thus, the expression of the desired TGF- $\beta$ -R

WO 02/44379

PCT/US01/44866

polypeptide may be achieved not by transfection of DNA that encodes the TGF- $\beta$ -R gene itself, but rather by the use of targeting DNA (containing regions of homology with the endogenous gene of interest) coupled with DNA regulatory segments that provide the endogenous gene sequence with recognizable signals for transcription of a

5 TGF- $\beta$ -R gene.

In an exemplary method, the expression of a desired targeted gene in a cell (*i.e.*, a desired endogenous cellular gene) is altered via homologous recombination into the cellular genome at a preselected site, by the introduction of DNA that includes at least a regulatory sequence, an exon, and a splice donor site. These

10 components are introduced into the chromosomal (genomic) DNA in such a manner that this, in effect, results in the production of a new transcription unit (in which the regulatory sequence, the exon, and the splice donor site present in the DNA construct are operatively linked to the endogenous gene). As a result of the introduction of these components into the chromosomal DNA, the expression of the desired

15 endogenous gene is altered.

Altered gene expression, as described herein, encompasses activating (or causing to be expressed) a gene which is normally silent (unexpressed) in the cell as obtained, as well as increasing the expression of a gene which is not expressed at physiologically significant levels in the cell as obtained. The embodiments further

20 encompass changing the pattern of regulation or induction such that it is different from the pattern of regulation or induction that occurs in the cell as obtained, and reducing (including eliminating) the expression of a gene which is expressed in the cell as obtained.

One method by which homologous recombination can be used to increase, or

25 cause, TGF- $\beta$ -R polypeptide production from a cell's endogenous TGF- $\beta$ -R gene involves first using homologous recombination to place a recombination sequence from a site-specific recombination system (*e.g.*, Cre/loxP, FLP/FRT) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225:890-900) upstream of (*i.e.*, 5' to) the cell's endogenous genomic TGF- $\beta$ -R polypeptide coding

30 region. A plasmid containing a recombination site homologous to the site that was placed just upstream of the genomic TGF- $\beta$ -R polypeptide coding region is introduced into the modified cell line along with the appropriate recombinase

WO 02/44379

PCT/US01/44866

enzyme. This recombinase causes the plasmid to integrate, via the plasmid's recombination site, into the recombination site located just upstream of the genomic TGF- $\beta$ -R polypeptide coding region in the cell line (Baubonis and Sauer, 1993, *Nucleic Acids Res.* 21:2025-29; O'Gorman *et al.*, 1991, *Science* 251:1351-55). Any flanking sequences known to increase transcription (*e.g.*, enhancer/promoter, intron, translational enhancer), if properly positioned in this plasmid, would integrate in such a manner as to create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased TGF- $\beta$ -R polypeptide production from the cell's endogenous TGF- $\beta$ -R gene.

10 A further method to use the cell line in which the site specific recombination sequence had been placed just upstream of the cell's endogenous genomic TGF- $\beta$ -R polypeptide coding region is to use homologous recombination to introduce a second recombination site elsewhere in the cell line's genome. The appropriate recombinase enzyme is then introduced into the two-recombination-site cell line, causing a recombination event (deletion, inversion, and translocation) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225:890-900) that would create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased TGF- $\beta$ -R polypeptide production from the cell's endogenous TGF- $\beta$ -R gene.

20 An additional approach for increasing, or causing, the expression of TGF- $\beta$ -R polypeptide from a cell's endogenous TGF- $\beta$ -R gene involves increasing, or causing, the expression of a gene or genes (*e.g.*, transcription factors) and/or decreasing the expression of a gene or genes (*e.g.*, transcriptional repressors) in a manner which results in *de novo* or increased TGF- $\beta$ -R polypeptide production from the cell's endogenous TGF- $\beta$ -R gene. This method includes the introduction of a non-naturally occurring polypeptide (*e.g.*, a polypeptide comprising a site specific DNA binding domain fused to a transcriptional factor domain) into the cell such that *de novo* or increased TGF- $\beta$ -R polypeptide production from the cell's endogenous TGF- $\beta$ -R gene results.

30 The present invention further relates to DNA constructs useful in the method of altering expression of a target gene. In certain embodiments, the exemplary DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences, (b) a regulatory sequence, (c) an exon, and (d) an unpaired splice-donor site. The targeting sequence in the

WO 02/44379

PCT/US01/44866

DNA construct directs the integration of elements (a) - (d) into a target gene in a cell such that the elements (b) - (d) are operatively linked to sequences of the endogenous target gene. In another embodiment, the DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences, (b) a regulatory sequence, (c) an exon, (d) a splice-donor site, (e) 5 an intron, and (f) a splice-acceptor site, wherein the targeting sequence directs the integration of elements (a) - (f) such that the elements of (b) - (f) are operatively linked to the endogenous gene. The targeting sequence is homologous to the preselected site in the cellular chromosomal DNA with which homologous recombination is to occur. In the construct, the exon is generally 3' of the regulatory 10 sequence and the splice-donor site is 3' of the exon.

If the sequence of a particular gene is known, such as the nucleic acid sequence of TGF- $\beta$ -R polypeptide presented herein, a piece of DNA that is complementary to a selected region of the gene can be synthesized or otherwise obtained, such as by appropriate restriction of the native DNA at specific recognition 15 sites bounding the region of interest. This piece serves as a targeting sequence upon insertion into the cell and will hybridize to its homologous region within the genome. If this hybridization occurs during DNA replication, this piece of DNA, and any additional sequence attached thereto, will act as an Okazaki fragment and will be incorporated into the newly synthesized daughter strand of DNA. The present 20 invention, therefore, includes nucleotides encoding a TGF- $\beta$ -R polypeptide, which nucleotides may be used as targeting sequences.

TGF- $\beta$ -R polypeptide cell therapy, *e.g.*, the implantation of cells producing TGF- $\beta$ -R polypeptides, is also contemplated. This embodiment involves implanting cells capable of synthesizing and secreting a biologically active form of TGF- $\beta$ -R 25 polypeptide. Such TGF- $\beta$ -R polypeptide-producing cells can be cells that are natural producers of TGF- $\beta$ -R polypeptides or may be recombinant cells whose ability to produce TGF- $\beta$ -R polypeptides has been augmented by transformation with a gene encoding the desired TGF- $\beta$ -R polypeptide or with a gene augmenting the expression of TGF- $\beta$ -R polypeptide. Such a modification may be accomplished by means of a 30 vector suitable for delivering the gene as well as promoting its expression and secretion. In order to minimize a potential immunological reaction in patients being administered a TGF- $\beta$ -R polypeptide, as may occur with the administration of a

WO 02/44379

PCT/US01/44866

polypeptide of a foreign species, it is preferred that the natural cells producing TGF- $\beta$ -R polypeptide be of human origin and produce human TGF- $\beta$ -R polypeptide. Likewise, it is preferred that the recombinant cells producing TGF- $\beta$ -R polypeptide be transformed with an expression vector containing a gene encoding a human TGF- $\beta$ -R polypeptide.

Implanted cells may be encapsulated to avoid the infiltration of surrounding tissue. Human or non-human animal cells may be implanted in patients in biocompatible, semipermeable polymeric enclosures or membranes that allow the release of TGF- $\beta$ -R polypeptide, but that prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissue. Alternatively, the patient's own cells, transformed to produce TGF- $\beta$ -R polypeptides *ex vivo*, may be implanted directly into the patient without such encapsulation.

Techniques for the encapsulation of living cells are known in the art, and the preparation of the encapsulated cells and their implantation in patients may be routinely accomplished. For example, Baetge *et al.* (International Pub. No. WO 95/05452 and International App. No. PCT/US94/09299) describe membrane capsules containing genetically engineered cells for the effective delivery of biologically active molecules. The capsules are biocompatible and are easily retrievable. The capsules encapsulate cells transfected with recombinant DNA molecules comprising DNA sequences coding for biologically active molecules operatively linked to promoters that are not subject to down-regulation *in vivo* upon implantation into a mammalian host. The devices provide for the delivery of the molecules from living cells to specific sites within a recipient. In addition, *see* U.S. Patent Nos. 4,892,538; 5,011,472; and 5,106,627. A system for encapsulating living cells is described in International Pub. No. WO 91/10425 (Aebischer *et al.*). *See also*, International Pub. No. WO 91/10470 (Aebischer *et al.*); Winn *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 113:322-29; Aebischer *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 111:269-75; and Tresco *et al.*, 1992, *ASAI* 38:17-23.

*In vivo* and *in vitro* gene therapy delivery of TGF- $\beta$ -R polypeptides is also envisioned. One example of a gene therapy technique is to use the TGF- $\beta$ -R gene (either genomic DNA, cDNA, and/or synthetic DNA) encoding a TGF- $\beta$ -R polypeptide that may be operably linked to a constitutive or inducible promoter to

WO 02/44379

PCT/US01/44866

form a "gene therapy DNA construct." The promoter may be homologous or heterologous to the endogenous TGF- $\beta$ -R gene, provided that it is active in the cell or tissue type into which the construct will be inserted. Other components of the gene therapy DNA construct may optionally include DNA molecules designed for site-specific integration (e.g., endogenous sequences useful for homologous recombination), tissue-specific promoters, enhancers or silencers, DNA molecules capable of providing a selective advantage over the parent cell, DNA molecules useful as labels to identify transformed cells, negative selection systems, cell specific binding agents (as, for example, for cell targeting), cell-specific internalization factors, transcription factors enhancing expression from a vector, and factors enabling vector production.

A gene therapy DNA construct can then be introduced into cells (either *ex vivo* or *in vivo*) using viral or non-viral vectors. One means for introducing the gene therapy DNA construct is by means of viral vectors as described herein. Certain vectors, such as retroviral vectors, will deliver the DNA construct to the chromosomal DNA of the cells, and the gene can integrate into the chromosomal DNA. Other vectors will function as episomes, and the gene therapy DNA construct will remain in the cytoplasm.

In yet other embodiments, regulatory elements can be included for the controlled expression of the TGF- $\beta$ -R gene in the target cell. Such elements are turned on in response to an appropriate effector. In this way, a therapeutic polypeptide can be expressed when desired. One conventional control means involves the use of small molecule dimerizers or rapalogs to dimerize chimeric proteins which contain a small molecule-binding domain and a domain capable of initiating a biological process, such as a DNA-binding protein or transcriptional activation protein (see International Pub. Nos. WO 96/41865, WO 97/31898, and WO 97/31899). The dimerization of the proteins can be used to initiate transcription of the transgene.

An alternative regulation technology uses a method of storing proteins expressed from the gene of interest inside the cell as an aggregate or cluster. The gene of interest is expressed as a fusion protein that includes a conditional aggregation domain that results in the retention of the aggregated protein in the

WO 02/44379

PCT/US01/44866

endoplasmic reticulum. The stored proteins are stable and inactive inside the cell. The proteins can be released, however, by administering a drug (*e.g.*, small molecule ligand) that removes the conditional aggregation domain and thereby specifically breaks apart the aggregates or clusters so that the proteins may be secreted from the cell. See Aridor *et al.*, 2000, *Science* 287:816-17 and Rivera *et al.*, 2000, *Science* 287:826-30.

Other suitable control means or gene switches include, but are not limited to, the systems described herein. Mifepristone (RU486) is used as a progesterone antagonist. The binding of a modified progesterone receptor ligand-binding domain to the progesterone antagonist activates transcription by forming a dimer of two transcription factors that then pass into the nucleus to bind DNA. The ligand-binding domain is modified to eliminate the ability of the receptor to bind to the natural ligand. The modified steroid hormone receptor system is further described in U.S. Patent No. 5,364,791 and International Pub. Nos. WO 96/40911 and WO 97/10337.

Yet another control system uses ecdysone (a fruit fly steroid hormone), which binds to and activates an ecdysone receptor (cytoplasmic receptor). The receptor then translocates to the nucleus to bind a specific DNA response element (promoter from ecdysone-responsive gene). The ecdysone receptor includes a transactivation domain, DNA-binding domain, and ligand-binding domain to initiate transcription. The ecdysone system is further described in U.S. Patent No. 5,514,578 and International Pub. Nos. WO 97/38117, WO 96/37609, and WO 93/03162.

Another control means uses a positive tetracycline-controllable transactivator. This system involves a mutated tet repressor protein DNA-binding domain (mutated tet R-4 amino acid changes which resulted in a reverse tetracycline-regulated transactivator protein, *i.e.*, it binds to a tet operator in the presence of tetracycline) linked to a polypeptide which activates transcription. Such systems are described in U.S. Patent Nos. 5,464,758, 5,650,298, and 5,654,168.

Additional expression control systems and nucleic acid constructs are described in U.S. Patent Nos. 5,741,679 and 5,834,186, to Innovir Laboratories Inc.

*In vivo* gene therapy may be accomplished by introducing the gene encoding TGF- $\beta$ -R polypeptide into cells via local injection of a TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecule or by other appropriate viral or non-viral delivery vectors. Hefli 1994,

WO 02/44379

PCT/US01/44866

*Neurobiology* 25:1418-35. For example, a nucleic acid molecule encoding a TGF- $\beta$ -R polypeptide may be contained in an adeno-associated virus (AAV) vector for delivery to the targeted cells (see, e.g., Johnson, International Pub. No. WO 95/34670; International App. No. PCT/US95/07178). The recombinant AAV genome  
5 typically contains AAV inverted terminal repeats flanking a DNA sequence encoding a TGF- $\beta$ -R polypeptide operably linked to functional promoter and polyadenylation sequences.

Alternative suitable viral vectors include, but are not limited to, retrovirus, adenovirus, herpes simplex virus, lentivirus, hepatitis virus, parvovirus, papovavirus,  
10 poxvirus, alphavirus, coronavirus, rhabdovirus, paramyxovirus, and papilloma virus vectors. U.S. Patent No. 5,672,344 describes an *in vivo* viral-mediated gene transfer system involving a recombinant neurotrophic HSV-1 vector. U.S. Patent No. 5,399,346 provides examples of a process for providing a patient with a therapeutic protein by the delivery of human cells that have been treated *in vitro* to insert a DNA  
15 segment encoding a therapeutic protein. Additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent Nos. 5,631,236 (involving adenoviral vectors), 5,672,510 (involving retroviral vectors), 5,635,399 (involving retroviral vectors expressing cytokines).

Nonviral delivery methods include, but are not limited to, liposome-mediated  
20 transfer, naked DNA delivery (direct injection), receptor-mediated transfer (ligand-DNA complex), electroporation, calcium phosphate precipitation, and microparticle bombardment (e.g., gene gun). Gene therapy materials and methods may also include inducible promoters, tissue-specific enhancer-promoters, DNA sequences designed for site-specific integration, DNA sequences capable of providing a selective  
25 advantage over the parent cell, labels to identify transformed cells, negative selection systems and expression control systems (safety measures), cell-specific binding agents (for cell targeting), cell-specific internalization factors, and transcription factors to enhance expression by a vector as well as methods of vector manufacture. Such additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are  
30 described in U.S. Patent Nos. 4,970,154 (involving electroporation techniques), 5,679,559 (describing a lipoprotein-containing system for gene delivery), 5,676,954 (involving liposome carriers), 5,593,875 (describing methods for calcium phosphate

WO 02/44379

PCT/US01/44866

transfection), and 4,945,050 (describing a process wherein biologically active particles are propelled at cells at a speed whereby the particles penetrate the surface of the cells and become incorporated into the interior of the cells), and International Pub. No. WO 96/40958 (involving nuclear ligands).

5 It is also contemplated that TGF- $\beta$ -R gene therapy or cell therapy can further include the delivery of one or more additional polypeptide(s) in the same or a different cell(s). Such cells may be separately introduced into the patient, or the cells may be contained in a single implantable device, such as the encapsulating membrane described above, or the cells may be separately modified by means of viral vectors.

10 A means to increase endogenous TGF- $\beta$ -R polypeptide expression in a cell via gene therapy is to insert one or more enhancer elements into the TGF- $\beta$ -R polypeptide promoter, where the enhancer elements can serve to increase transcriptional activity of the TGF- $\beta$ -R gene. The enhancer elements used will be selected based on the tissue in which one desires to activate the gene – enhancer  
15 elements known to confer promoter activation in that tissue will be selected. For example, if a gene encoding a TGF- $\beta$ -R polypeptide is to be “turned on” in T-cells, the *lck* promoter enhancer element may be used. Here, the functional portion of the transcriptional element to be added may be inserted into a fragment of DNA containing the TGF- $\beta$ -R polypeptide promoter (and optionally, inserted into a vector  
20 and/or 5' and/or 3' flanking sequences) using standard cloning techniques. This construct, known as a “homologous recombination construct,” can then be introduced into the desired cells either *ex vivo* or *in vivo*.

Gene therapy also can be used to decrease TGF- $\beta$ -R polypeptide expression by modifying the nucleotide sequence of the endogenous promoter. Such  
25 modification is typically accomplished via homologous recombination methods. For example, a DNA molecule containing all or a portion of the promoter of the TGF- $\beta$ -R gene selected for inactivation can be engineered to remove and/or replace pieces of the promoter that regulate transcription. For example, the TATA box and/or the binding site of a transcriptional activator of the promoter may be deleted  
30 using standard molecular biology techniques; such deletion can inhibit promoter activity thereby repressing the transcription of the corresponding TGF- $\beta$ -R gene. The deletion of the TATA box or the transcription activator binding site in the

WO 02/44379

PCT/US01/44866

promoter may be accomplished by generating a DNA construct comprising all or the relevant portion of the TGF- $\beta$ -R polypeptide promoter (from the same or a related species as the TGF- $\beta$ -R gene to be regulated) in which one or more of the TATA box and/or transcriptional activator binding site nucleotides are mutated via substitution, deletion and/or insertion of one or more nucleotides. As a result, the TATA box and/or activator binding site has decreased activity or is rendered completely inactive. This construct, which also will typically contain at least about 500 bases of DNA that correspond to the native (endogenous) 5' and 3' DNA sequences adjacent to the promoter segment that has been modified, may be introduced into the appropriate cells (either *ex vivo* or *in vivo*) either directly or via a viral vector as described herein. Typically, the integration of the construct into the genomic DNA of the cells will be via homologous recombination, where the 5' and 3' DNA sequences in the promoter construct can serve to help integrate the modified promoter region via hybridization to the endogenous chromosomal DNA.

15

#### Therapeutic Uses

TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists thereof can be used to treat, diagnose, ameliorate, or prevent a number of diseases, disorders, or conditions, including those recited herein.

20

TGF- $\beta$ -R polypeptide agonists and antagonists include those molecules which regulate TGF- $\beta$ -R polypeptide activity and either increase or decrease at least one activity of the mature form of the TGF- $\beta$ -R polypeptide. Agonists or antagonists may be co-factors, such as a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule, which interact with TGF- $\beta$ -R polypeptide and thereby regulate its activity. Potential polypeptide agonists or antagonists include antibodies that react with either soluble or membrane-bound forms of TGF- $\beta$ -R polypeptides that comprise part or all of the extracellular domains of the said proteins. Molecules that regulate TGF- $\beta$ -R polypeptide expression typically include nucleic acids encoding TGF- $\beta$ -R polypeptide that can act as anti-sense regulators of expression.

30

Sequence analysis indicated that the TGF- $\beta$ -R polypeptides of the present invention share the greatest degree of similarity with human and murine Growth Differentiation Factor-3 (GDF-3). This similarity suggests that the TGF- $\beta$ -R

WO 02/44379

PCT/US01/44866

polypeptides of the present invention are novel members of the TGF- $\beta$  family. This sequence similarity further suggests that TGF- $\beta$ -R polypeptides, fragments, variants, derivatives, and/or antagonists may be used to treat, diagnose, ameliorate, or prevent TGF- $\beta$ -related diseases, disorders, or conditions. Thus, TGF- $\beta$ -R polypeptides, fragments, variants, derivatives, and/or antagonists may be used to prevent or treat degenerative disorders of the cartilage, bone, teeth, or other tissues (such as the kidney or liver); prevent organ rejection in transplantation (as an immune system suppressor); treat gastric or duodenal ulcers; promote wound healing; treat burns; promote tissue repair; suppress tumor growth (by inhibiting certain anchorage-dependent cells); or treat impaired fertility (alternatively, TGF- $\beta$ -R polypeptides, fragments, variants, and/or derivatives may be used as contraceptives). TGF- $\beta$ -R polypeptides, fragments, variants, derivatives, and/or antagonists may also be used as bone marrow protective agents; anti-inflammatory agents; mediators of cardioprotection, or antagonists of TGF- $\beta$ -dependent tumors.

Agonists or antagonists of TGF- $\beta$ -R polypeptide function may be used (simultaneously or sequentially) in combination with one or more cytokines, growth factors, antibiotics, anti-inflammatories, and/or chemotherapeutic agents as is appropriate for the condition being treated.

Other diseases or disorders caused by or mediated by undesirable levels of TGF- $\beta$ -R polypeptides are encompassed within the scope of the invention. Undesirable levels include excessive levels of TGF- $\beta$ -R polypeptides and sub-normal levels of TGF- $\beta$ -R polypeptides.

#### Uses of TGF- $\beta$ -R Nucleic Acids and Polypeptides

Nucleic acid molecules of the invention (including those that do not themselves encode biologically active polypeptides) may be used to map the locations of the TGF- $\beta$ -R gene and related genes on chromosomes. Mapping may be done by techniques known in the art, such as PCR amplification and *in situ* hybridization.

TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecules (including those that do not themselves encode biologically active polypeptides), may be useful as hybridization probes in diagnostic assays to test, either qualitatively or quantitatively, for the presence of a

WO 02/44379

PCT/US01/44866

TGF- $\beta$ -R nucleic acid molecule in mammalian tissue or bodily fluid samples.

Other methods may also be employed where it is desirable to inhibit the activity of one or more TGF- $\beta$ -R polypeptides. Such inhibition may be effected by nucleic acid molecules that are complementary to and hybridize to expression control sequences (triple helix formation) or to TGF- $\beta$ -R mRNA. For example, antisense  
5 DNA or RNA molecules, which have a sequence that is complementary to at least a portion of a TGF- $\beta$ -R gene can be introduced into the cell. Anti-sense probes may be designed by available techniques using the sequence of the TGF- $\beta$ -R gene disclosed herein. Typically, each such antisense molecule will be complementary to  
10 the start site (5' end) of each selected TGF- $\beta$ -R gene. When the antisense molecule then hybridizes to the corresponding TGF- $\beta$ -R mRNA, translation of this mRNA is prevented or reduced. Anti-sense inhibitors provide information relating to the decrease or absence of a TGF- $\beta$ -R polypeptide in a cell or organism.

Alternatively, gene therapy may be employed to create a dominant-negative  
15 inhibitor of one or more TGF- $\beta$ -R polypeptides. In this situation, the DNA encoding a mutant polypeptide of each selected TGF- $\beta$ -R polypeptide can be prepared and introduced into the cells of a patient using either viral or non-viral methods as described herein. Each such mutant is typically designed to compete with endogenous polypeptide in its biological role.

20 In addition, a TGF- $\beta$ -R polypeptide, whether biologically active or not, may be used as an immunogen, that is, the polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised. Selective binding agents that bind to a TGF- $\beta$ -R polypeptide (as described herein) may be used for *in vivo* and *in vitro* diagnostic purposes, including, but not limited to, use in labeled form to detect the presence of  
25 TGF- $\beta$ -R polypeptide in a body fluid or cell sample. The antibodies may also be used to prevent, treat, or diagnose a number of diseases and disorders, including those recited herein. The antibodies may bind to a TGF- $\beta$ -R polypeptide so as to diminish or block at least one activity characteristic of a TGF- $\beta$ -R polypeptide, or may bind to a polypeptide to increase at least one activity characteristic of a TGF- $\beta$ -R  
30 polypeptide (including by increasing the pharmacokinetics of the TGF- $\beta$ -R polypeptide).

WO 02/44379

PCT/US01/44866

The TGF- $\beta$ -R polypeptides of the present invention can be used to clone TGF- $\beta$ -R polypeptide receptors, using an expression cloning strategy. Radiolabeled (<sup>125</sup>Iodine) TGF- $\beta$ -R polypeptide or affinity/activity-tagged TGF- $\beta$ -R polypeptide (such as an Fc fusion or an alkaline phosphatase fusion) can be used in binding assays to identify a cell type or cell line or tissue that expresses TGF- $\beta$ -R polypeptide receptors. RNA isolated from such cells or tissues can be converted to cDNA, cloned into a mammalian expression vector, and transfected into mammalian cells (such as COS or 293 cells) to create an expression library. A radiolabeled or tagged TGF- $\beta$ -R polypeptide can then be used as an affinity ligand to identify and isolate from this library the subset of cells that express the TGF- $\beta$ -R polypeptide receptors on their surface. DNA can then be isolated from these cells and transfected into mammalian cells to create a secondary expression library in which the fraction of cells expressing TGF- $\beta$ -R polypeptide receptors is many-fold higher than in the original library. This enrichment process can be repeated iteratively until a single recombinant clone containing a TGF- $\beta$ -R polypeptide receptor is isolated. Isolation of the TGF- $\beta$ -R polypeptide receptors is useful for identifying or developing novel agonists and antagonists of the TGF- $\beta$ -R polypeptide signaling pathway. Such agonists and antagonists include soluble TGF- $\beta$ -R polypeptide receptors, anti-TGF- $\beta$ -R polypeptide receptor antibodies, small molecules, or antisense oligonucleotides, and they may be used for treating, preventing, or diagnosing one or more of the diseases or disorders described herein.

The human TGF- $\beta$ -R nucleic acids of the present invention are also useful tools for isolating the corresponding chromosomal TGF- $\beta$ -R polypeptide genes. The human TGF- $\beta$ -R genomic DNA can be used to identify heritable tissue-degenerating diseases.

Deposits of cDNA encoding isoforms 1 and 2 of human TGF- $\beta$ -R polypeptide, subcloned into the pGEMTeasy vector, having Accession Nos. PTA-2665 or PTA-2666, were made with the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 on November 10, 2000.

The following examples are intended for illustration purposes only, and should not be construed as limiting the scope of the invention in any way.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

Example 1: Cloning of the Human TGF- $\beta$ -R Polypeptide Gene

Generally, materials and methods as described in Sambrook *et al. supra* were used to clone and analyze genes encoding human TGF- $\beta$ -R polypeptides.

A partial transcript for isoform 1 of the human TGF- $\beta$ -R gene was derived from a human genomic clone (Celera Genomics, Rockville, MD; GA\_6739417). In order to obtain a full-length human TGF- $\beta$ -R cDNA sequence, several PCR primers (amplimers) corresponding to the 5' and 3' ends of the partial transcript were designed for use in PCR amplification of various cDNA libraries. The amplimers 2445-27 (5'-C-T-C-A-T-A-T-T-C-A-A-A-T-C-A-G-A-G-G-A-G-G-G-3'; SEQ ID NO: 16), 2445-28 (5'-GT-T-T-A-C-T-C-A-C-G-T-A-T-T-G-G-A-T-G-G-A-G-G-T-G-3'; SEQ ID NO: 17), 2445-29 (5'-C-T-C-T-A-A-T-G-T-G-G-A-G-C-A-G-C-T-G-A-T-C-3'; SEQ ID NO: 18), and 2450-21 (5'-C-A-G-C-A-G-A-G-A-G-C-T-C-T-G-C-C-A-T-C-T-G-C-3'; SEQ ID NO: 19) correspond to the 5' end of the partial transcript. The amplimers 2445-30 (5'-G-A-G-C-A-G-C-C-A-C-A-C-G-G-T-T-C-T-C-C-A-C-C-A-A-G-3'; SEQ ID NO: 20), 2445-31 (5'-G-A-A-G-T-G-T-T-C-A-C-A-T-A-G-T-G-C-A-C-A-C-T-C-3'; SEQ ID NO: 21), 2445-32 (5'-C-T-C-A-T-C-T-T-G-T-G-T-T-C-G-T-C-A-T-C-C-T-G-3'; SEQ ID NO: 22), and 2445-22 (5'-G-A-C-C-A-T-C-A-G-G-A-G-A-A-G-A-G-T-C-T-G-A-C-3'; SEQ ID NO: 23) correspond to the 3' end of the partial transcript.

PCR amplifications were then performed using 50 ng of cDNA as a template (obtained from one of 77 proprietary human tissue cDNA libraries), 5 pmol each of a suitable 5' and 3' amplimer, and Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), according to the manufacturer's recommended procedure. Reactions were performed at 94°C for 1 minute for one cycle; 94°C for 15 seconds, 62°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute for 40 cycles; and 72°C for 7 minute for 1 cycle. A 339 bp PCR product was obtained in amplification reactions containing the amplimers 2445-29 and 2445-32 and either a fetal ovary or fetal skin cDNA library template.

To isolate full-length cDNA sequences for the human TGF- $\beta$ -R polypeptide, 5'- and 3'-RACE was performed using the Advantage-High Fidelity 2 PCR kit (Clontech), 50 ng of either the fetal ovary or fetal skin cDNA libraries, and a "touchdown" PCR protocol (Don *et al.*, 1991, *Nucleic Acids Res.* 19:4008). The 5'-

WO 02/44379

PCT/US01/44866

RACE reactions were performed using 10 pmol of the amplimers 2445-32 and 1916-83 (5'-G-G-C-T-C-G-T-A-T-G-T-T-G-T-G-T-G-G-A-A-T-T-G-T-G-A-G-C-G-3'; SEQ ID NO: 24), the latter amplimer corresponding to the nucleic acid sequence of the vector used to construct the cDNA libraries (pSPORT). The 3'-RACE reactions were performed using 10 pmol of the amplimers 2445-29 and 1916-80 (5'-T-G-C-A-A-G-G-C-G-A-T-T-A-A-G-T-T-G-G-T-A-A-C-G-C-C-A-G-3'; SEQ ID NO: 25), the latter amplimer corresponding to the nucleic acid sequence of pSPORT. Reactions were performed at 94°C for 2 minutes for one cycle; 94°C for 5 seconds and 72°C for 4 minutes for 5 cycles; 94°C for 5 seconds and 69°C for 4 minutes for 5 cycles; 94°C for 5 seconds and 67°C for 4 minutes for 25 cycles; and 72°C for 7 minutes for 1 cycle.

Following 5'- and 3'-RACE, nested PCR was performed using the Advantage-High Fidelity 2 PCR kit, 10 µl of a 1:50 dilution of the first round 5'- or 3'-RACE amplification products, and an appropriate pair of amplimers, in a volume of 50 µl. For amplification of the 5'-RACE product, the amplimers 2450-22 and 1916-82 (5'-C-A-T-G-A-T-T-A-C-G-C-C-A-A-G-C-T-C-T-A-A-T-A-C-G-A-C-T-C-3'; SEQ ID NO: 26) were used. For amplification of the 3'-RACE product, the amplimers 2450-21 and 1916-81 (5'-T-C-A-C-G-A-C-G-T-T-G-T-A-A-A-C-G-A-C-G-G-C-C-A-G-T-G-3'; SEQ ID NO: 27) were used. Reactions were performed at 94°C for 2 minutes for one cycle; 94°C for 5 seconds and 72°C for 4 minutes for 5 cycles; 94°C for 5 seconds and 70°C for 4 minutes for 5 cycles; 94°C for 5 seconds and 68°C for 4 minutes for 25 cycles; and 72°C for 7 minutes for 1 cycle. Following separation on a 1% agarose gel, well-defined PCR products were isolated from the gel, purified using a gel extraction kit (Qiagen), and then sequenced.

Sequence analysis of the full-length cDNA for isoform 1 of the human TGF-β-R polypeptide indicated that the isoform 1 gene comprises a 420 bp open reading frame encoding a protein of 140 amino acids (Figure 1). Sequence analysis of the full-length cDNA for isoform 2 of the human TGF-β-R polypeptide indicated that the isoform 2 gene comprises a 585 bp open reading frame encoding a protein of 195 amino acids (Figure 2).

A search of the Non-Redundant Protein database, using the amino acid sequence of isoforms 1 or 2 of human TGF-β-R polypeptide, indicated that these

WO 02/44379

PCT/US01/44866

proteins share the greatest degree of similarity with human and murine Growth Differentiation Factor-3 (GDF-3). Most importantly, the location and spacing pattern of cysteine residues (which play an important role in GDF-3 structure) is conserved between TGF- $\beta$ -R polypeptide and GDF-3. The similarity between TGF- $\beta$ -R polypeptide and GDF-3 suggests that TGF- $\beta$ -R polypeptide is a novel member of the TGF- $\beta$  family. Figures 3 and 4 illustrate the amino acid sequence alignments for either isoform 1 or isoform 2 of human TGF- $\beta$ -R polypeptide (lower sequence in each figure) and human GDF-3 (upper sequence in each figure).

The intron-exon structure for the TGF- $\beta$ -R gene was predicted from the genomic clone GA\_6739417 (Celera Genomics). Figures 5A-5C illustrate the exon/intron structure for isoform 1 of the human TGF- $\beta$ -R gene (SEQ ID NO: 6). The location of the deduced amino acid sequence of exons 1 (SEQ ID NO: 7), 2 (SEQ ID NO: 8), and 3 (SEQ ID NO: 9) is indicated. Figures 6A-6C illustrate the exon/intron structure for isoform 2 of the human TGF- $\beta$ -R gene (SEQ ID NO: 10). The location of the deduced amino acid sequence of exons 1 (SEQ ID NO: 11), 2 (SEQ ID NO: 12), and 3 (SEQ ID NO: 13) is indicated.

#### Example 2: TGF- $\beta$ -R mRNA Expression

Multiple human tissue Northern blots (Clontech) were hybridized with a 540 bp probe generated by PCR amplification of human TGF- $\beta$ -R cDNA using the primers 2445-28 and 2445-31. The probe was radioactively labeled using a Redi-Prime II kit (Amersham) according to the manufacturer's instructions. Northern blots were prehybridized for 30 minutes at 60°C in Rapid-Hyb buffer (Amersham), and then hybridized in a hybridization oven (Stratagene) for 1 hour at 60°C in Rapid-Hyb buffer containing the radioactively labeled probe. Following hybridization, the blots were washed twice in 2X SSC and 0.1% SDS at room temperature and then once in 0.1X SSC and 0.5% SDS for 1 hour at 68°C. Hybridized blots were examined by autoradiography.

Northern blot analysis indicated that a transcript of 6 kb was expressed in prostate, testis, ovary, and fetal liver, as well as in the following cell lines: Raji (Burkitt's lymphoma), MOLT-4 (lymphoblastic leukemia), and G361 (melanoma).

WO 02/44379

PCT/US01/44866

The expression of TGF- $\beta$ -R mRNA is localized by *in situ* hybridization. A panel of normal embryonic and adult mouse tissues is fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned at 5  $\mu$ m. Sectioned tissues are permeabilized in 0.2 M HCl, digested with Proteinase K, and acetylated with triethanolamine and acetic anhydride. Sections are prehybridized for 1 hour at 60°C in hybridization solution (300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 1X Denhardt's solution, 0.2% SDS, 10 mM DTT, 0.25 mg/ml tRNA, 25  $\mu$ g/ml polyA, 25  $\mu$ g/ml polyC and 50% formamide) and then hybridized overnight at 60°C in the same solution containing 10% dextran and 2 x 10<sup>4</sup> cpm/ $\mu$ l of a <sup>33</sup>P-labeled antisense riboprobe complementary to the human TGF- $\beta$ -R gene. The riboprobe is obtained by *in vitro* transcription of a clone containing human TGF- $\beta$ -R cDNA sequences using standard techniques.

Following hybridization, sections are rinsed in hybridization solution, treated with RNaseA to digest unhybridized probe, and then washed in 0.1X SSC at 55°C for 30 minutes. Sections are then immersed in NTB-2 emulsion (Kodak, Rochester, NY), exposed for 3 weeks at 4°C, developed, and counterstained with hematoxylin and eosin. Tissue morphology and hybridization signal are simultaneously analyzed by darkfield and standard illumination for brain (one sagittal and two coronal sections), gastrointestinal tract (esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, proximal colon, and distal colon), pituitary, liver, lung, heart, spleen, thymus, lymph nodes, kidney, adrenal, bladder, pancreas, salivary gland, male and female reproductive organs (ovary, oviduct, and uterus in the female; and testis, epididymus, prostate, seminal vesicle, and vas deferens in the male), BAT and WAT (subcutaneous, peri-renal), bone (femur), skin, breast, and skeletal muscle.

#### Example 3: Production of TGF- $\beta$ -R Polypeptides

##### A. Expression of TGF- $\beta$ -R Polypeptides in Bacteria

PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a TGF- $\beta$ -R polypeptide using primers corresponding to the 5' and 3' ends of the sequence. The amplified DNA products may be modified to contain restriction enzyme sites to allow for insertion into expression vectors. PCR products are gel purified and inserted into expression vectors using standard recombinant DNA methodology. An exemplary

WO 02/44379

PCT/US01/44866

vector, such as pAMG21 (ATCC no. 98113) containing the lux promoter and a gene encoding kanamycin resistance is digested with Bam HI and Nde I for directional cloning of inserted DNA. The ligated mixture is transformed into an *E. coli* host strain by electroporation and transformants are selected for kanamycin resistance.

5 Plasmid DNA from selected colonies is isolated and subjected to DNA sequencing to confirm the presence of the insert.

Transformed host cells are incubated in 2xYT medium containing 30 µg/mL kanamycin at 30°C prior to induction. Gene expression is induced by the addition of N-(3-oxohexanoyl)-dl-homoserine lactone to a final concentration of 30 ng/mL

10 followed by incubation at either 30°C or 37°C for six hours. The expression of TGF-β-R polypeptide is evaluated by centrifugation of the culture, resuspension and lysis of the bacterial pellets, and analysis of host cell proteins by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Inclusion bodies containing TGF-β-R polypeptide are purified as follows.

15 Bacterial cells are pelleted by centrifugation and resuspended in water. The cell suspension is lysed by sonication and pelleted by centrifugation at 195,000 xg for 5 to 10 minutes. The supernatant is discarded, and the pellet is washed and transferred to a homogenizer. The pellet is homogenized in 5 mL of a Percoll solution (75% liquid Percoll and 0.15 M NaCl) until uniformly suspended and then diluted and centrifuged

20 at 21,600 xg for 30 minutes. Gradient fractions containing the inclusion bodies are recovered and pooled. The isolated inclusion bodies are analyzed by SDS-PAGE.

A single band on an SDS polyacrylamide gel corresponding to *E. coli*-produced TGF-β-R polypeptide is excised from the gel, and the N-terminal amino acid sequence is determined essentially as described by Matsudaira *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:10-35.

25

#### B. Expression of TGF-β-R Polypeptide in Mammalian Cells

PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a TGF-β-R polypeptide using primers corresponding to the 5' and 3' ends of the sequence. The

30 amplified DNA products may be modified to contain restriction enzyme sites to allow for insertion into expression vectors. PCR products are gel purified and inserted into expression vectors using standard recombinant DNA methodology. An exemplary

WO 02/44379

PCT/US01/44866

expression vector, pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), that contains an Epstein-Barr virus origin of replication, may be used for the expression of TGF- $\beta$ -R polypeptides in 293-EBNA-1 cells. Amplified and gel purified PCR products are ligated into pCEP4 vector and introduced into 293-EBNA cells by lipofection. The transfected cells are selected in 100  $\mu$ g/mL hygromycin and the resulting drug-resistant cultures are grown to confluence. The cells are then cultured in serum-free media for 72 hours. The conditioned media is removed and TGF- $\beta$ -R polypeptide expression is analyzed by SDS-PAGE.

TGF- $\beta$ -R polypeptide expression may be detected by silver staining. Alternatively, TGF- $\beta$ -R polypeptide is produced as a fusion protein with an epitope tag, such as an IgG constant domain or a FLAG epitope, which may be detected by Western blot analysis using antibodies to the peptide tag.

TGF- $\beta$ -R polypeptides may be excised from an SDS-polyacrylamide gel, or TGF- $\beta$ -R fusion proteins are purified by affinity chromatography to the epitope tag, and subjected to N-terminal amino acid sequence analysis as described herein.

#### C. Expression and Purification of TGF- $\beta$ -R Polypeptide in Mammalian Cells

TGF- $\beta$ -R polypeptide expression constructs are introduced into 293 EBNA or CHO cells using either a lipofection or calcium phosphate protocol.

To conduct functional studies on the TGF- $\beta$ -R polypeptides that are produced, large quantities of conditioned media are generated from a pool of hygromycin selected 293 EBNA clones. The cells are cultured in 500 cm Nunc Triple Flasks to 80% confluence before switching to serum free media a week prior to harvesting the media. Conditioned media is harvested and frozen at -20°C until purification.

Conditioned media is purified by affinity chromatography as described below. The media is thawed and then passed through a 0.2  $\mu$ m filter. A Protein G column is equilibrated with PBS at pH 7.0, and then loaded with the filtered media. The column is washed with PBS until the absorbance at  $A_{280}$  reaches a baseline. TGF- $\beta$ -R polypeptide is eluted from the column with 0.1 M Glycine-HCl at pH 2.7 and immediately neutralized with 1 M Tris-HCl at pH 8.5. Fractions containing TGF- $\beta$ -R polypeptide are pooled, dialyzed in PBS, and stored at -70°C.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

For Factor Xa cleavage of the human TGF- $\beta$ -R polypeptide-Fc fusion polypeptide, affinity chromatography-purified protein is dialyzed in 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> at pH 8.0. The restriction protease Factor Xa is added to the dialyzed protein at 1/100 (w/w) and the sample digested overnight at room temperature.

Example 4: Production of Anti-TGF- $\beta$ -R Polypeptide Antibodies

Antibodies to TGF- $\beta$ -R polypeptides may be obtained by immunization with purified protein or with TGF- $\beta$ -R peptides produced by biological or chemical synthesis. Suitable procedures for generating antibodies include those described in Hudson and Bay, *Practical Immunology* (2nd ed., Blackwell Scientific Publications).

In one procedure for the production of antibodies, animals (typically mice or rabbits) are injected with a TGF- $\beta$ -R antigen (such as a TGF- $\beta$ -R polypeptide), and those with sufficient serum titer levels as determined by ELISA are selected for hybridoma production. Spleens of immunized animals are collected and prepared as single cell suspensions from which splenocytes are recovered. The splenocytes are fused to mouse myeloma cells (such as Sp2/0-Ag14 cells), are first incubated in DMEM with 200 U/mL penicillin, 200  $\mu$ g/mL streptomycin sulfate, and 4 mM glutamine, and are then incubated in HAT selection medium (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine). After selection, the tissue culture supernatants are taken from each fusion well and tested for anti-TGF- $\beta$ -R antibody production by ELISA.

Alternative procedures for obtaining anti-TGF- $\beta$ -R antibodies may also be employed, such as the immunization of transgenic mice harboring human Ig loci for production of human antibodies, and the screening of synthetic antibody libraries, such as those generated by mutagenesis of an antibody variable domain.

Example 5: Expression of TGF- $\beta$ -R Polypeptide in Transgenic Mice

To assess the biological activity of TGF- $\beta$ -R polypeptide, a construct encoding a TGF- $\beta$ -R polypeptide/Fc fusion protein under the control of a liver specific ApoE promoter is prepared. The delivery of this construct is expected to cause pathological changes that are informative as to the function of TGF- $\beta$ -R polypeptide. Similarly, a construct containing the full-length TGF- $\beta$ -R polypeptide

WO 02/44379

PCT/US01/44866

under the control of the beta actin promoter is prepared. The delivery of this construct is expected to result in ubiquitous expression.

To generate these constructs, PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a TGF- $\beta$ -R polypeptide using primers that correspond to the 5' and 3' ends of the desired sequence and which incorporate restriction enzyme sites to permit insertion of the amplified product into an expression vector. Following amplification, PCR products are gel purified, digested with the appropriate restriction enzymes, and ligated into an expression vector using standard recombinant DNA techniques. For example, amplified TGF- $\beta$ -R polypeptide sequences can be cloned into an expression vector under the control of the human  $\beta$ -actin promoter as described by Graham *et al.*, 1997, *Nature Genetics*, 17:272-74 and Ray *et al.*, 1991, *Genes Dev.* 5:2265-73.

Following ligation, reaction mixtures are used to transform an *E. coli* host strain by electroporation and transformants are selected for drug resistance. Plasmid DNA from selected colonies is isolated and subjected to DNA sequencing to confirm the presence of an appropriate insert and absence of mutation. The TGF- $\beta$ -R polypeptide expression vector is purified through two rounds of CsCl density gradient centrifugation, cleaved with a suitable restriction enzyme, and the linearized fragment containing the TGF- $\beta$ -R polypeptide transgene is purified by gel electrophoresis. The purified fragment is resuspended in 5 mM Tris, pH 7.4, and 0.2 mM EDTA at a concentration of 2 mg/mL.

Single-cell embryos from BDF1 x BDF1 bred mice are injected as described (International Pub. No. WO 97/23614). Embryos are cultured overnight in a CO<sub>2</sub> incubator and 15-20 two-cell embryos are transferred to the oviducts of a pseudopregnant CD1 female mice. Offspring obtained from the implantation of microinjected embryos are screened by PCR amplification of the integrated transgene in genomic DNA samples as follows. Ear pieces are digested in 20 mL ear buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, and 500 mg/mL proteinase K) at 55°C overnight. The sample is then diluted with 200 mL of TE, and 2 mL of the ear sample is used in a PCR reaction using appropriate primers.

At 8 weeks of age, transgenic founder animals and control animals are sacrificed for necropsy and pathological analysis. Portions of spleen are removed and

WO 02/44379

PCT/US01/44866

total cellular RNA isolated from the spleens using the Total RNA Extraction Kit (Qiagen) and transgene expression determined by RT-PCR. RNA recovered from spleens is converted to cDNA using the SuperScript™ Preamplification System (Gibco-BRL) as follows. A suitable primer, located in the expression vector sequence and 3' to the TGF-β-R polypeptide transgene, is used to prime cDNA synthesis from the transgene transcripts. Ten mg of total spleen RNA from transgenic founders and controls is incubated with 1 mM of primer for 10 minutes at 70°C and placed on ice. The reaction is then supplemented with 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM of each dNTP, 0.1 mM DTT, and 200 U of SuperScript II reverse transcriptase. Following incubation for 50 minutes at 42°C, the reaction is stopped by heating for 15 minutes at 72°C and digested with 2U of RNase H for 20 minutes at 37°C. Samples are then amplified by PCR using primers specific for TGF-β-R polypeptide.

15 Example 6: Biological Activity of TGF-β-R Polypeptide in Transgenic Mice

Prior to euthanasia, transgenic animals are weighed, anesthetized by isoflurane and blood drawn by cardiac puncture. The samples are subjected to hematology and serum chemistry analysis. Radiography is performed after terminal exsanguination. Upon gross dissection, major visceral organs are subject to weight analysis.

Following gross dissection, tissues (*i.e.*, liver, spleen, pancreas, stomach, the entire gastrointestinal tract, kidney, reproductive organs, skin and mammary glands, bone, brain, heart, lung, thymus, trachea, esophagus, thyroid, adrenals, urinary bladder, lymph nodes and skeletal muscle) are removed and fixed in 10% buffered Zn-Formalin for histological examination. After fixation, the tissues are processed into paraffin blocks, and 3 mm sections are obtained. All sections are stained with hematoxylin and eosin, and are then subjected to histological analysis.

The spleen, lymph node, and Peyer's patches of both the transgenic and the control mice are subjected to immunohistology analysis with B cell and T cell specific antibodies as follows. The formalin fixed paraffin embedded sections are deparaffinized and hydrated in deionized water. The sections are quenched with 3% hydrogen peroxide, blocked with Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA), and

WO 02/44379

PCT/US01/44866

incubated in rat monoclonal anti-mouse B220 and CD3 (Harlan, Indianapolis, IN). Antibody binding is detected by biotinylated rabbit anti-rat immunoglobulins and peroxidase conjugated streptavidin (BioGenex, San Ramon, CA) with DAB as a chromagen (BioTek, Santa Barbara, CA). Sections are counterstained with  
5 hematoxylin.

After necropsy, MLN and sections of spleen and thymus from transgenic animals and control littermates are removed. Single cell suspensions are prepared by gently grinding the tissues with the flat end of a syringe against the bottom of a 100 mm nylon cell strainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Cells are washed  
10 twice, counted, and approximately  $1 \times 10^6$  cells from each tissue are then incubated for 10 minutes with 0.5  $\mu\text{g}$  CD16/32(Fc $\gamma$ III/II) Fc block in a 20  $\mu\text{L}$  volume. Samples are then stained for 30 minutes at 2-8°C in a 100  $\mu\text{L}$  volume of PBS (lacking  $\text{Ca}^{+}$  and  $\text{Mg}^{+}$ ), 0.1% bovine serum albumin, and 0.01% sodium azide with 0.5  $\mu\text{g}$  antibody of  
15 (B220), CD11b (Mac-1), Gr-1, CD4, or CD8 (PharMingen, San Diego, CA). Following antibody binding, the cells are washed and then analyzed by flow cytometry on a FACScan (Becton Dickinson).

While the present invention has been described in terms of the preferred  
20 embodiments, it is understood that variations and modifications will occur to those skilled in the art. Therefore, it is intended that the appended claims cover all such equivalent variations that come within the scope of the invention as claimed.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

## WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
- 5 (a) the nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3;
- (b) the nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-2665 or PTA-2666;
- (c) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in either
- 10 SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;
- (d) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of any of (a) - (c); and
- (e) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of
- 15 any of (a) - (c).
2. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
- (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is at least about 70
- 20 percent identical to the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;
- (b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of the nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, the
- 25 nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-2665 or PTA-2666, or the nucleotide sequence of (a);
- (c) a region of the nucleotide sequence of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, the nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-2665 or PTA-2666, or the nucleotide sequence of (a) or (b) encoding a polypeptide
- 30 fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein the polypeptide fragment has an activity of the encoded polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or is antigenic;

WO 02/44379

PCT/US01/44866

- (d) a region of the nucleotide sequence of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, the nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-2665 or PTA-2666, or the nucleotide sequence of any of (a) - (c) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;
- 5 (e) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of any of (a) - (d); and
- (f) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of any of (a) - (d).
- 10 3. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
- (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;
- 15 (b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one amino acid insertion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;
- 20 (c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one amino acid deletion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;
- 25 (d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 that has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;
- 30 (e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the encoded

WO 02/44379

PCT/US01/44866

polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(f) a nucleotide sequence of any of (a) - (e) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

5 (g) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of any of (a) - (f); and

(h) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of any of (a) - (e).

10

4. A vector comprising the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

5. A host cell comprising the vector of Claim 4.

15

6. The host cell of Claim 5 that is a eukaryotic cell.

7. The host cell of Claim 5 that is a prokaryotic cell.

20

8. A process of producing a TGF- $\beta$ -R polypeptide comprising culturing the host cell of Claim 5 under suitable conditions to express the polypeptide, and optionally isolating the polypeptide from the culture.

9. A polypeptide produced by the process of Claim 8.

25

10. The process of Claim 8, wherein the nucleic acid molecule comprises promoter DNA other than the promoter DNA for the native TGF- $\beta$ -R polypeptide operatively linked to the DNA encoding the TGF- $\beta$ -R polypeptide.

30

11. The isolated nucleic acid molecule according to Claim 2, wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group

WO 02/44379

PCT/US01/44866

consisting of GAP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm.

5 12. A process for determining whether a compound inhibits TGF- $\beta$ -R polypeptide activity or TGF- $\beta$ -R polypeptide production comprising exposing a cell according to any of Claims 5, 6, or 7 to the compound and measuring TGF- $\beta$ -R polypeptide activity or TGF- $\beta$ -R polypeptide production in said cell.

10 13. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4; and

(b) the amino acid sequence encoded by the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-2665 or PTA-2666.

15

14. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) an amino acid sequence for an ortholog of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

20

(b) an amino acid sequence that is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

25

(c) a fragment of the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or is antigenic; and

30

(d) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, the nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-2665 or PTA-2666, or the amino acid sequence of either (a) or (b).

WO 02/44379

PCT/US01/44866

15. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
- (a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;
  - (b) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;
  - (c) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;
  - (d) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 that has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4; and
  - (e) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.
16. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.
17. The isolated polypeptide according to Claim 14, wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group consisting of GAP, BLASTP, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm.
18. A selective binding agent or fragment thereof that specifically binds the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

19. The selective binding agent or fragment thereof of Claim 18 that specifically binds the polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or a fragment thereof.
- 5
20. The selective binding agent of Claim 18 that is an antibody or fragment thereof.
21. The selective binding agent of Claim 18 that is a humanized antibody.
- 10
22. The selective binding agent of Claim 18 that is a human antibody or fragment thereof.
23. The selective binding agent of Claim 18 that is a polyclonal antibody or fragment thereof.
- 15
24. The selective binding agent Claim 18 that is a monoclonal antibody or fragment thereof.
- 20
25. The selective binding agent of Claim 18 that is a chimeric antibody or fragment thereof.
26. The selective binding agent of Claim 18 that is a CDR-grafted antibody or fragment thereof.
- 25
27. The selective binding agent of Claim 18 that is an antiidiotypic antibody or fragment thereof.
28. The selective binding agent of Claim 18 that is a variable region fragment.
- 30

WO 02/44379

PCT/US01/44866

29. The variable region fragment of Claim 28 that is a Fab or a Fab' fragment.
30. A selective binding agent or fragment thereof comprising at least one  
5 complementarity determining region with specificity for a polypeptide having the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.
31. The selective binding agent of Claim 18 that is bound to a detectable  
10 label.
32. The selective binding agent of Claim 18 that antagonizes TGF- $\beta$ -R polypeptide biological activity.
33. A method for treating, preventing, or ameliorating a TGF- $\beta$ -R  
15 polypeptide-related disease, condition, or disorder comprising administering to a patient an effective amount of a selective binding agent according to Claim 18.
34. A selective binding agent produced by immunizing an animal with a  
20 polypeptide comprising an amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.
35. A hybridoma that produces a selective binding agent capable of binding a polypeptide according to any of Claims 13, 14, or 15.
- 25 36. A method of detecting or quantitating the amount of TGF- $\beta$ -R polypeptide using the anti-TGF- $\beta$ -R antibody or fragment of Claim 18.
37. A kit for detecting or quantitating the amount of TGF- $\beta$ -R  
30 polypeptide in a biological sample, comprising the selective binding agent of Claim 18.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

38. A composition comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, and a pharmaceutically acceptable formulation agent.

39. The composition of Claim 38, wherein the pharmaceutically acceptable formulation agent is a carrier, adjuvant, solubilizer, stabilizer, or antioxidant.

40. A polypeptide comprising a derivative of the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15.

10

41. The polypeptide of Claim 40 that is covalently modified with a water-soluble polymer.

42. The polypeptide of Claim 41, wherein the water-soluble polymer is selected from the group consisting of polyethylene glycol, monomethoxy-polyethylene glycol, dextran, cellulose, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide copolymers, polyoxyethylated polyols, and polyvinyl alcohol.

43. A composition comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 and a pharmaceutically acceptable formulation agent.

44. The composition of Claim 43, wherein said nucleic acid molecule is contained in a viral vector.

25

45. A viral vector comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

46. A fusion polypeptide comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15 fused to a heterologous amino acid sequence.

30

WO 02/44379

PCT/US01/44866

47. The fusion polypeptide of Claim 46, wherein the heterologous amino acid sequence is an IgG constant domain or fragment thereof.

48. A method for treating, preventing, or ameliorating a medical condition comprising administering to a patient the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, or the polypeptide encoded by the nucleic acid of any of Claims 1, 2, or 3.

49. A method of diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition in a subject comprising:

(a) determining the presence or amount of expression of the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, or the polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 in a sample; and

(b) diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition based on the presence or amount of expression of the polypeptide.

50. A device, comprising:

(a) a membrane suitable for implantation; and

(b) cells encapsulated within said membrane, wherein said cells secrete a protein of any of Claims 13, 14, or 15; and

said membrane is permeable to said protein and impermeable to materials detrimental to said cells.

51. A method of identifying a compound that binds to a TGF- $\beta$ -R polypeptide comprising:

(a) contacting the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15 with a compound; and

(b) determining the extent of binding of the TGF- $\beta$ -R polypeptide to the compound.

52. The method of Claim 51, further comprising determining the activity of the polypeptide when bound to the compound.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

53. A method of modulating levels of a polypeptide in an animal comprising administering to the animal the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

5

54. A transgenic non-human mammal comprising the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

55. A process for determining whether a compound inhibits TGF- $\beta$ -R polypeptide activity or TGF- $\beta$ -R polypeptide production comprising exposing a transgenic mammal according to Claim 54 to the compound, and measuring TGF- $\beta$ -R polypeptide activity or TGF- $\beta$ -R polypeptide production in said mammal.

56. A nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 attached to a solid support.

15

57. An array of nucleic acid molecules comprising at least one nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

WO 02/44379

PCT/US01/44866

FIG. 1

```

gattctcagt agagacgttt gaactgtcca acccgatgct gccttccac ataaatgaga 60
ttttttctcg coaggcaac atg gtt tta ccc tca tat tca aaa aaa ccc tta 112
Met Val Leu Pro Ser Tyr Ser Lys Lys Pro Leu
1 5 10
atc tct aat gty gag cag ctg atc ctg ggg atc cgg ggc cag aat cgc 160
Ile Ser Asn Val Glu Gln Leu Ile Leu Gly Ile Pro Gly Gln Asn Arg
15 20 25
cgg gag ata ggc cat ggc cag gat atc ttt cca gca gag aag ctg tgc 208
Arg Glu Ile Gly His Gly Gln Asp Ile Phe Pro Ala Glu Lys Leu Cys
30 35 40
cat ctg cag gat cgc aag gty aac ctt cac aga got gcc tgg ggc gag 256
His Leu Gln Asp Arg Lys Val Asn Leu His Arg Ala Ala Trp Gly Glu
45 50 55
tgt att gtt gca ccc aag act ctc agc ttc tct tac tgt cag ggg acc 304
Cys Ile Val Ala Pro Lys Thr Leu Ser Phe Ser Tyr Cys Gln Gly Thr
60 65 70 75
tgc cgg gcc ctc aac agt gag ctc cgt cat tcc agc ttt gag tgc tat 352
Cys Pro Ala Leu Asn Ser Glu Leu Arg His Ser Ser Phe Glu Cys Tyr
80 85 90
aag agg gca gta cct acc tgt ccc tgg ctc ttc cag acc tgc cgt ccc 400
Lys Arg Ala Val Pro Thr Cys Pro Trp Leu Phe Gln Thr Cys Arg Pro
95 100 105
acc atg gtc aga ctc ttc tcc ctg atg gtc cag gat gac gaa cac aag 448
Thr Met Val Arg Leu Phe Ser Leu Met Val Gln Asp Asp Glu His Lys
110 115 120
atg agt gty cac tat gty aac act tcc ttg gty gag aag tgt ggc tgc 496
Met Ser Val His Tyr Val Asn Thr Ser Leu Val Glu Lys Cys Gly Cys
125 130 135
tct tga gatacccaaa agcctcctac tggcctcagg gccacctaaag tctcaggact 552
Ser
140
ttagtggggg gtgggattac ttitcatagc aagtagagct ctttgaaggg aggtgggatt 612
tggtttgttt ctcaasgcac agcaagaagg ttggcattat ggcagtaaca aat 665

```

WO 02/44379

PCT/US01/44866

## FIG. 2A

```

actagtgatt ctcaagtagag acgtttgact gtcccaacc gatgetgect toccacataa 60
atg aga ttt ttt tct gcc agg caa cat ggt ttt acc ctc ata ttc aaa 108
Met Arg Phe Phe Ser Ala Arg Gln His Gly Phe Thr Leu Ile Phe Lys
1 5 10 15
aag aca aag att cca gcc act gat gtc gct gat gcc agc ctg aat gaa 156
Lys Thr Lys Ile Pro Ala Thr Asp Val Ala Asp Ala Ser Leu Asn Glu
20 25 30
tgt tcc agt acc gaa agg aaa caa gac gta gtg ttg ctg ttc gtg acc 204
Cys Ser Ser Thr Glu Arg Lys Gln Asp Val Val Leu Phe Val Thr
35 40 45
ttg tcc cac aca cag cca cct ctg ttt cac ctg cct tat gtc cag aaa 252
Leu Ser His Thr Gln Pro Pro Leu Phe His Leu Pro Tyr Val Gln Lys
50 55 60
ccc tta atc tct aat gtg gag cag ctg atc ctg ggg atc ccg ggc cag 300
Pro Leu Ile Ser Asn Val Glu Gln Leu Ile Leu Gly Ile Pro Gly Gln
65 70 75
aat cgc cgg gag ata ggc cat ggc cag gat atc ttt cca gca gag aag 348
Asn Arg Arg Glu Ile Gly His Gly Gln Asp Ile Phe Pro Ala Glu Lys
85 90 95
ctc tgc cat ctg cag gat cgc aag gtg aac ctt cac aga gct gcc tgg 396
Leu Cys His Leu Gln Asp Arg Lys Val Asn Leu His Arg Ala Ala Trp
100 105 110
ggc gag tgt att gtt goa ccc aag act ctc agc ttc tct tac tgt cag 444
Gly Glu Cys Ile Val Ala Pro Lys Thr Leu Ser Phe Ser Tyr Cys Gln
115 120 125
ggg acc tgc ccg gcc ctc aac agt gag ctc cgt cat tcc agc ttt gag 492
Gly Thr Cys Pro Ala Leu Asn Ser Glu Leu Arg His Ser Ser Phe Glu
130 135 140
tgc tat aag agg gca gta cct acc tgt ccc tgg ctc ttc cag acc tgc 540
Cys Tyr Lys Arg Ala Val Pro Thr Cys Pro Trp Leu Phe Gln Thr Cys
145 150 155
cgt ccc acc atg gtc aga ctc ttc tcc ctg atg gtc cag gat gac gaa 588
Arg Pro Thr Met Val Arg Leu Phe Ser Leu Met Val Gln Asp Asp Glu
165 170 175
cac aag atg agt gtg cac tat gtg aac act tcc ttg gtg gag aag tgt 636
His Lys Met Ser Val His Tyr Val Asn Thr Ser Leu Val Glu Lys Cys
180 185 190
ggc tgc tct tga gataccocaa agcctcotac tggcctcagg gccacctaaag 688
Gly Cys Ser
195

```

WO 02/44379

PCT/US01/44866

FIG. 2B

```
tctcaggact ttagtagggg gtgggattac tttcatagc aagtagagct ctttgaagg 748  
aggtaggatt tggtttggtt ctcaaagcac agcaagaagg ttggcattat ggcagtaaaa 808  
tc 810
```





WO 02/44379

PCT/US01/44866

## FIG. 5A

```

tgagaaac aatctgtatt atcacttctt gcacotccat tctgtaaaca ggagttggtg 60
ttgaagttgt tctgggagtg agagtttctc tcacttgaat ttaattttctc ttgaatgcgt 120
gatoagctac aagctgtggg gggttagaat agggcotaca gctgggcaag tggatattta 180
aagacagcga aggggaagcc ccgcttctga gacaggtat gttggagggt ggotgtggga 240
gaagtggcag ctcoctggctc attcctgggc tcttgctctc gggcttttg tgcattgtct 300
tgagctcagt agagacgttt gactgtccca acccgatgct gcctccocac ataatgaga 360
ttttttctg ccaggcaac atg gtt tta ccc tca tat tca aaa gtaagtacct 413
Met Val Leu Pro Ser Tyr Ser Lys 8
ggagcctggt tctttgcoag ggaaggagtg atccagaagc tgcctggcag cattttgtgg 473
ggctggctag ggaatgggtt gtaaatgaca acagatatta agggctcttg tgagttagagc 533
aaggagtttg gtacagaata ttcttcaagct ggtctagcag aaatggaatc tgcttctctg 593
ttcagctctc gcaggcttg tatgtaggat gtctttaagc tttatggctg atgccotaaa 653
gttctgtgtg taaggatgct ctaaagtgtg aagtacacag ctgctgggct gggcaactat 713
agtgttttgg gagataaaca gggcaagtgg ctgtcttag gtcattgtga ctggaatgat 773
ttcagtaact agggcaatca ttctgactta attccagggg tagggtgatg ggagttgag 833
aacctcagtc catccctggc tgctgtggac taagcaactga ctttgacaag ctgagactgc 893
taagtctttg tctctgctctg cccggctggg tagtggggag taagaagctg aaaggagggt 953
gggactttcc acgatagtgg cctcctggag ctccactctc tctttcccta caggctcata 1013
gttctacac agctactggc ttctctgttt tgaggcagtt tctctcttg gggtttctt 1073
gataaagtta tggccttggg tgccaltgt ccccatgccc actgagcttg ttctagagtt 1133
cgaggccatc agaaggggcc tccaaagatt ccttctggga tctttccca ttatcttttc 1193
atcctaccag tcagaggag ggtcattatt ggaatctctc tgtttactca cgtattggat 1253
ggaggtggtg cccacctctc tggcagagac aaagattcca gccactgatg tcgctgatgc 1313
cagcctgaat gaatgttcca gtaccgaaag gaacaagac gtagtgttgc tgttcgtgac 1373
ctgtccac acacagccac ctctgtttoa cctgccttat gtccag aaa ccc tta 1428
Lys Pro Leu 11
atc tct aat gtg gag cag ctg atc ctg ggg atc ccg gcc cag aat cgc 1476
Ile Ser Asn Val Glu Gln Leu Ile Leu Gly Ile Pro Gly Gln Asn Arg 27

```

WO 02/44379

PCT/US01/44866

## FIG. 5B

```

cgg gag ata ggc cat ggc cag gat atc ttt cca gca gag aag ctc tgc 1524
Arg Glu Ile Gly His Gln Asp Ile Phe Pro Ala Glu Lys Leu Cys 43

cat ctg cag gat cgc aag gtg aac ctt cac aga gct gcc tgg ggc gag 1572
His Leu Gln Asp Arg Lys Val Asn Leu His Arg Ala Ala Trp Gly Glu 59

tgt att gtt gca ccc aag act ctc agc ttc tct tac tgt cag ggg acc 1620
Cys Ile Val Ala Pro Lys Thr Leu Ser Phe Ser Tyr Cys Gln Gly Thr 75

tgc cgg gcc ctc aac agt gag ctc cgt cat tcc agc ttt gag tgc tat 1668
Cys Pro Ala Leu Asn Ser Glu Leu Arg His Ser Ser Phe Glu Cys Tyr 91

aag gtaagaacatg gagcctcgtt cttctctctc tggggtcata ttgggatagc 1721
Lys 92

actaagtgtc caactctcta ggcctggctc cttttgagtc aaggaagcca ttgaagttgg 1781

taattatgta atctagcact gatgcaggtg gtagcatctt ccccgccctg tgacctatc 1841

ccttatcttt attcataaga aacatcagct tcttaaatgat tgtttctgaaa cagccctgat 1901

ccagcagctt ctcgccagc cctcctctc ccttcccatg tatccctgac aagtctaactg 1961

atgccttag atatgaggtc gtggtatga ggcactcacc attctgcat ttgtttctgc 2021

ag agg gca gta cct acc tgt ccc tgg ctc ttc cag acc tgc cgt ccc 2068
Arg Ala Val Pro Thr Cys Pro Trp Leu Phe Gln Thr Cys Arg Pro 107

acc atg gtc aga ctc ttc tcc ctg atg gtc cag gat gac gaa cac aag 2116
Thr Met Val Arg Leu Phe Ser Leu Met Val Gln Asp Asp Glu His Lys 123

atg agt gtg cac tat gtg aac act tcc ttg gtg gag aag tgt ggc tgc 2164
Met Ser Val His Tyr Val Asn Thr Ser Leu Val Glu Lys Cys Gly Cys 139

tct tga gatacccaa agcctctac tggcctcagg gccacctaac tctcaggact 2220
Ser * 140

ttagtgggg gtgggattac ttttcatagc aagtagagct ctttgaaggg aggtgggatt 2280

tggtttgttt ctcaaagcac agcaagaagg ttggcattat ggcagtaacc cctcatagat 2340

gcttctcttt gatgtggcag gggcccccta gtgctgttct cagtcactcc tactactggg 2400

aagctgggcc cattgagatg tctgactate gctgtcctag attgtgagtg gcttgggctt 2460

agtgccacct ctgggatcat ttaggtgggg aaagaggaac tggaaattgga cgcattgacg 2520

ctctgggggt aggggtaaaa ttgttaccag tgttaagctg gctttggact ctttctgagc 2580

cattcagctg ctatcatcct tctctgtacc attggcctgg ggctggtcca gaactgaact 2640

cagcatgtac attctctc acctaacaact cctggcctct ttagaggag tgaagactct 2700

```

WO 02/44379

PCT/US01/44866

## FIG. 5C

gtggaagaaa gcattctgto atgggctagt catgggtaaa gggccccaag gecttcacaa 2760  
cctgggtgtoa gatgggagcc tgagagtaga ggatgttgct tgactgacag agggggcctc 2820  
tggcctcatg gaaagtttgt ctcactatca ttttaaggaae ttgatattag ctttttcaet 2880  
atctttaata aaactatagg accattgttg tgggtctctt atgttggata totattactt 2940

WO 02/44379

PCT/US01/44866

## FIG. 6A

```

tgagaaacac aatctgtatt atcacttctt gcacotccat tctgtaaaca ggagttggta 60
ttgaagttgt tctgggagtg agagtttctc tcacttgaat ttaatttctc ttgaatgogt 120
gatcagctac aagctgtggg gggttagaat agggcctaca gctgggcacg tggatattta 180
aagacagcga aggggaagcc ccgcttctga gacaggtat gttggagggg gctgtgsgga 240
gaagtggcag ctctggctc attcctgggc tcttggctct gggcttttg tgcattgttt 300
tgagctcagt agagaagttt gactgtccca acccgatgct gccttcccac ataa atg 357
Met 1
aga ttt ttt tct gcc agg csa cat ggt ttt acc ctg ata ttc aaa a 403
Arg Phe Phe Ser Ala Arg Gln His Gly Phe Thr Leu Ile Phe Lys
gtaagtagc tggagcgtg gtctttgcca gggaggagt gatocagaag ctgcctggca 461
gcatttttg gggctgttca ggaatgggg tgbaatgac aacagatatt aagggtctt 522
gtgagtagag caaggagttg ggtacagaat attcttcagc tggctotagca gaaatggaat 582
ctgcttctcg gtttcagctc tgcagggttg gtatgtagga tgtctttaag ctttatggct 642
gatgccctaa agttctgtgt gtaaggatgc tctaaagtgt gaagtacaca gctgctgggc 702
tgggcaacta tagtgttttg ggagataaac agggcaagtg gcttgtctta ggtcatggtg 762
actggaatga ttttcagtac tagggcaatc attctgactt aattccaggg gtagggtgat 822
gggagttgag gaacctcagt coactcctgy ctgctgtgga ctaagcactg actttgacaa 882
gctgagactg ctaagtcttt gtctgtctct gcccgctgg gtagtgggga gtaagaagct 942
gaaagggagg tgggactttc cagatagtg gcctcctgga gcttccactc tcttctcct 1002
acaggctcat agttcctaca cagctactgg ctctctgttt ttgaggcagt ttcctcttg 1062
ggggtttcct tgataaagtt atgggcttgg gtgcccattg tcccccagtc cactgagctt 1122
gttctagagt tgcaggacca tagaaggggc ctccaaagat tcttctggg atctttcccc 1182
attatctttt cactctacca gtcagagggg gggctcattat tggatatcta ctgtttactc 1242
acgtatttga tggaggtggg gcccaacctc ttggcag ag aca aag att cca gcc 1296
Lys Thr Lys Ile Pro Ala 22
act gat gtc gct gat gcc agc ctg aat gaa tgt tcc agt acc gaa agg 1344
Thr Asp Val Ala Asp Ala Ser Leu Asn Glu Cys Ser Ser Thr Glu Arg 38
aaa caa gac gta gtg ttg ctg ttc gtg acc ttg tcc cac aca cag cca 1392
Lys Gln Asp Val Val Leu Leu Phe Val Thr Leu Ser His Thr Gln Pro 54

```

WO 02/44379

PCT/US01/44866

FIG. 6B

```

cct ctg ttt cac ctg cct tat gtc cag aaa ccc tta atc tct aat gtg 1440
Pro Leu Phe His Leu Pro Tyr Val Gln Lys Pro Leu Ile Ser Asn Val 70

gag cag ctg atc ctg ggg atc ccg ggc cag aat cgc cgg gag ata ggc 1488
Glu Gln Leu Ile Leu Gly Ile Pro Gly Gln Asn Arg Arg Glu Ile Gly 86

cat ggc cag gat atc ttt cca gca gag aag ctc tgc cat ctg cag gat 1536
His Gly Gln Asp Ile Phe Pro Ala Glu Lys Leu Cys His Leu Gln Asp 102

cgc aag gtg aac ctt cac aga get gcc tgg ggc gag tgt att gtt gca 1584
Arg Lys Val Asn Leu His Arg Ala Ala Trp Gly Glu Cys Ile Val Ala 116

ccc aag act ctc agc ttc tct tac tgt cag ggg acc tgc ccg gcc ctc 1632
Pro Lys Thr Leu Ser Phe Ser Tyr Cys Gln Gly Thr Cys Pro Ala Leu 134

aac agt gag ctc cgt cat tcc agc ttt gag tgc tat aag gtaagacatg 1681
Asn Ser Glu Leu Arg His Ser Ser Phe Glu Cys Tyr Lys 147

gagcctcgtt ctttctcttc tggggtcata ttgggatagc actaagtgt caactctcta 1741

ggcctggctc cttttgagtc aaggaagcca ttgaagtgg taattatgta atctagcact 1801

gatgcagtgt gtacatctt ccccgccctg tgaccttacc cottatcttt attcataaga 1861

aacatcagct tcttaaaagt tgttctgaaa cagccctgat ccagcagctt ctcccaggc 1921

ctccttctc ccttcccatg taccctgac aagtctactg atgcccttag atatgaggct 1981

gtggctatga ggcactcacc attctgcoat ttgtttctgc ag agg gca gta cct 2035
Arg Ala Val Pro 151

acc tgt ccc tgg ctc ttc cag acc tgc cgt ccc acc atg gtc aga ctc 2083
Thr Cys Pro Trp Leu Phe Gln Thr Cys Arg Pro Thr Met Val Arg Leu 167

ttc tcc ctg atg gtc cag gat gac gaa cac aag atg agt gtg cac tat 2131
Phe Ser Leu Met Val Gln Asp Asp Glu His Lys Met Ser Val His Tyr 183

gtg aac act tcc ttg gtg gag aag tgt gcc tgc tct tga gatacccaa 2180
Val Asn Thr Ser Leu Val Glu Lys Cys Gly Cys Ser * 195

agcctcctac tggcctcagg gccacctaaag tctcaggact ttagtgggg gtgggattac 2240

tttctatagc aagtagagct ctttgaaggg aggtgggatt tggtttgttt ctcaaagcac 2300

agcaagaagg ttggcattat ggcagtaacc cctcatagat gcttctcttt gatgtggcag 2360

gggcccccta gtgctgttct cagtoactcc tactactggg aagctgggccc cattgagatg 2420

ctgactatc gctgtcctag attgtgagtg ggcgggctt agtgccacct ctgggateat 2480

ttaggtgggg aaagaggaac tggaattgga cgcctgtcag ctcttggggg aggggtaaaa 2540

ttgttaccag tgttaagctg gctttggact ctttctgagc cattcagctg ctatcatcct 2600

```

WO 02/44379

PCT/US01/44866

## FIG. 6C

```
tctctgtacc attggcctgy ggtgggtcca gaactgacct cagcatgtac attcctcctc 2660
acctaacact cotggcctct ttagagggag tgaagactct gtggaagaaa gcattctgtc 2720
atgggctagt catgggtaa gggccccaag gccttcacaa cctgggtgca gatgggagcc 2780
tgagagtaga ggatgttgc tgaactgacag agggggcctc tggcctcatg gaaagtttgt 2840
ctcactatca ttaaggaac ttgataattag ctttttccact atctttaata aaactatagg 2900
accattggtg tgggtctctt atgttgata tctattactt 2940
```

WO 02/44379

PCT/US01/44866

## SEQUENCE LISTING

<110> Jing, Shuqian

<120> Transforming Growth Factor-Beta-Related Molecules and Uses Thereof

<130> 00-659-B

<140>

<141>

<150> 60/253,476

<151> 2000-11-28

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 665

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (80)..(502)

<400> 1

gattctcagt agagacgttt gactgtccca acccgatgct gccttccac ataatgaga 60

ttttttctg ccaggcaac atg gtt tta ccc tca tat tca aaa aaa ccc tta 112

Met Val Leu Pro Ser Tyr Ser Lys Lys Pro Leu

1 5 10

atc tct aat gtg gag cag ctg atc ctg ggg atc cgg ggc cag aat cgc 160

Ile Ser Asn Val Glu Gln Leu Ile Leu Gly Ile Pro Gly Gln Asn Arg

15 20 25

cgg gag ata ggc cat ggc cag gat atc ttt cca gca gag aag ctc tgc 208

Arg Glu Ile Gly His Gly Gln Asp Ile Phe Pro Ala Glu Lys Leu Cys

30 35 40

cat ctg cag gat cgc aag gtg aac ctt cac aga gct gcc tgg ggc gag 256

His Leu Gln Asp Arg Lys Val Asn Leu His Arg Ala Ala Trp Gly Glu

45 50 55

tgt att gtt gca ccc aag act ctc agc ttc tct tac tgt cag ggg acc 304

Cys Ile Val Ala Pro Lys Thr Leu Ser Phe Ser Tyr Cys Gln Gly Thr

60 65 70 75

tgc cgg gcc ctc aac agt gag ctc cgt cat tcc agc ttt gag tgc tat 352

Cys Pro Ala Leu Asn Ser Glu Leu Arg His Ser Ser Phe Glu Cys Tyr

80 85 90

aag agg gca gta cct acc tgt ccc tgg ctc ttc cag acc tgc cgt ccc 400

Lys Arg Ala Val Pro Thr Cys Pro Trp Leu Phe Gln Thr Cys Arg Pro

95 100 105

WO 02/44379

PCT/US01/44866

```

acc atg gtc aga ctc ttc tcc ctg atg gtc cag gat gac gaa cac aag 448
Thr Met Val Arg Leu Phe Ser Leu Met Val Gln Asp Asp Glu His Lys
      110                      115                      120

atg agt gtg cac tat gtg aac act tcc ttg gtg gag aag tgt ggc tgc 496
Met Ser Val His Tyr Val Asn Thr Ser Leu Val Glu Lys Cys Gly Cys
      125                      130                      135

tct tga gatacccoaa agcctctac tggcctcagg gccacctaag tctcaggact 552
Ser
140

ttagtagggg gtgggattac ttttcatagc aagttaggct ctttgaaggg agtggggatt 612

tggtttggtt ctcaaagcac agcaagaagg ttggcattat ggcagtaaca aat 665

```

<210> 2  
 <211> 140  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

```

<400> 2
Met Val Leu Pro Ser Tyr Ser Lys Lys Pro Leu Ile Ser Asn Val Glu
1      5      10      15

Gln Leu Ile Leu Gly Ile Pro Gly Gln Asn Arg Arg Glu Ile Gly His
20     25     30

Gly Gln Asp Ile Phe Pro Ala Glu Lys Leu Cys His Leu Gln Asp Arg
35     40     45

Lys Val Asn Leu His Arg Ala Ala Trp Gly Glu Cys Ile Val Ala Pro
50     55     60

Lys Thr Leu Ser Phe Ser Tyr Cys Gln Gly Thr Cys Pro Ala Leu Asn
65     70     75     80

Ser Glu Leu Arg His Ser Ser Phe Glu Cys Tyr Lys Arg Ala Val Pro
85     90     95

Thr Cys Pro Trp Leu Phe Gln Thr Cys Arg Pro Thr Met Val Arg Leu
100    105    110

Phe Ser Leu Met Val Gln Asp Asp Glu His Lys Met Ser Val His Tyr
115    120    125

Val Asn Thr Ser Leu Val Glu Lys Cys Gly Cys Ser
130    135    140

```

<210> 3  
 <211> 810  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>

WO 02/44379

PCT/US01/44866

```

<221> CDS
<222> (61)..(648)

<400> 3
actagtgatt ctcagtagag acgtttgact gtcccaaccc gatgctgcoo tcccacataa 60
atg aga ttt ttt tct gcc agy caa cat ggt ttt acc ctc ata ttc aaa 108
Met Arg Phe Phe Ser Ala Arg Gln His Gly Phe Thr Leu Ile Phe Lys
1 5 10 15
aag aca aag att cca gcc act gat gtc gct gat gcc agc ctg aat gaa 156
Lys Thr Lys Ile Pro Ala Thr Asp Val Ala Asp Ala Ser Leu Asn Glu
20 25 30
tgt tcc agt acc gaa agy aaa caa gac gta gtg ttg ctg ttc gtg acc 204
Cys Ser Ser Thr Glu Arg Lys Gln Asp Val Val Leu Leu Phe Val Thr
35 40 45
ttg tcc cac aca cag coa cct ctg ttt cac ctg cct tat gtc cag aaa 252
Leu Ser His Thr Gln Pro Pro Leu Phe His Leu Pro Tyr Val Gln Lys
50 55 60
ccc tta atc tct aat gtg gag cag ctg atc ctg ggg atc cag ggc cag 300
Pro Leu Ile Ser Asn Val Glu Gln Leu Ile Leu Gly Ile Pro Gly Gln
65 70 75
aat cgc cgg gag ata gcc cat ggc cag gat atc ttt cca gca gag aag 348
Asn Arg Arg Glu Ile Gly His Gly Gln Asp Ile Phe Pro Ala Glu Lys
85 90
ctc tgc cat ctg cag gat cgc aag gtg aac ctt cac aga get gcc tgg 396
Leu Cys His Leu Gln Asp Arg Lys Val Asn Leu His Arg Ala Ala Trp
100 105 110
ggc gag tgt att gtt gca ccc aag act ctc agc ttc tct tac tgt cag 444
Gly Glu Cys Ile Val Ala Pro Lys Thr Leu Ser Phe Ser Tyr Cys Gln
115 120 125
ggg acc tgc cgg gcc ctc aac agt gag ctc cgt cat tcc agc ttt gag 492
Gly Thr Cys Pro Ala Leu Asn Ser Glu Leu Arg His Ser Ser Phe Glu
130 135 140
tgc tat aag agg gca gta cct acc tgt ccc tgg ctc ttc cag acc tgc 540
Cys Tyr Lys Arg Ala Val Pro Thr Cys Pro Trp Leu Phe Gln Thr Cys
145 150 155
cgt ccc acc atg gtc aga ctc ttc tcc ctg atg gtc cag gat gac gaa 588
Arg Pro Thr Met Val Arg Leu Phe Ser Leu Met Val Gln Asp Asp Glu
165 170 175
cac aag atg agt gtg cac tat gtg aac act tcc ttg gtg gag aag tgt 636
His Lys Met Ser Val His Tyr Val Asn Thr Ser Leu Val Glu Lys Cys
180 185 190
ggc tgc tct tga gataccccaa agcctectac tggcctcagy gccactaag 688
Gly Cys Ser
195

```

WO 02/44379

PCT/US01/44866

tctcaggact ttagtagggg gtgggattac ttttcatagc aagtagagct ctttgaaggg 748  
 aggtgggatt tggtttgggt ctcaaagcac agcaagaagg ttggcattat ggcagtaaaa 808  
 tc 810

<210> 4  
 <211> 195  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 Met Arg Phe Phe Ser Ala Arg Gln His Gly Phe Thr Leu Ile Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Thr Lys Ile Pro Ala Thr Asp Val Ala Asp Ala Ser Leu Asn Glu  
 20 25 30  
 Cys Ser Ser Thr Glu Arg Lys Gln Asp Val Val Leu Leu Phe Val Thr  
 35 40 45  
 Leu Ser His Thr Gln Pro Pro Leu Phe His Leu Pro Tyr Val Gln Lys  
 50 55 60  
 Pro Leu Ile Ser Asn Val Glu Gln Leu Ile Leu Gly Ile Pro Gly Gln  
 65 70 75  
 Asn Arg Arg Glu Ile Gly His Gly Gln Asp Ile Phe Pro Ala Glu Lys  
 85 90 95  
 Leu Cys His Leu Gln Asp Arg Lys Val Asn Leu His Arg Ala Ala Trp  
 100 105 110  
 Gly Glu Cys Ile Val Ala Pro Lys Thr Leu Ser Phe Ser Tyr Cys Gln  
 115 120 125  
 Gly Thr Cys Pro Ala Leu Asn Ser Glu Leu Arg His Ser Ser Phe Glu  
 130 135 140  
 Cys Tyr Lys Arg Ala Val Pro Thr Cys Pro Trp Leu Phe Gln Thr Cys  
 145 150 155 160  
 Arg Pro Thr Met Val Arg Leu Phe Ser Leu Met Val Gln Asp Asp Glu  
 165 170 175  
 His Lys Met Ser Val His Tyr Val Asn Thr Ser Leu Val Glu Lys Cys  
 180 185 190  
 Gly Cys Ser  
 195

<210> 5  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

WO 02/44379

PCT/US01/44866

```

<400> 5
Gln Glu Pro His Val Trp Gly Gln Thr Thr Pro Lys Pro Gly Lys Met
 1          5          10          15
Phe Val Leu Arg Ser Val Pro Trp Pro Gln Gly Ala Val His Phe Asn
 20          25          30
Leu Leu Asp Val Ala Lys Asp Trp Asn Asp Asn Pro Arg Lys Asn Phe
 35          40          45
Gly Leu Phe Leu Glu Ile Leu Val Lys Glu Asp Arg Asp Ser Gly Val
 50          55          60
Asn Phe Gln Pro Glu Asp Thr Cys Ala Arg Leu Arg Cys Ser Leu His
 65          70          75          80
Ala Ser Leu Leu Val Val Thr Leu Asn Pro Asp Gln Cys His Pro Ser
 85          90          95
Arg Lys Arg Arg Ala Ala Ile Pro Val Pro Lys Leu Ser Cys Lys Asn
100         105         110
Leu Cys His Arg His Gln Leu Phe Ile Asn Phe Arg Asp Leu Gly Trp
115         120         125
His Lys Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Phe Met Ala Asn Tyr Cys His
130         135         140
Gly Glu Cys Pro Phe Ser Leu Thr Ile Ser Leu Asn Ser Ser Asn Tyr
145         150         155         160
Ala Phe Met Gln Ala Leu Met His Ala Val Asp Pro Glu Ile Pro Gln
165         170         175
Ala Val Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser Pro Ile Ser Met Leu Tyr Gln
180         185         190
Asp Asn Asn Asp Asn Val Ile Leu Arg His Tyr Glu Asp Met Val Val
195         200         205
Asp Glu Cys Gly Cys Gly
210

```

```

<210> 6
<211> 2940
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> exon
<222> (380)..(403)
<223> coding portion of exon 1

```

```

<220>
<221> exon
<222> (1420)..(1671)
<223> exon 2

```

WO 02/44379

PCT/US01/44866

<220>  
<221> exon  
<222> (2024)..(2170)  
<223> coding portion of exon 3

<400> 6  
tgagaaacac aatctgtatt atcaacttctt gcacctccat tctgtaaaca ggagttggta 60  
ttgaagttgt tctgggagtg agagtttctc tcaacttgaat ttaatttctc ttgaatgcgt 120  
gatcagctac aagctgtggg gggttagaat agggcctaca gctgggcacg tggatattta 180  
aagacagcga aggggaagcc cgccttctga gagcaggtat gttggagggt ggctgtggga 240  
gaagtgccag ctctcgctc attcctgggc tcttggctct gggctttgg tgcattgttt 300  
tgagctcagt agagacgttt gactgtocca accogagctt gccttccac ataatgaga 360  
ttttttctg ccaggcaac atg gtt tta ccc tca tat tca aaa gtaagttagct 413  
ggagcgtgg tctttgccg ggaaggagtg atccagaagc tgcctggcag cattttgtgg 473  
ggctgtgcoag ggaatgggtt gtaaatgaca acagatata agggctcttg tgagttagagc 533  
aaggagttgg gtacagaata ttctcagct ggtctagcag aatggaac tgcttctgg 593  
tttcaagctct gcaggcttgg tatgtaggat gtctttaagc tttatggctg atgocctaaa 653  
gttctgtgtg taaggatgct ctaaagtgtg aagtacacag ctgctgggtt gggcaactat 713  
agtgttttgg gagataaaca gggcaagtgg ctgttcttag gtcattgtga ctggaatgat 773  
tttcaagtaact agggcaatca ttctgactta attccagggg tagggtagtg ggagttgagg 833  
aacctcagtc catcctggc tgcgtgggc taagcactga ctttgacaag ctgagactgc 893  
taagtctttg tctgttctg ccaggtggg tagtggggag taagaagctg aaaggagggt 953  
gggactttcc acgatagtagg cctcctggag ctccactct tctttcccta caggctcata 1013  
gttctacac agctactggc ttctctgttt tgaggcagtt tcttcttgg gggtttctt 1073  
gataaagta tgggcttggg tgcctattgt ccccatgcc actgagcttg ttctagagtt 1133  
cgaggacctc agaaggggcc tccaaagatt cctctggga tctttccca ttatctttc 1193  
atcctaccag tcagagggag ggtcattatt ggatatctac tgtttactca cgtattggat 1253  
ggaggtggtg cccacctctt tggcagagac aaagattcca gccactgatg tgcctgatgc 1313  
cagcctgaat gaatgttcca gtaccgaaag gaacacaagc gtatgtttgc tgttctgtac 1373  
cttgcctcac acacagccac ctctgtttca cctgccttat gtccag aaa ccc tta 1428  
atc tct aat gtg gag cag ctg atc ctg ggg atc ccg ggc cag aat cgc 1476  
cgg gag ata ggc cat ggc cag gat atc ttt cca gca gag aag ctg tgc 1524

WO 02/44379

PCT/US01/44866

cat ctg cag gat cgc aag gtg aac ctt cac aga gct gcc tgg ggc gag 1572  
 tgt att gtt gca ccc aag act ctc agc ttc tct tac tgt cag ggg acc 1620  
 tgc ceg gcc ctc aac agt gag ctc cgt cat tcc agc ttt gag tgc tat 1668  
 aag gtaagacatg gagcctcgtt ctttctcttc tggggcaca ttgggatagc 1721  
 actaagtgtc caactctcta ggocctggctc cttttgagtc aaggaagcca ttgaagttgg 1781  
 taattatgta atctagoact gatgcagtgt gtagcatctt ccccgccctg tgacottatc 1841  
 cttatcttt atcacaaga aacatcagct toctaagat tgtttgaaa cagccctgat 1901  
 ccagcagctt ctcccaggc cctcctctc ccttccatg tatecctgac aagtctaact 1961  
 atgcccttag atatgagct gtggctatga ggcactcacc attctgcat ttgtttctgc 2021  
 ag agg gca gta cct acc tgt ccc tgg ctc ttc cag acc tgc cgt ccc 2068  
 acc atg gtc aga ctc ttc tcc ctg atg gtc cag gat gac gaa cac aag 2116  
 atg agt gtg cac tat gtg aac act tcc ttg gtg gag aag tgt ggc tgc 2164  
 tot tga gatacccaa agcctctac tggcctcagg gccacctaag tctcaggact 2220  
 ttagtagggg gtgggattac tttctatgc aagtagact ctttgaagg aggtgggatt 2280  
 tggttgttt ctcaagcac agcaagaagg ttggcattat ggcagtaacc cctcatagat 2340  
 gcttctctt gatgiggcag gggccccta gtctgttct cagtactcc tactactggg 2400  
 aagctgggac cattgagatg tctgactatc gctgtctag attgtgagtg ggctggcctt 2460  
 agtgccacct ctggatcat ttagggtggg aaagaggaac tggcaattgga cgcattgacg 2520  
 ctottggggt aggggtaaaa ttggtaccag tgttaagctg gctttggact cttctgagc 2580  
 cattcagctg ctatcctctc tctctgtacc attggcctgg ggotgttcca gaactgacct 2640  
 cagcaytac atcctcctc acctaacact cctggcctct ttagagggag tgaagactct 2700  
 gtggaagaaa gcattctgtc atgggctagt catgggtaaa gggcccacaag gccttcacaa 2760  
 cctgggtgca gatgggagcc tgagagtaga ggatgttct tgactgacag agggggcctc 2820  
 tggcctcag gaaagtttg ctactatca ttttaaggaac ttgatattag cttttcact 2880  
 atctitaata aaactatagg accattgttg tgggtctctt atgttgata tctattactt 2940

<210> 7  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

WO 02/44379

PCT/US01/44866

Met Val Leu Pro Ser Tyr Ser Lys  
 1 5

<210> 8  
 <211> 84  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8  
 Lys Pro Leu Ile Ser Asn Val Glu Gln Leu Ile Leu Gly Ile Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Asn Arg Arg Glu Ile Gly His Gly Gln Asp Ile Phe Pro Ala Glu  
 20 25 30  
 Lys Leu Cys His Leu Gln Asp Arg Lys Val Asn Leu His Arg Ala Ala  
 35 40 45  
 Trp Gly Glu Cys Ile Val Ala Pro Lys Thr Leu Ser Phe Ser Tyr Cys  
 50 55 60  
 Gln Gly Thr Cys Pro Ala Leu Asn Ser Glu Leu Arg His Ser Ser Phe  
 65 70 75 80  
 Glu Cys Tyr Lys

<210> 9  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9  
 Arg Ala Val Pro Thr Cys Pro Trp Leu Phe Gln Thr Cys Arg Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Met Val Arg Leu Phe Ser Leu Met Val Gln Asp Asp Glu His Lys Met  
 20 25 30  
 Ser Val His Tyr Val Asn Thr Ser Leu Val Glu Lys Cys Gly Cys Ser  
 35 40 45

<210> 10  
 <211> 2940  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> exon  
 <222> (355)..(402)  
 <223> coding portion of exon 1

<220>  
 <221> exon  
 <222> (1282)..(1671)  
 <223> exon 2

WO 02/44379

PCT/US01/44866

```

<220>
<221> exon
<222> (2024)..(2170)
<223> coding portion of exon 3

<400> 10
tgagaaacac aatcigtatt atcacttctt gcacctccat tctgtaaaca ggagttggta 60
ttgaagttgt tctgggagtg agagtttctc tcacttgaat ttaatttctc ttgaatgcgt 120
gatcagctac aagctgtggg gggttagaat agggcotaca gctgggcacg tggatattta 180
aagacagcga aggggaagcc cggcttctga gagcaggtat gttggagggt ggctgtggga 240
gaagtggcag ctctcgctc attcctgggc tcttggctct ggtctttgg tgcattgtgt 300
tgagctcagt agagacgttt gactgtccca acccgatgct gccttcccac ataa atg 357
aga itt ttt tct gcc agg caa cat ggt ttt acc ctg ata ttc aaa 402
agtaagttagc tggagcgctg gtctttgcca ggggaaggag gatccagaag ctgcctggca 462
gcattttgtg gggctggta gggaaatggg tghtaatgac aacagatatt aaggctctt 522
gtgagtagag caaggagttg ggtacagaat attcttcagc tggcttagca gaaatggaa 582
ctgcttctg gtttcagctc tgcaggettg gtatgtagga tgtctttaag ctttatggt 642
gatgcccata agttctgtgt gtaaggatgc tctaaagtgt gaagtacaca gctgctgggc 702
tgggcaacta tagtgttttg ggagataaac agggcaatg gcttctcta ggtcatgggt 762
actggaatga ttttcagtac tagggcaatc attctgactt aattccaggg gtaggggtat 822
gggagttgag gaacctcagt ccactccctg ctgtgttggc ctaagcactg actttgaca 882
gctgagactg ctaagtcttt gtctgtctct gcccgctgg gtatgggga gtaagaagct 942
gaaagggagg tgggaacttc cagcatagtg gctcctgga gcttccactc ttctttccct 1002
acaggctcat agttcctaca cagctactgg ctctctgtt ttgaggcagt ttcttctgt 1062
gggtttctct tgataaagt atgggcttgg gtgccaltg tccccatgc cactgagctt 1122
gtcttagagt tcgaggacca tagaaggggc ctocaaagat tcttctggg atctttcccc 1182
attatctttt catctacca gtcagaggga gggtaattat tggatatcta ctgtttactc 1242
acgtattgga tggaggtggc gccacccctc ttggcagag aca aag att cca gcc 1296
act gat gtc gct gat gcc agc ctg aat gaa tgt tcc agt acc gaa agg 1344
aaa caa gac gta gtg ttg ctg ttc gtg acc ttg tcc cac aca cag cca 1392
cct ctg ttt cac ctg cct tat gtc cag aaa ccc tta atc tot aat gtg 1440
gag cag ctg atc ctg ggg atc ccg ggc cag aat cgc cgg gag ata ggc 1488

```

WO 02/44379

PCT/US01/44866

```

cat gcc cag gat atc ttt cca gca gag aag ctc tgc cat ctg cag gat 1536
cgc aag gtg aac ctt cac aga gct gcc tgg ggc gag tgt att gtt gca 1584
ccc aag act ctc agc ttc tet tac tgt cag ggg acc tgc ccg gcc ctc 1632
aac agt gag ctc cgt cat tcc agc ttt gag tgc tat aag gtaagacatg 1681
gagcctcgtt ctttctcttc tggggtcata ttgggatagc actaagtgtt caactctcta 1741
ggcctggote cttttgagtc aaggaagcca ttgaagtgg taattatgta atctagcact 1801
gatgcagtgt gtagcatctt ccccgccctg tgaacctatc cttatcttt attcataaga 1861
aacatcagct tcctaaagat tgttctgaaa cagccctgat ccagcagctt ctcccaggc 1921
cctcctcttc ccttcccatg tatccctgac aagtctactg atgcccttag atatgaggtc 1981
gtggctatga ggcactcacc attctgccat ttgtttctgc ag agg gca gta cct 2035
acc tgt ccc tgg ctc ttc cag acc tgc cgt ccc acc atg gtc aga ctc 2083
ttc tcc ctg atg gtc cag gat gac gaa cac aag atg agt gtg cac tat 2131
gtg aac act tcc ttg gtg gag aag tgt gcc tgc tot tga gatacccca 2180
agcctctac tggcctcagg gccacctaaq tctcaggact ttagtagggg gtgggattac 2240
ttttcatagc aagtagagct ctttgaaggg aggtgggatt tggtttgttt ctcaaagcac 2300
agcaagaagg ttggcattat ggcagtaacc cctcatagat gottctcttt gatgtgcoag 2360
gggccccta gtgctgttct cagtcactcc tactactggg aagctgggcc cattgagatg 2420
tctgactatc gctgctctag attgtgagtg ggctgggctt agtgccaact ctgggataat 2480
ttaggtgggg aaagaggaac tggcaattga cgcagtgcag ctcttggggg aggggtaaaa 2540
ttgttaccag tgttaagctg gotttgact ctttctgagc cattagctg ctatcatcct 2600
tctctgtacc attggcctgg ggctgggtcca gaactgacct cagcatgtac attcctctc 2660
acctaacact cctggcctct tttagagggag tgaagactct gtggaagaaa gcattctgtc 2720
atgggctagt catgggtaaa gggcccacag gccttcacaa cctgggtgca gatgggagcc 2780
tgagagtaga ggatgttctc tgaactgacag agggggcctc tggcctcatg gaaagtittg 2840
ctcaatca tttaaagaac ttgatattag ctttttcaact atctttaata aaactatagg 2900
accaitgtt tgggtctctt atgttgata tctattactt 2940

```

```

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

WO 02/44379

PCT/US01/44866

<400> 11  
 Met Arg Phe Phe Ser Ala Arg Gln His Gly Phe Thr Leu Ile Phe Lys  
 1 5 10 15

<210> 12  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12  
 Lys Thr Lys Ile Pro Ala Thr Asp Val Ala Asp Ala Ser Leu Asn Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Ser Ser Thr Glu Arg Lys Gln Asp Val Val Leu Leu Phe Val Thr  
 20 25 30  
 Leu Ser His Thr Gln Pro Pro Leu Phe His Leu Pro Tyr Val Gln Lys  
 35 40 45  
 Pro Leu Ile Ser Asn Val Glu Gln Leu Ile Leu Gly Ile Pro Gly Gln  
 50 55 60  
 Asn Arg Arg Glu Ile Gly His Gly Gln Asp Ile Phe Pro Ala Glu Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Cys His Leu Gln Asp Arg Lys Val Asn Leu His Arg Ala Ala Trp  
 85 90 95  
 Gly Glu Cys Ile Val Ala Pro Lys Thr Leu Ser Phe Ser Tyr Cys Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Cys Pro Ala Leu Asn Ser Glu Leu Arg His Ser Ser Phe Glu  
 115 120 125  
 Cys Tyr Lys  
 130

<210> 13  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 13  
 Arg Ala Val Pro Thr Cys Pro Trp Leu Phe Gln Thr Cys Arg Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Met Val Arg Leu Phe Ser Leu Met Val Gln Asp Asp Glu His Lys Met  
 20 25 30  
 Ser Val His Tyr Val Asn Thr Ser Leu Val Glu Lys Cys Gly Cys Ser  
 35 40 45

<210> 14  
 <211> 11

WO 02/44379

PCT/US01/44866

<212> PRT  
 <213> Human immunodeficiency virus type 1  
 <400> 14  
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10

<210> 15  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: internalizing  
 domain derived from HIV tat protein  
 <400> 15  
 Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10 15

<210> 16  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer  
 2445-27  
 <400> 16  
 ctcatattca aaatcagagg gaggg 25

<210> 17  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer  
 2445-28  
 <400> 17  
 gtttactcac gtattggatg gaggtg 26

<210> 18  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer  
 2445-29  
 <400> 18

WO 02/44379	PCT/US01/44866
ctctaattgtg gagcagctga tc	22
<210> 19	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer 2450-21	
<400> 19	
cagcagagaa gctctgccaat ctgc	24
<210> 20	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer 2445-30	
<400> 20	
gagcagccac acgggttoto caccaag	27
<210> 21	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer 2445-31	
<400> 21	
gaagtgttca catagtgcac actc	24
<210> 22	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer 2445-32	
<400> 22	
ctcatettgt gttcgtcactc ctg	23
<210> 23	
<211> 24	
<212> DNA	

WO 02/44379

PCT/US01/44866

<213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer  
 2445-22

<400> 23  
 gaccatcagg gagaagagtc tgac 24

<210> 24  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: RACE primer  
 1916-83

<400> 24  
 ggctcgtatg ttgtgtgga ttgtgagcg 29

<210> 25  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: RACE primer  
 1916-80

<400> 25  
 tgcaaggcga ttaagttggg taacgccag 29

<210> 26  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: RACE primer  
 1916-82

<400> 26  
 catgattacg ccaagctcta atacgactc 29

<210> 27  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: RACE primer  
 1916-81

WO 02/44379

PCT/US01/44866

<400> 27  
tcacgacggtt gtaaacgac ggccagtg

28

## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
6 June 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/044379 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/495
- (21) International Application Number: PCT/US01/44866
- (22) International Filing Date: 28 November 2001 (28.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/253,476 28 November 2000 (28.11.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): AMGEN, INC. [US/US], One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320 (US).
- (72) Inventor; and  
(75) Inventor/Applicant (for US only): JING, Shuqian [US/US]; 3254 Borlino Lane, Thousand Oaks, CA 91362 (US).
- (74) Agent: ZUHN, Donald, L.; McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, 300 South Wacker Drive, Suite 3200, Chicago, IL 60606 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HN, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SL, SK, SI, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PE, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 13 March 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/044379 A3

(54) Title: TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA-RELATED MOLECULES AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention provides Transforming Growth Factor-Beta-Related (TGF- $\beta$ -R) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also provides selective binding agents, vectors, host cells, and methods for producing TGF- $\beta$ -R polypeptides. The invention further provides pharmaceutical compositions and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or prevention of diseases, disorders, and conditions associated with TGF- $\beta$ -R polypeptides.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 01/44866
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/12 C07K14/495		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
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)		
SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, EMBL		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 15798 A (ZYMOGENETICS INC) 23 March 2000 (2000-03-23) abstract; examples 1-10 ---	1-17, 38-57
X	EP 0 323 842 A (OTSUKA PHARMA CO LTD) 12 July 1989 (1989-07-12) the whole document ---	1-17, 38-57
X	WO 00 62062 A (JIN SEUNG WON; SHIN HOON (KR); LIM CHANG GI (KR); HANMI PHARM CO L) 19 October 2000 (2000-10-19) abstract; examples 3-8 ---	51, 52, 55
X	EP 0 945 464 A (CAMBRIDGE ANTIBODY TECH) 29 September 1999 (1999-09-29) abstract --- -/--	51, 52, 55
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 obvious 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
27 November 2002	11/12/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Sirim, P	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Initial Application No PCT/US 01/44866
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 28 March 2000 (2000-03-28) TROMANS A.: Database accession no. AL162502 XP002221576 abstract	1-4
X	DATABASE EMBL 'Online! 4 August 1999 (1999-08-04) Database accession no. AC008940 XP002221577 abstract	1-4
P, X	WO 01 72961 A (MURDOCH PAUL R; SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB); SMITHKLINE BEECHAM CO) 4 October 2001 (2001-10-04) page 25 page 34 page 37	1-17, 38-57
P, X	WO 01 81363 A (MURDOCK PAUL R; SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB); SMITHKLINE BEECHAM CO) 1 November 2001 (2001-11-01) SEQ ID NO. 39 page 13-17 page 24 page 39	1-17, 38-57
E	WO 01 92305 A (ZYMOGENETICS INC) 6 December 2001 (2001-12-06) SEQ ID NO. 1 page 38 -page 47	1-17, 38-57
E	WO 02 20569 A (SCHERING CORP) 14 March 2002 (2002-03-14) page 10; claims 1-20	1-17, 38-57

Form PCT/BA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

International Application No. PCT/US 01/4866

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 18 to 37 (completely)

Present claims 18 to 37 relate to agents and to methods involving said agents defined by reference to a desirable characteristic or property, namely their property to bind specifically the polypeptide of present application, represented by SEQ ID NOs: 2 and 4, and/or to modulate the activity of said polypeptide.

Although, on pages 47 to 51 of the description antibodies, fragments and derivatives thereof are suggested as such selectively binding agents, the present application does not provide support within the meaning of Art. 6 PCT and disclosure within the meaning of Art. 5 PCT for any agent which binds selectively and specifically to the polypeptide of present application and not to other TGF-beta related proteins.

Therefore, the present claims lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Art. 6 PCT), since an attempt is made to define the agent by reference to a result to be achieved without indicating technical features characterizing said agent.

Consequently, no search has been carried out for said claims.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/44866
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 33 and 48 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	18 to 37 (completely) 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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
<b>Remark on Protest</b>		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

- information on patent family members

Int'l Application No  
PCT/US 01/44866

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0015798	A	23-03-2000	AU 6050499 A	03-04-2000
			CA 2343569 A1	23-03-2000
			EP 1114156 A2	11-07-2001
			JP 2002525056 T	13-08-2002
			WO 0015798 A2	23-03-2000
EP 0323842	A	12-07-1989	EP 0323842 A2	12-07-1989
			JP 1230522 A	14-09-1989
			US 5047510 A	10-09-1991
WO 0062062	A	19-10-2000	AU 4147100 A	14-11-2000
			BR 0009607 A	08-01-2002
			CN 1355882 T	26-06-2002
			EP 1166112 A1	02-01-2002
			WO 0062062 A1	19-10-2000
			TR 200102917 T2	21-03-2002
EP 0945464	A	29-09-1999	EP 0945464 A1	29-09-1999
			GR 3035775 T3	31-07-2001
			AT 190650 T	15-04-2000
			AT 199091 T	15-02-2001
			AU 702049 B2	11-02-1999
			AU 7140596 A	30-04-1997
			CA 2233042 A1	17-04-1997
			DE 69607191 D1	20-04-2000
			DE 69607191 T2	28-09-2000
			DE 69611766 D1	15-03-2001
			DE 69611766 T2	02-08-2001
			DK 945464 T3	07-05-2001
			EP 0853661 A1	22-07-1998
			ES 2146020 T3	16-07-2000
			ES 2156035 T3	01-06-2001
			WO 9713844 A1	17-04-1997
			GB 2305921 A ,B	23-04-1997
			GR 3033436 T3	29-09-2000
			JP 2000500643 T	25-01-2000
			PT 853661 T	31-08-2000
PT 945464 T	31-07-2001			
WO 0172961	A	04-10-2001	AU 5696401 A	08-10-2001
			WO 0172961 A2	04-10-2001
WO 0181363	A	01-11-2001	AU 5726501 A	07-11-2001
			WO 0181363 A1	01-11-2001
WO 0192305	A	06-12-2001	AU 6515701 A	11-12-2001
			AU 7504901 A	11-12-2001
			WO 0192305 A2	06-12-2001
			WO 0193170 A1	06-12-2001
			US 2002016762 A1	07-02-2002
WO 0220569	A	14-03-2002	AU 9454101 A	22-03-2002
			WO 0220569 A2	14-03-2002
			US 2002142292 A1	03-10-2002

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 15/08	A 6 1 P 15/08	4 C 0 8 4
A 6 1 P 15/18	A 6 1 P 15/18	4 C 0 8 5
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/02	4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 14/495	C 0 7 K 14/495	
C 0 7 K 16/24	C 0 7 K 16/24	
C 0 7 K 16/42	C 0 7 K 16/42	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	H
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/48	N
G 0 1 N 33/48	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 5/00	A
// A 6 1 K 35/76	C 1 2 N 5/00	B
A 6 1 K 48/00	C 1 2 N 15/00	F
	A 6 1 K 37/02	
	A 6 1 K 35/76	
	A 6 1 K 48/00	

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

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB01 BB10 BB14 BB41 BB50 CB01 DA13 DA36  
FB02 FB06  
4B024 AA01 AA11 BA03 BA43 BA58 BA61 CA01 CA04 CA09 CA11  
DA01 DA02 DA05 DA06 DA11 EA02 EA04 GA03 GA11 GA13  
HA08 HA12  
4B063 QA18 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR42 QR48 QR50  
QR55 QR56 QR62 QR77 QR82 QS03 QS25 QS28 QS34 QS36  
QS39 QX02 QX10  
4B064 AG13 AG26 AG27 CA02 CA05 CA10 CA11 CA19 CA20 CC24  
DA01 DA13  
4B065 AA01X AA26X AA57X AA87X AA93Y AB01 AB02 BA02 BA05 BA08  
CA24 CA25 CA44 CA46  
4C084 AA01 DB52 NA14 ZA68 ZA81 ZA86 ZA89 ZB08 ZB21 ZB26

4C085	AA13	AA14	AA16							
4C087	BC83	CA12	MA66	NA14	ZA68	ZA75	ZA81	ZA86	ZA89	ZB08
	ZB11	ZB21	ZB26							
4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA09	BA41	BA62	CA40	DA30	DA75
	DA76	EA20	EA50	FA74						

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004514448A5</a>	公开(公告)日	2005-04-07
申请号	JP2002546727	申请日	2001-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	ジンシュキアン		
发明人	ジン, シュキアン		
IPC分类号	A01K67/027 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P1/04 A61P15/08 A61P15/18 A61P17/02 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/495 C07K16/24 C07K16/42 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/04 A61P15/08 A61P15/18 A61P17/02 C07K14/495 C07K2319/00 C07K2319/30 C12N2799/021		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P1/04 A61P15/08 A61P15/18 A61P17/02 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00.105 C07K14/495 C07K16/24 C07K16/42 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.H C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/48.N G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N5/00.A C12N5/00.B C12N15/00.F A61K37/02 A61K35/76 A61K48/00		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB01 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB41 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB06 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA03 4B024/BA43 4B024/BA58 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/GA13 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 4B063/QX10 4B064/AG13 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/DB52 4C084/NA14 4C084/ZA68 4C084/ZA81 4C084/ZA86 4C084/ZA89 4C084/ZB08 4C084/ZB21 4C084/ZB26 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZA68 4C087/ZA75 4C087/ZA81 4C087/ZA86 4C087/ZA89 4C087/ZB08 4C087/ZB11 4C087/ZB21 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/BA62 4H045/CA40 4H045/DA30 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/253476 2000-11-28 US		
其他公开文献	JP2004514448A		

#### 摘要(译)

本发明提供了与转化生长因子-β相关的 ( TGF-β-R ) 多肽和编码该多肽的核酸分子。 本发明还提供选择性结合剂, 载体, 宿主细胞和产生TGF-β-R多肽的方法。 本发明进一步提供了用于诊断, 治疗, 改善和/或预防与TGF-β-R多肽有关的疾病, 病症和病状的药物组合物和方法。

