

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A )

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 504343

(P2003 - 504343A)

(43)公表日 平成15年2月4日(2003.2.4)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
A 6 1 K 38/00 39/395		A 6 1 K 39/395	D 2 G 0 4 5 E 4 B 0 2 4 N 4 B 0 6 3 T 4 C 0 8 4 45/00 4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全153数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 509196(P2001 - 509196)

(86) (22)出願日 平成12年7月11日(2000.7.11)

(85)翻訳文提出日 平成14年1月15日(2002.1.15)

(86)国際出願番号 PCT/US00/18867

(87)国際公開番号 W001/003720

(87)国際公開日 平成13年1月18日(2001.1.18)

(31)優先権主張番号 60/143,304

(32)優先日 平成11年7月12日(1999.7.12)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ジェネンテック・インコーポレーテッド  
GENENTECH, INC.  
アメリカ合衆国カリフォルニア・94080 - 4  
990・サウス・サン・フランシスコ・ディー  
エヌエー・ウェイ・1

(72)発明者 ウィリアムズ, ピー., ミッキー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94019,  
ハーフ ムーン ベイ, アルト アヴェニュー  
- 509

(72)発明者 ゲリッツェン, マリー, イー.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94402,  
サン マテオ, パロット ドライブ 541

(74)代理人 弁理士 園田 吉隆 (外1名)  
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 腫瘍壊死因子リガンド/レセプター相同体による血管形成及び心血管形成の促進と抑制

(57)【要約】

ヒトを含む哺乳動物の血管系性及び/又は心血管形成を促進又は抑制するための組成物及び方法を開示する。製薬的組成物は、1又は複数のこれらの使用において同定したもののポリペプチド又はアンタゴニストに基づく。ここで診断、予防又は治療することのできる疾患は、創傷のような外傷、様々な癌、及びアテローム性動脈硬化及び心臓肥大を含む血管の障害を含む。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 PRO364ポリペプチドを製薬的に許容される担体と混合されて含有する組成物。

【請求項2】 PRO175ポリペプチドを製薬的に許容される担体と混合されて含有する組成物。

【請求項3】 該ポリペプチドの治療的有効量を含有する請求項1に記載の組成物。

【請求項4】 該ポリペプチドの治療的有効量を含有する請求項2に記載の組成物。

【請求項5】 PRO364又はPRO175ポリペプチドを、製薬的に許容される担体と心臓血管、内皮、血管形成剤又は血管新生抑制剤と混合されて含有する組成物。

【請求項6】 該ポリペプチド及び該薬剤が治療的有効量で存在する請求項5に記載の組成物。

【請求項7】 治療的有効量のPRO364又はPRO175ポリペプチドを、製薬的に許容される担体と混合することを含む心臓血管、内皮、及び血管形成疾患治療のための組成物の製造方法。

【請求項8】 (a)PRO364又はPRO175ポリペプチドの治療的有効量を製薬的に許容される担体と混合されて含有する組成物と；

(b)前記組成物を収容する容器と；

(c)心臓血管、内皮、及び血管形成疾患の治療における前記PRO364又はPRO175ポリペプチドの使用を表示する、前記容器に貼付されたラベル、又は当該医薬品に収納された包装挿入物と、を含む医薬品。

【請求項9】 PRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする核酸配列の突然変異に関連する疾患又は疾患に対する感受性を診断する方法であって；

(a)宿主由来の試料からPRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする核酸配列を単離し；

(b) PRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする核酸配列の突然変異を決定することを含む方法。

【請求項10】 哺乳動物における心臓血管、内皮及び血管形成疾患を診断する方法において、(a)該哺乳動物から得た組織細胞の試験試料、及び(b)同じ細胞型の公知の正常組織細胞のコントロール試料におけるPRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを分析することを含んでなり、試験試料中の発現レベルの高低が、試験組織細胞を得た哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成機能障害の存在を示す方法。

【請求項11】 哺乳動物における心臓血管、内皮及び血管形成疾患を治療する方法において、PRO364又はPRO175ポリペプチドの治療的有効量を当該哺乳動物に投与することを含む方法。

【請求項12】 心臓血管、内皮及び血管形成疾患が心臓肥大、外傷、又は癌である請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記哺乳動物がヒトである請求項12に記載の方法。

【請求項14】 前記心臓肥大がPGF<sub>2</sub>のレベル上昇の存在によって特徴づけられる請求項12に記載の方法。

【請求項15】 前記心臓肥大が心筋梗塞によって誘発されたものである請求項12に記載の方法。

【請求項16】 前記PRO364又はPRO175ポリペプチドの投与が心筋梗塞の後48時間以内に開始される請求項15に記載の方法。

【請求項17】 心臓血管、内皮及び血管形成疾患が心臓肥大であり、前記PRO364又はPRO175ポリペプチドが、心臓血管、内皮、又は血管形成剤とともに投与される請求項12に記載の方法。

【請求項18】 前記心臓血管、内皮、又は血管形成剤が高血圧治療薬、ACE-阻害剤、エンドセリンレセプターアンタゴニスト、及び血栓溶解剤からなる群から選択される請求項17に記載の方法。

【請求項19】 心臓血管、内皮、及び血管形成疾患が癌であり、PRO364又はPRO175ポリペプチドが、化学療法剤、成長阻害剤又は細胞毒性薬と組み合わせて投与される請求項12に記載の方法。

【請求項20】 PRO364又はPRO175ポリペプチドのアゴニストの同定方法であって：

(a)細胞とスクリーニングすべき化合物とを、PRO364又はPRO174ポリペプチドによる細胞増殖の誘発に適した条件下で接触させ；及び

(b)細胞の増殖を測定して、化合物が有効なアゴニストであるか否かを決定することを含む方法。

【請求項21】 請求項20の方法により同定されたPRO364又はPRO175ポリペプチドのアゴニスト。

【請求項22】 PRO364又はPRO175ポリペプチドの発現又は活性を抑制する化合物の同定方法であって、PRO364又はPRO175ポリペプチドと候補化合物を、化合物とポリペプチドを相互作用させるのに十分な時間と条件下で接触させることを含む方法。

【請求項23】 (a)細胞とスクリーニングすべき化合物とを、PRO364又はPRO175ポリペプチドの存在下で、PRO364又はPRO175ポリペプチドによる細胞増殖の誘発に適した条件下で接触させ；及び

(b)細胞の増殖を測定して、化合物が有効なアンタゴニストであるか否かを決定する工程を含む請求項22に記載の方法。

【請求項24】 PRO364又はPRO175ポリペプチドの発現又は活性を抑制する化合物。

【請求項25】 請求項20の方法により同定される化合物。

【請求項26】 哺乳動物における心臓血管、内皮及び血管形成疾患を治療する方法において、PRO364又はPRO175ポリペプチドに対するアンタゴニストの有効量を哺乳動物に投与することを含む方法。

【請求項27】 心臓血管、内皮及び血管形成疾患が心臓肥大、外傷、癌、又は加齢性黄斑変性である請求項26に記載の方法。

【請求項28】 哺乳動物がヒトである請求項26に記載の方法。

【請求項29】 心臓血管、内皮、又は血管形成剤又は血管新生抑制剤の有効量が、該アンタゴニストと組み合わせて投与される請求項26に記載の方法。

【請求項30】 PRO364又はPRO175ポリペプチドの存在を測定

する方法において、PRO364又はPRO175ポリペプチドを含有すると推測される細胞を抗-PRO364又は-PRO175抗体に暴露し、前記抗体の前記細胞への結合を測定することを含む方法。

【請求項31】 哺乳動物における心臓血管、内皮、及び血管形成疾患を診断する方法において、(a)該哺乳動物から得た組織細胞の試験試料を抗-PRO364又は-PRO175抗体と接触させ、そして(b)試験試料中での抗-PRO364又は-PRO175抗体とPRO364又はPRO175ポリペプチドとの複合体形成を検出することを含む方法。

【請求項32】 抗-PRO364又は-PRO175抗体と担体とを適切な包装内に含む癌診断キット。

【請求項33】 PRO364又はPRO175ポリペプチドを検出するための前記抗体の使用説明を更に含む請求項32に記載のキット。

【請求項34】 容器；

容器上のラベル；及び

容器内に収容された抗-PRO364又は-PRO175抗体を含む組成物を含む製造品であって、容器上のラベルに該組成物が心臓血管、内皮及び血管形成疾患を治療するために使用することができることを示す製造品。

【請求項35】 哺乳動物においてPRO364又はPRO175ポリペプチドにより誘発される血管形成を抑制する方法であって、PRO364又はPRO175ポリペプチドに結合する抗体の治療的有効量を哺乳動物に投与することを含む方法。

【請求項36】 哺乳動物がヒトである請求項35に記載の方法。

【請求項37】 哺乳動物が腫瘍又は網膜疾患を有する請求項35に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

(発明の背景)

発明の分野

本発明は、そのような生物学的効果を必要とする哺乳動物において血管形成及び/又は心血管形成を促進又は阻害するのに有用な組成物及び方法に関する。これは、心臓血管疾患並びに発癌性疾患の診断及び治療を含む。

**【0002】**

(背景の記載)

心疾患と因子

約500万人のアメリカ人が心不全を患っており、心不全の新しい患者は毎年約400000人にのぼる。これは、アメリカ合衆国における65歳以上の人々の、最も頻出の入院原因である。急性心筋梗塞を含む急性心臓疾患の治療技術における最近の進歩により、結局は慢性の心不全を発症する患者数が拡大する結果となった。1979年から1995年まで、鬱血性心不全(CHF)により入院した患者は、377,000人から872,000人まで増加し(130パーセントの増加)、CHFによる死亡は116パーセント増加した。

CHFは、左心室の機能不全、運動負荷試験の低下、生活水準の悪化、顕著な寿命の低下により特徴付けられる症候群である。心不全の必須条件は、体組織の代謝必要量を満たすのに十分な速度で血液を押し出すことに心臓が不能であることである(換言すれば、心拍出量の不足である)。

**【0003】**

末梢血管収縮、心拍数の増加、心収縮性の増加、血漿容量の増加を含む、少なくとも4種の主要な補償メカニズムが心不全の場合に活性化される。これらの効果は、交感神経系とレニン-アンギオテンシン系により主に媒介される。Eichhorn, American Journal of Medicine, 104:163-169(1998)を参照されたい。交感神経系からの出力の増加は、血管緊張、心拍数及び収縮性を増加させる。アンギオテンシンIIは、1)血管平滑筋収縮を直接刺激し、2)アルドステロンと抗利尿ホルモン分泌を刺激することにより血漿容量の拡大を促進させ、3)交感神経

媒介血管緊張を刺激し、4)血管拡張とナトリウム利尿活性を有するブラジキニンの変性を触媒することにより、血圧を上昇させる。BrownとVaughan, *Circulation*, 97: 1411-1420(1998)による概説を参照されたい。以下に記載するように、アンギオテンシンⅡは、筋細胞壊死(心収縮機能を害する)及び心臓内線維症(心拡張とある場合には心収縮機能を害する)を促進することにより、心臓への直接的に有害な影響を持つものである。Weber, *Circulation*, 96: 4065-4082(1998)を参照されたい。

#### 【0004】

鬱血性心不全(CHF)の共通した特徴は心肥大、つまり機械的及びホルモン刺激の双方により活性化され、心臓を心拍出量の増加に適合させる心臓の拡大である。MorganとBaker, *Circulation*, 83: 13-25(1991)。この肥大応答は、多くの場合、高血圧、大動脈弁狭窄症、心筋梗塞、心筋症、弁閉鎖不全、及び心臓内短絡等の多様な別の病状を伴い、これらは全て慢性的な血行動態過負荷となる。

#### 【0005】

肥大は、腫瘍形成を含まない、自然の成長と関係のない器官又は構造の大きさの増加として一般的に定義されている。心肥大は、個々の細胞(ミオサイト)の質量の増加、又は組織を形成する細胞数の増加(過形成)のいずれか、又はその両方による。胎児の心臓の拡大度合いは、ミオサイト数(誕生のすぐ後まで続く)の増加に依存し、出生後の心臓のミオサイトはその増殖能を失う。さらなる成長は個々の細胞の肥大を通して生じる。

#### 【0006】

成体ミオサイト肥大は、個々の筋繊維への負荷の減少を可能にすることにより、障害性心機能に対しては短時間の応答として最初は有益である。しかし、過酷で長時間の過負荷を受けると、肥大細胞は劣化し始め、死亡する。Katz, 「Heart Failure」: Katz A.M.編, *Physiology of the Heart*(New York: Raven Press, 1992)pp.638-668。心肥大は、心不全の臨床過程において死亡率と罹患率の両方に対してかなりの危険因子である。Katz, *Trends Cardiovasc. Med.*, 5: 37-44(1995)。心肥大の原因と病状のさらなる詳細については、例えばHeart Disease, *A Textbook of Cardiovascular Medicine*, Braunwald, E.編(W.B. Saunders Co.

, 1988), 14章, 「Pathophysiology of Heart Failure」を参照されたい。

#### 【0007】

細胞レベルでは、心臓はミオサイトと包括的に非ミオサイトと呼ばれる周囲の支持細胞からなる。非ミオサイトは主として線維芽細胞/間葉細胞であるが、それらは内皮及び平滑筋細胞も含む。実際、ミオサイトは成人心筋質量の大部分を形成するが、それらは心臓に存在する全細胞数の約30%を占めるにすぎない。ホルモンの、生理学的、血行力学的及び病理学的刺激に反応して、成体心室筋細胞は肥大化プロセスの活性化を通して仕事量の増加に適合することができる。この反応は、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)に対する遺伝子を含む胎性遺伝子の活性化と細胞分割が付随することのない、個々の心筋細胞の収縮性タンパク質の含有量とミオサイトの細胞サイズの増加により特徴付けられる。Chienら, FASEB J., 5: 3037-3046(1991); Chienら, Annu. Rev. Physiol., 55: 77-95(1993)。心筋内冠動脈の周りとの細胞外マトリクス内の間質性コラーゲンの蓄積に関連したミオサイトサイズの増大の結果としての心筋質量の増大が、ヒトにおける圧負荷の次の左心室肥大において記載されている。Caspariら, Cardiovasc. Res., 11: 554-558(1977); Schwarzら, Am. J. Cardiol., 42: 895-903(1978); Hessら, Circulation, 63: 360-371(1981); Pearlmanら, Lab. Invest., 46: 158-164(1982)。

#### 【0008】

非ミオサイト支持細胞により産生されるパラ分泌因子が、心肥大の発生にまた関与していることも示唆されており、白血球阻害因子(LIF)及びエンドセリン等の様々な非ミオサイト由来肥大因子が同定されている。Metcalf, Growth Factors, 7: 169-173(1992); Kurzrockら, Endocrine Reviews, 12: 208-217(1991); Inoueら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2863-2867(1989); YanagisawaとMasaki, Trends Pharm. Sci., 10: 374-378(1989); 米国特許第5,573,762号(1996年11月12日発行)。心肥大の潜在的な媒介物として同定されているさらなる例示的因子には、カルジオトロフィン(cardiotrophin)-1(CT-1)(Pennicaら, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 92: 1142-1146(1995))、カテコールアミン類、副腎皮質ステロイド類、アンギオテンシン及びプロスタグランジン類が含まれる。

## 【0009】

現在、心肥大の治療法は、その根本にある心臓疾患に応じて異なる。肥大の潜在的な媒介物として同定されている因子としては、カテコールアミン類、副腎皮質ステロイド類、アンギオテンシン、プロスタグランジン類、LIF、エンドセリン(エンドセリン-1、-2及び-3、及び大エンドセリン(big endothelin)を含む)及びCT-1が挙げられる。例えば、 $\beta$ -アドレナリン様レセプターブロッカー( $\beta$ -ブロッカー、例えばプロプラノロール、チモロール、タータロロール(tertalolol)、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール(acetobutolol)、アテノロール、メトプロロール、カルベジロール等)及びベラパミルが、肥大心筋症の治療に広く使用されている。徴候(胸の痛み)及び運動耐性に対する $\beta$ -ブロッカーの有益な効果は、主として、結果として心拡張の延長と受動的心室充満の増加が伴う心拍数の低下による。Thompsonら, Br. Heart J., 44: 488-98(1980); Harrisonら, Circulation, 29: 84-98(1964)。ベラパミルは心室充満を改善し、おそらく心筋虚血を低減させることが記載されている。Bonowら, Circulation, 72: 853-64(1985)。

## 【0010】

ニフェジピンとジルチアゼムもまた、時折、肥大心筋症の治療に使用される。Lorellら, Circulation, 65: 499-507(1982); Betocchiら, Am. J. Cardiol., 78: 451-457(1996)。しかしながら、その強力な血管拡張性のために、ニフェジピンは、特に流出閉塞症の患者にとっては有害になるおそれもある。ジソピラミドが負の筋収縮性による徴候を緩和するのに使用されている。Pollick, N. Engl. J. Med., 307: 997-999(1982)。しかし、多くの患者において、当初の恩恵は時間と共に低減する。Wigleら, Circulation, 92: 1680-1692(1995)。

抗高血圧薬による治療は、血圧の上昇に伴う心肥大において有益な効果があることが報告されている。抗高血圧治療において単独で又は組み合わせて使用される薬物の例としては、カルシウムアンタゴニスト、例えばニトレンジピン; アドレナリン様レセプターブロッカー、例えば上に列挙したもの; アンギオテンシン転換酵素(ACE)阻害剤、例えばキナプリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル及びリシノプリル; 利尿薬、例えばク

ロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメタジド、メチルクロチアジド(methylchlorothiazide)、ベンズチアジド、ジクロロフェナミド、アセタゾラミド、及びインダパミド；及びカルシウムチャンネルブロッカー、例えばジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル及びニカルジピンが挙げられる。

#### 【0011】

例えば、ジルチアゼム及びカプトプリルを用いた高血圧の治療は、左心室筋肉質量の低減を示しているが、心拡張機能のドップラー指数は正常にはならなかった。Szlachcic等, Am. J. Cardiol., 63:198-201(1989)；Shahi等, Lancet, 336:458-461(1990)。これらの知見は、過度の量の間質性コラーゲンが左心室肥大の緩解後に残るであろうことを示していると解釈される。Rossi等, Am. Heart J., 124:700-709(1992)。上掲のRossi等は、実験用ラットにおける、圧負荷心臓肥大における心筋細胞肥大と間質性線維症の防止と退行に対するカプトプリルの効果を研究した。

#### 【0012】

心収縮性を直接増大させる薬剤(変力剤)は、短期間で心拍出量を改善するために当初は心不全の患者にとっては有益であると考えられていた。しかし、ジゴキシゲニンを除く全てのポジティブ変力剤は、心臓性能の短期間の改善にもかかわらず、長期間では死亡率が増加する結果になることが見出されている。Massie, Curr. Op. in Cardiology, 12:209-217(1997)；Reddy等, Curr. Opin. Cardiol., 12:233-241(1997)。近年、 $\beta$ -アドレナリン様レセプターブロッカーの心不全への使用が支持されている。臨床試験の証拠によれば、心機能の改善が死亡率を増加させることなく達成可能であることが示唆されるが、患者生存率の改善は今だ証明されていない。また、CHFの治療におけるインシュリン様成長因子-I及び/又は成長ホルモン、又はカルジオトロピン-1又はそのアンタゴニストの使用に関しては米国特許第5,624,806号；同5,661,122号；同5,610,134号；及び国際公開第95/28173号を参照されたい。他の治療様式は心臓移植であるが、これはドナーの心臓の入手可能性により制限される。

#### 【0013】

エンドセリンは、ブタ動脈のエンドセリン培養上清から単離され、構造的に決

定された、21のアミノ酸を含む血管収縮化ペプチドである。Yanagisawa等, *Nature*, 332, : 411-415(1988)。後になって、エンドセリンは種々の作用を示すことが見出され、エンドセリンアンタゴニストのようなエンドセリン抗体は、心筋梗塞、腎不全、及び他の病気の治療に有効であることが証明されている。エンドセリンは生体内に存在していて、血管収縮作用を示すために、循環系の調節に関与している内因性因子であることが予想され、高血圧、心疾患、例えば心筋梗塞、及び腎臓病、例えば急性腎不全と関連があるであろう。エンドセリンアンタゴニストは、例えば米国特許第5,773,414号；日本国特許公開第3130299/1991号、欧州特許第457,195号；欧州特許第460,679号；及び欧州特許第552,489号に記載されている。エンドセリンレセプターアンタゴニストを同定するための新規なエンドセリンBレセプターは米国特許第5,773,223号に記載されている。

#### 【0014】

心不全の現在の治療は、主として、アンギオテンシン転換酵素(A C E)阻害剤、例えばカプトプリル、及び利尿薬を使用することに向けられている。これらの薬物は血行動態特性と運動耐性を改善し、C H F患者の罹患率及び死亡率を低減させる。Kramer等, *Circulation*, 67(4) : 807-816(1983) ; Captopril Multicenter Research Group, *J.A.C.C.*, 2(4) : 755-763(1983) ; The CONSENSUS Trial Study Group, *N. Engl. J. Med.*, 316(23) : 1429-1435(1987) ; The SOLVD Investigators, *N. Engl. J. Med.*, 325(5) : 293-302(1991)。さらに、それらは、高血圧、左心室機能不全、アテローム性動脈硬化症、糖尿病腎障害の治療に有用である。Brown及びVaughan, 上掲。しかしながら、効能が証明されているにもかかわらず、A C E阻害剤に対する反応性は限られている。例えば、心不全の場合に生存を延ばすが、A C E阻害剤は末期心不全への進行を遅延させるようであり、A C E阻害剤を用いた患者のかなりの数が機能クラスI I Iの心不全を有している。

#### 【0015】

さらに、機能的能力と運動時間の改善性は僅かで、死亡率は低減はするが高いままである。The CONSENSUS Trial Study Group, *N. Engl. J. Med.*, 316(23) : 1429-1453(1987) ; The SOLVD Investigators, *N. Engl. J. Med.*, 325(5) : 293-

302(1991) ; Cohn等, N. Engl. J. Med., 325(5) : 303-310(1991) ; The Captopril-Digoxin Multicenter Research Group, JAMA, 259(4) : 539-544(1988)。このため、ACE阻害剤により、いつも60%以上の心不全患者において徴候を緩和することができず、心不全による死亡率を約15-20%も低減させることはできないようである。さらなる好ましくない効果は上掲のBrown及びVaughanを参照されたい。

#### 【0016】

ACE阻害剤の代替物は特定のAT<sub>1</sub>レセプターアンタゴニストである。臨床研究では、心臓血管及び腎臓の病気の治療における、2つの様式の効能を比較することが計画されている。しかしながら、動物モデルのデータでは、ACE/Ang II経路は、心臓肥大に明らかに関与しているが、唯一のものではなく、あるいはこの役割に活性な主要経路でさえないことを示唆している。マウスの遺伝的「ノックアウト」モデルにおいて、個々の経路の成分が試験されている。このような一つのモデルにおいては、Ang IIに対する主要な心臓レセプター、AT<sub>1</sub>サブ1Aが遺伝学的に欠失されており；これらのマウスは、Ang IIが実験的に付与された場合に肥大を発現しない(Ang IIに二次的な肥大の消滅におけるモデルの基本的な成功を確認する)。しかしながら、これらの動物(高血圧の心臓ストレスのモデル)において大動脈を収縮させた場合、心臓はなおも肥大性になる。このことは、このレセプター(AT<sub>1</sub>サブ1A)に無関係な別のシグナル伝達経路が高血圧において活性化されていることを示唆している。おそらく、ACE阻害剤はこれらの経路を阻害することはできないであろう。Harada等, Circulation, 97 : 1952-1959(1998)を参照されたい。また、心臓肥大のプロセスとメカニズムに関連した謎については、Homcy, Circulation, 97 : 1890-1892(1998)を参照されたい。

#### 【0017】

毎年約750,000人の患者が急性心筋梗塞(AMI)を患っており、アメリカ合衆国における全死亡の約4分の1がAMIによるものである。近年、血栓溶解剤、例えばストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、特に組織プラスミノゲンアクチベータ(t-PA)が、心筋梗塞を患っている患者の生存率をかなり増加させ

た。1.5～4時間、連続して静脈注入として投与した場合、t-P Aは治療した患者の69%～90%において90分で冠動脈を開通させる。Topol等, *Am. J. Cardiol.*, 61, 723-728(1988); Neuhaus等, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 12: 581-587(1988); Neuhaus等, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 14: 1566-1569(1989)。最も高い開存率が高用量又は加速投薬療法で報告されている。Topol, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 15: 922-924(1990)。またt-P Aは一回の大量瞬時投与として投与してもよく、半減期は比較的短い、注入治療により適している。Tebbe等, *Am. J. Cardiol.*, 64: 448-453(1989)。特に長い半減期と非常に高いフィブリン特異性を有するように設計されたt-P A変異体、TNK t-P A(T103N、N117Q、K H R R (296-299) A A A A t-P A変異体, Keyt等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 3670-3674(1994))が大量瞬時投与に特に適している。しかしながら、これらのあらゆる進歩にもかかわらず、患者の生存率の長期間の予後は、梗塞後のモニタリングと患者の治療に大きく依存しており、それは心臓肥大のモニタリングと治療を含まなければならない。

#### 【0018】

##### 成長因子

種々の天然に生じるポリペプチドは内皮細胞の増殖を誘発すると報告されている。これらのポリペプチドとしては、塩基性及び酸性の線維芽細胞増殖因子(FGF)(Burgess及びMaciag, *Annual Rev. Biochem.*, 58: 575(1989))、血小板誘導内皮細胞成長因子(PD-ECGF)(Ishikawa等, *Nature*, 338: 557(1989))、及び血管内皮成長因子(VEGF)を挙げることができる。Leung等, *Science*, 246: 1306(1989); FerraraとHenzel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 161: 851(1989); Tischer等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165: 1198(1989); 1996年7月31日に許可された欧州特許第471,754号。

#### 【0019】

ヒトVEGF(hVEGF)cDNAが形質移入された細胞により馴化された培地においては、毛管内皮細胞の増殖は促進されるが、これに対し、コントロール細胞はそうではなかった。Leung等, *Science*, 246: 1306(1989)。hVEGFの121-、189-及び206-アミノ酸イソ型(また集合的にhVEGF関連タン

パク質と称される)をコードする、いくつかの付加的なcDNAがヒトcDNAライブラリーにおいて同定されている。121-アミノ酸タンパク質はhVEGFにおける残基116と159との間の44アミノ酸が欠失している点でhVEGFとは異なる。189-アミノ酸タンパク質は、hVEGFにおける残基116における24のアミノ酸の挿入によりhVEGFとは異なり、ヒト血管浸透因子(hVPF)と明らかに同一である。206-アミノ酸タンパク質はhVEGFの残基116における41アミノ酸の挿入によりhVEGFとは異なる。Houck等, Mol. Endocrin., 5:1806(1991); Ferrara等, J. Cell. Biochem., 47:211(1991); Ferrara等, Endocrine Reviews, 13:18(1992); Keck等, Science, 246:1309(1989); Connolly等, J. Biol. Chem., 264:20017(1989); 1990年5月30日に公開された欧州特許第370,989号。

#### 【0020】

現在では、先在する内皮からの新規な血管の形成に関連した血管新生が、種々の疾病の病原に関与していることが明確に確立されている。これらには固形腫瘍及び転移、アテローム性動脈硬化、水晶体後方線維増殖症、血管腫、慢性炎症、眼新血管新生症候群、例えば増殖性網膜症、例えば糖尿病網膜症、加齢関連性斑変性(AMD)、新血管新生緑内障、移植角膜組織及び他の組織の免疫拒絶、慢性関節リウマチ、及び乾癬が含まれる。Folkman等, J. Biol. Chem., 267:10931-10934(1992); Klagsbrun等, Annu. Rev. Physiol., 53:217-239(1991); 及びGarner A, 「Vascular diseases」。Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A. Klintworth GK, eds., 2nd Edition(Marcel Dekker, NY, 1994) 1625-1710頁。

#### 【0021】

腫瘍成長の場合では、血管形成は、過形成から新生組織形成への変化、及び固形腫瘍の成長用の滋養物の提供に非常に重要であると思われる。Folkman等, Nature, 339:58(1989)。新血管新生により、腫瘍細胞が正常細胞と比較して成長有利性と増殖自律性を獲得する。従って、腫瘍部位の微小血管密度と乳癌並びに幾つかの他の腫瘍における患者の生存率との間には相関関係が見出されている。Weidner等, N. Engl. J. Med. 324:1-6(1991); Horak等, Lancet, 340:1120-112

4(1992); Macchiarini等, Lancet, 340:145-146(1992)。

【0022】

血管形成の正の調節因子の探索により、aFGF、bFGF、TGF- $\beta$ 、TGF- $\alpha$ 、HGF、TNF- $\alpha$ 、アンジオゲニン、IL-8等を含む多くの候補薬が得られている。上掲のFolkman等, J.B.C.,及び上掲のKlagsbrunら。これまでに同定されている負の調節因子には、トロンボスポンジン(Good等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87:6624-6628(1990))、プロラクチンの16-キロダルトンのN-末端フラグメント(Clapp等, Endocrinology, 133:1292-1299(1993))、アンジオスタチン(angiostatin)(O'Reilly等, Cell, 79:315-328(1994))及びエンドスタチン(endostatin)が含まれる。O'Reilly等, Cell, 88:277-285(1996)。

【0023】

最近の数年間にわたってなされた研究で、血管内皮細胞の増殖を刺激するだけでなく、血管の浸透性及び血管形成を誘発する点においてもVEGFの重要な役割が確立されている。Ferrara等, Endocr. Rev., 18:4-25(1997)。一つのVEGF対立遺伝子さえ喪失すると胎児死亡に至るという知見は、血管系の発達と分化におけるこの因子が担っている代替のない役割を示している。さらに、VEGFは腫瘍及び眼内疾患に関連した新血管新生の重要な媒介物であることが示されている。Ferrara等, Endocr. Rev., 上掲。VEGF mRNAは検査した多くのヒト腫瘍で過剰発現している。Berkman等, J. Clin. Invest., 91:153-159(1993); Brown等, Human Pathol., 26:89-91(1995); Brown等, Cancer Res., 53:4727-4735(1993); Mattern等, Brit. J. Cancer, 73:931-934(1996); Dvorak等, Am. J. Pathol., 146:1029-1039(1995)。

【0024】

また、眼の流体中のVEGFの濃度レベルは、糖尿病及び他の虚血関連網膜症を有する患者における血管の活性増殖の存在性と高い相関関係がある。Aiello等, N. Engl. J. Med., 331:1480-1487(1994)。さらに、近年の研究により、AMDの影響を受けている患者の脈絡膜新生血管膜にVEGFが局在化していることが示されている。Lopez等, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 37:855-868(1996)。

## 【0025】

抗-VEGF中和抗体は、ヌードマウスにおいて、様々なヒト腫瘍株化細胞の成長を抑制し(Kim等, *Nature*, 362:841-844(1993); Warren等, *J. Clin. Invest.*, 95:1789-1797(1995); Borgstrom等, *Cancer Res.*, 56:4032-4039(1996); Melnyk等, *Cancer Res.*, 56:921-924(1996))、また虚血性網膜疾患のモデルにおける眼内血管形成を阻害する。Adamis等, *Arch. Ophthalmol.*, 114:66-71(1996)。よって、抗-VEGFモノクローナル抗体又はVEGF作用に対する他の阻害剤は、固形腫瘍及び種々の眼内新血管疾患の治療用の候補薬とされている。このような抗体は、例えば1998年1月14日に公開された欧州特許第817,648号及び1998年4月3日に出願されたPCT/US 98/06724に記載されている。

## 【0026】

ある種の細胞により発現する遺伝子の複合体を素早く誘導することができる、トランスフォーミング発ガン遺伝子を含む、いくつかの他の成長因子及び分裂促進因子が存在する。Lau及びNathans. *Molecular Aspects of Cellular Regulation*, 6:165-202(1991)。前初期遺伝子又は初期反応遺伝子と命名されているこれらの遺伝子は、デノボタンパク質合成と無関係に、成長因子又は分裂促進因子と接触後数分間で転写的に活性化される。これらの前初期遺伝子のグループは、分化及び増殖、再生、及び傷治療等の複雑な生物学的プロセスを調整するのに必要な、分泌性の細胞外タンパク質をコードする。Ryseck等, *Cell Growth Differ.*, 2:235-233(1991)。

## 【0027】

このグループに属する高度に関連したタンパク質には、*c e f 1 0* (Simmons等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1178-1182(1989))、血清-又は血小板誘導成長因子(P D G F)により素早く活性化される *c y r 6 1* (O'Brien等, *Mol. Cell Biol.*, 10:3569-3577(1990))、トランスフォーミング成長因子 (T G F-)による活性化後に高レベルでヒト血管内皮細胞により分泌され、P D G F様の生物学的及び免疫学的活性を示し、特定の細胞表面レセプターに対してP D G Fと競合するヒト結合組織成長因子(C T G F)(Bradham等, *J. Cell Biol.*, 114:1285-1294(1991))、*f i s p - 1 2* (Ryseck等, *Cell Growth Differ.*, 2:235-

233(1991))、ヒト血管 I B P - 様成長因子 (V I G F ) (W096/17931)、及び通常は成人腎臓細胞に静止され、骨髄芽球-関連-ウイルス I 型誘発腎芽細胞腫において過剰発現することが見出されている n o v が含まれる。Joloit等, Mol. Cell. Biol., 12: 10-21(1992)。

#### 【0028】

これらの前初期遺伝子の発現は、成長因子により誘発される事象のカスケードにおける「第3のメッセンジャー」として作用する。また、それらは複雑な生物学的プロセス、例えば分化及び細胞増殖が通常の事象である傷治療を統合及び調整するのに必要であると考えられている。

付加的な分裂促進因子として、インシュリン様成長因子結合タンパク質 (I G F B P s ) が、インシュリン様成長因子 (I G F ) と複合体として、線維芽細胞及び平滑筋細胞表面レセプターへの I G F の結合性を増加させるように刺激することが示されている。Clemmonsら., J. Clin. Invest., 77: 1548(1986)。様々なインビトロでの I G F 作用に対する I G F B P の阻害効果は、脂肪細胞によるグルコース輸送の刺激、軟骨細胞によるサルフェートの取り込み、及び線維芽細胞中へのチミジンの取り込みを含む。Zapf等, J. Clin. Invest., 63: 1077(1979)。さらに、正常な細胞での、成長因子媒介性分裂促進因子活性における I G F B P の阻害効果が示されている。

#### 【0029】

##### 腫瘍壊死因子レセプター及びリガンド

様々な分子、例えば腫瘍壊死因子 - (「T N F - 」)、腫瘍壊死因子 - (「T N F - 」又は「リンホトキシン - 」)、リンホトキシン - (「L T - 」)、C D 3 0 リガンド、C D 2 7 リガンド、C D 4 0 リガンド、O X - 4 リガンド、4 - 1 B B リガンド、A p o - 1 リガンド (F a s リガンド又は C D 9 5 リガンドとも称される)、及び A p o - 2 リガンド (トレイル (T R A I L ) とも称される) が、サイトカインの腫瘍壊死因子 (「T N F」) ファミリーのメンバーとして同定された [ 例えば、Gruss及びDower, Blood, 85:3378-3404(1995); Pittiら, J. Biol. Chem., 271:12687-12690(1996); Wileyら, Immunity, 3:673-682(1995); Browningら, Cell, 72:847-856(1993); Armitageら, Nat

ure, 357:80-82(1992)、1997年1月16日に公開されたW097/01633 ; 1997年7月17日に公開されたW097/25428 ]。

#### 【0030】

このようなTNFファミリーサイトカインによる種々の細胞応答の誘導は、それらの特定の細胞レセプターへの結合によって開始されると考えられている。およそ55 - kDa (TNFR1) 及び75 - kDa (TNFR2) の二つの異なるTNFレセプターが同定され [ Hohmanら, J. Biol. Chem., 264:14927-14934(1989) ; Brockhausら, Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 3127-3131(1990) ; 1991年3月20日に公開された欧州特許第 417,563号 ]、両レセプター形態と一致するcDNAが同定され、特徴づけられている [ Loesterら, Cell, 61:351(1990) ; Schallerら, Cell, 61: 361(1990) ; Smithら, Science, 248: 1019-1023(1990) ; Lewisら, Proc. Natl. Acad. Sci., 88:2830-2834(1991) ; Goodwinら, Mol. Cell. Biol., 11: 3020-3026(1991) ]。広範な多形態性が、双方のTNFレセプター遺伝子に関連している [ 例えば、Takaoら, Immunogenetics, 37 : 199-203(1993)を参照 ]。双方のTNFRは細胞外、膜貫通及び細胞内領域を含む細胞表面レセプターの典形態的な構造を共有する。双方のレセプターの細胞外部分はまた可溶性TNF結合タンパク質として天然に見出される [ Nophar, Yら, EMBO J., 9 : 3269(1990) ; 及びKohno, Tら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87 : 8331(1990) ]。更に最近になって、組換え体可溶性TNFレセプターのクローニングがヘイル(Hale)らにより報告されている [ J. Cell. Biochem. 増補15F, 1991, p.113(P424) ]。

#### 【0031】

1形態及び2形態のTNFR(TNFR1及びTNFR2)の細胞外部分は、NH<sub>2</sub>末端から出発して、1~4とされる4つのシステインに富んだドメイン(CRD)の反復アミノ酸配列パターンを含む。各CRDは約40のアミノ酸長のものであり、良好に保存された位置に4~6のシステイン残基を含んでいる [ Schallerら, 上掲 ; Loetscherら, 上掲 ; Smithら, 上掲 ; Nopharら, 上掲 ; Kohnoら, 上掲 ]。TNFR1において、4つのCRDのおおよその境界は次の通りである : CRD1 - 14から約53までのアミノ酸 ; CRD2 - 約54から約97まで

のアミノ酸；CRD3 - 約98から約138までのアミノ酸；CRD4 - 約139から約167までのアミノ酸。TNFR2において、CRD1は、17から約54までのアミノ酸を、CRD2は約55から約97までのアミノ酸を；CRD3は約98から約140までのアミノ酸を；CRD4は約141から約179までのアミノ酸を含む [Bannerら, Cell, 73:431-435(1993)]。また、リガンド結合におけるCRDの潜在的な役割は上掲のバナー(Banner)らにより記載されている。

#### 【0032】

CRDの類似の反復パターンが、p75神経成長因子レセプター(NGFR) [Johnsonら, Cell, 47:545(1986); Radekeら, Nature, 325:593(1987)]、B細胞抗原CD40 [Stamenkovicら, EMBO J., 8:1403(1989)]、T細胞抗原OX40 [Malletら, EMBO J., 9:1063(1990)]及びFas抗原 [上掲のYoneharaら, 及びItohら, Cell, 66:233-243(1991)]を含む幾つかの他の細胞表面タンパク質に存在している。また、CRDはショープ(Shope)及び粘液腫ポックスウィルスの可溶形態TNFR(sTNFR)様のT2タンパク質にも見出されている [Uptonら, Virology, 160:20-29(1987); Smithら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 176:335(1991); Uptonら, Virology, 184:370(1991)]。これらの配列の最適なアラインメントは、システイン残基の位置が良好に保存されていることを示している。これらレセプターは、しばしば集合的に、TNF/NGFレセプタースーパーファミリーのメンバーと称される。p75NGFRに関する最近の研究では、CRD1の欠失 [Welcher, A.A.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:159-163(1991)]又はこのドメインにおける5-アミノ酸の挿入 [Yan, H及びChao, M.V., J. Biol. Chem., 266:12099-12104(1991)]は、NGF結合にはほとんど又は全く影響を持たないことが示されている [Yan, H及びChao, M.V., 上掲]。p75NGFRはNGF結合に関与せず、そのCRD4と膜貫通領域の間に約60のアミノ酸のプロリンに富んだ伸展を含む [Peetre, Cら, Eur. J. Hematol., 41:414-419(1988); Seckinger, Pら, J. Biol. Chem., 264:11966-11973(1989); Yan, HとChao, M.V., 上掲]。同様のプロリンに富んだ領域はTNFR2に見出されているが、TNFR1にはない。

## 【0033】

リンホトキシン- を除き、今日までに同定されているTNFファミリーのリガンドはII形態の膜貫通タンパク質であり、そのC末端は細胞外にある。これに対して、今日までに同定されているTNFレセプター(TNFR)ファミリーのレセプター類はI形態の膜貫通タンパク質である。しかしながら、TNFリガンド及びレセプターファミリーの双方において、ファミリーメンバー間で同定された相同性は、主として細胞外ドメイン(「ECD」)において見出されている。TNF-、Apo-1リガンド及びCD40リガンドを含むTNFファミリーサイトカインのいくつかは、細胞表面においてタンパク分解的に切断され；各場合に得られたタンパク質は、典形態的には、可溶性サイトカインとして機能するホモ三量体分子を形成する。また、TNFレセプターファミリーのタンパク質は、通常、タンパク分解的に切断され、同族のサイトカインの阻害剤として機能し得る可溶性レセプターのECDを放出する。

最近になって、TNFRファミリーの他のメンバーが同定されている。このような新たに同定されたTNFRのメンバーは、CAR1、HVEM及びオステオプロテゲリン(osteoprotegerin)(OPG) [Brojatschら, Cell, 87:845-855 (1996); Montgomeryら, Cell, 87:427-436 (1996); Marstersら, J.Biol.Chem., 272:14029-14032 (1997); Simonetら, Cell, 89:309-319 (1997)]を含む。上掲のシモネット(Simonet)らは、他の周知のTNFR様分子とは異なり、OPGは疎水性の膜貫通 - スパニング配列を含まないと報告している。下記にて検討されているように、OPGはおとりレセプターのように作用すると考えられている。

## 【0034】

さらに、TNF/NGFレセプターファミリーの新規なメンバーがマウスにおいて同定され、レセプターは、「糖質コルチコイド誘発腫瘍壊死因子レセプターファミリー関連遺伝子」に対して「GITR」と命名された [Nocentiniら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6216-6221 (1997)]。マウスGITRレセプターは228アミノ酸のI形態膜貫通タンパク質であり、胸腺、脾臓及びリンパ節からの正常マウスTリンパ球において発現される。マウスGITRレセプターの発

現は、抗-CD3抗体、ConA又はホルボール12-ミリステート13-アセテートでの活性化の際にTリンパ球で誘発される。筆者は、GITRレセプターがT細胞レセプター媒介細胞死の調節に関与していると考えている。

マースターズ(Marsters)ら, *Curr. Biol.*, 6:750(1996)において、研究者は、細胞外のシステインに富んだ反復においてTNFRファミリーに対して類似性を示し、細胞質死亡ドメイン配列を含む点でTNFR1及びCD95に似ている、Apo-3と称されるヒトのポリペプチド全長天然配列を開示している [Marstersら, *Curr. Biol.*, 6:1669(1996)も参照されたい]。他の研究者によれば、Apo-3は、DR3、ws1-1及びTRAMPとも称されている [Chinnaiyanら, *Science*, 274:990(1996); Kitsonら, *Nature*, 384:372(1996); Bodmerら, *Immunity*, 6:79(1997)]。

#### 【0035】

パン(pan)らは、「DR4」と称される他のTNFレセプターファミリーのメンバーを開示している [Panら, *Science*, 276:111-113(1997)]。DR4は細胞自殺器を活動させることのできる細胞内死亡ドメインを含むと報告された。パンらは、DR4がApo-2リガンド又はTRAILとして知られるリガンドのレセプターであると考えられることを開示している。

シェリダン(Sheridan)ら, *Science*, 277:818-821 (1997)及びパンら, *Science*, 277:815-818 (1997)においては、Apo-2リガンド(TRAIL)に対するレセプターと思われる他の分子が記載されている。この分子は、DR5と呼ばれる(あるいは、Apo-2とも呼ばれる)。DR4と同様に、DR5は細胞内死亡ドメインを含み、アポトーシスをシグナル伝達可能であると報告されている。

シェリダン(Sheridan)らにおいて、DcR1(あるいは、Apo-2DcR)と称されるレセプターがApo-2リガンド(TRAIL)に対するレセプターの潜在的なおとりレセプターであることが開示される。シェリダン(Sheridan)らは、DcR1がインビトロでApo-2リガンド機能を抑制することができることを報告している。また、TRIDと称されるおとりレセプターでの開示のための上掲パン(のPan)ら参照。

サイトカイン及びそれらのレセプターのTNFファミリーについては、上掲のグラス(Gruss)とドワー(Dower)参照。

#### 【0036】

さらなる治療の必要性

多くの病気及び疾患における血管内皮細胞の成長及び血管形成の役割に鑑みると、これらのプロセスに起因する一又は複数の生物学的影響を低減又は抑制する手段を有していることが好ましい。また、正常及び病気の状態、特にガンにおいて病原性ポリペプチドの存在を検査する手段を有していることも望ましい。さらに、特定の側面では、心臓肥大の治療には一般的に適用できる治療法がないので、心臓ミオサイト肥大を防止又は低減可能な因子を同定することは、病態生理学的な心臓成長を阻害するための新規な治療方策の開発において非常に重要である。様々な心臓血管及び発癌遺伝子疾患のためのいくつかの治療様式が存在するが、さらなる治療的アプローチがなお必要とされている。

#### 【0037】

(発明の概要)

従って、本発明は、哺乳類における血管形成及び/又は心血管形成を促進又は阻害するための組成物及び方法に関する。出願人は新規なポリペプチドをコードするcDNAクローンを同定し、ここで該ポリペプチドは当出願人により「PRO364」及び「PRO175」と称される。これらの新規なタンパク質は、任意の生物活性の促進及び抑制を試験する様々な血管新生アッセイにおいてポジティブと試験された。従って、血管形成の促進又は抑制、血管内皮細胞の成長又は増殖の刺激、腫瘍成長の抑制、血管形成依存性組織成長の抑制の治療等の効果が望まれているところでは、当該タンパク質は疾患の診断及び/又は治療(予防を含む)に有用な薬剤であると考えられる。

#### 【0038】

一実施態様において、本発明は製薬的に許容される担体と混合されてPRO364(hGITR)ポリペプチドを含む組成物を提供する。他の様態では、本発明は製薬的に許容される担体と混合されてPRO175(hGITRL又はGLITTER)ポリペプチドを含む組成物を提供する。一態様では、組成物は治療的

有効量のどちらか又は両方のポリペプチドを含有する。他の態様では、組成物はさらなる活性成分、すなわち、心臓血管、内皮又は血管形成剤又は血管新生抑制剤、好ましくは血管形成又は血管新生抑制薬を含有する。好ましくは組成物は無菌である。PRO364又はPRO175ポリペプチドは、液状の製薬調製物の形態で投与することができ、これは、貯蔵安定性が延びるように保存できる。保存された液状の製薬調製物は複数回投与用のPRO364又はPRO175ポリペプチドを含有していてもよく、よって繰り返し使用に適している。

#### 【0039】

さらなる実施態様において、本発明は、担体と治療的有効量のPRO364又はPRO175ポリペプチドとを混合して含む、心臓血管、内皮、及び血管形成疾患の治療に有用なこのような組成物の調製方法を提供する。

またさらなる態様において、本発明は：

(a)治療的有効量のPRO364又はPRO175ポリペプチドを含有するような組成物；

(b)該組成物を収容する容器；及び

(c)心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療における該PRO364又はPRO175ポリペプチドの使用を記した、該容器に添付されるラベル又は当該医薬品に収納される包装挿入物を具備する医薬品を提供する。

また更なる態様では、本発明は、PRO364又はPRO175ポリペプチド核酸配列の突然変異に関連する疾患又は疾患に対する感受性を診断する方法において：

(a)宿主に由来する試料からのPRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする核酸配列を単離し；及び

(b)PRO364又はPRO175ポリペプチド核酸配列の突然変異を決定することを含む方法を提供する。

また更なる態様において、本発明は、宿主に由来する試料のPRO364又はPRO175ポリペプチドの存在を分析することを含む診断方法を提供する。

#### 【0040】

また他の態様において、本発明は、哺乳動物における心臓血管、内皮、及び血

管形成疾患を診断する方法であって、(a)哺乳動物から得た組織細胞の試験試料、及び(b)同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料におけるPRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを分析することを含み、試験試料中の発現レベルの高低が、試験組織を得た哺乳動物における心臓血管、内皮、及び血管形成疾患の存在を示す方法に関する。

さらに他の実施態様では、本発明は、哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を治療する方法であって、PRO364又はPRO175ポリペプチドの有効量を当該哺乳動物に投与することを含む方法に関する。好ましくは、疾患は心臓肥大、創傷又は火傷などの外傷、又は癌の一型である。さらなる態様では、心臓血管、内皮、及び血管形成疾患が癌の一型であるならば、哺乳動物は、血管形成術、又は心臓血管、内皮、及び血管形成疾患を治療するための薬剤、例えばACE阻害剤、又は化学療法剤にさらに暴露される。好ましくは哺乳動物はヒト、好ましくは心臓肥大を起こす危険性のあるヒト、より好ましくは心筋梗塞を罹患しているヒトである。

他の好ましい態様において、心臓肥大は、PGF<sub>2</sub>レベルの上昇が存在することにより特徴付けられる。あるいは、心臓肥大は心筋梗塞により誘発され、ここで、好ましくはPRO364又はPRO175ポリペプチドの投与は、心筋梗塞に続いて48時間、好ましくは24時間以内に開始される。

#### 【0041】

他の好ましい実施態様において、心臓血管、内皮、及び血管形成疾患は心臓肥大であり、前記PRO364又はPRO175ポリペプチドは心臓血管、内皮又は血管形成剤と共に投与される。この目的のために好ましい心臓血管、内皮又は血管形成剤は、抗高血圧薬、ACE阻害剤、エンドセリンレセプターアンタゴニスト及び血栓溶解剤からなる群から選択される。血栓溶解剤が投与される場合、好ましくは、PRO364又はPRO175ポリペプチドはこのような薬剤の投与後に投与される。より好ましくは、血栓溶解剤は組換えヒト組織プラスミノゲンアクチベータである。

他の好ましい態様において、心臓血管、内皮、及び血管形成疾患は心臓肥大であり、PRO364又はPRO175ポリペプチドは急性心筋梗塞の治療のため

の一次血管形成術に続いて投与され、ここで好ましくは、当該哺乳動物は血管形成術又は心臓血管、内皮又は血管形成剤にさらに暴露される。

他の好ましい実施態様において、心臓血管、内皮、及び血管形成疾患は癌であり、PRO364又はPRO175ポリペプチドは化学療法剤、成長阻害剤、又は細胞毒性薬と組合せて投与される。

#### 【0042】

他の実施態様において、本発明は、PRO364又はPRO175ポリペプチドのアゴニストを同定する方法であって、

(a)細胞とスクリーニングすべき化合物とを、PRO364又はPRO175による細胞増殖の刺激に適した条件下で接触させ；

(b)化合物が有効なアゴニストであるかを決定するために細胞の増殖を測定することを含む方法を提供する。

(c)さらに本発明は前記方法により同定されたPRO364又はPRO175ポリペプチドのアゴニストを供給する。

他の実施態様では、本発明は、候補化合物をPRO364又はPRO175ポリペプチドとを、該化合物とポリペプチドが相互作用するのに十分な条件及び時間で接触させることを含む、PRO364又はPRO175ポリペプチドの発現又は活性を阻害する化合物の同定方法を提供する。特に好ましい態様では、候補化合物又はPRO364又はPRO175ポリペプチドのいずれかが固体支持体に固定化される。他の好ましい態様では、非固定化成分が検出可能な標識を担持する。好ましくは、この方法は：

(a)細胞とスクリーニングすべき化合物とを、PRO364又はPRO175ポリペプチドの存在下で、PRO364又はPRO175ポリペプチドによる細胞増殖の誘発に適した条件下で接触させ；

(b)細胞増殖の誘発を測定して、化合物が有効なアンタゴニストであるか否かを決定する工程を含む。

また更なる実施態様では、本発明は、PRO364又はPRO175ポリペプチドの発現又は活性を阻害する化合物、例えば上記方法により同定される化合物を提供する。

更なる実施態様では、本発明は、PRO364又はPRO175ポリペプチドに対するアンタゴニストの治療的有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における心臓血管、内皮、及び血管形成疾患を治療する方法に関する。好ましくは、心臓血管、内皮、及び血管形成疾患は、心臓肥大、外傷、癌、又は加齢性黄斑変性である。また好ましくは、哺乳動物はヒトであり、血管形成又は血管新生抑制剤の効果的有効量をアンタゴニストと併せて投与する。

#### 【0043】

PRO364又は175ポリペプチドの一又は複数の機能又は活性を阻害するPRO364又は175ポリペプチドのアンタゴニストの一種は抗体である。よって、他の態様では、本発明はPRO364又は175ポリペプチドに結合する単離された抗体を提供する。さらに、本発明はPRO364又は175ポリペプチドに結合する単離された抗体を提供する。好ましい態様において、抗体はモノクローナル抗体であり、好ましくは非ヒト相補性決定領域(CDR)残基及びヒトフレームワーク領域(FR)残基を有する。抗体は標識され、固体支持体上に固定化されていてもよい。さらなる態様では、抗体は抗体断片、一本鎖抗体、又は抗-イディオタイプ抗体である。

他の実施態様では、本発明は、PRO364又はPRO175ポリペプチドを含有すると推測される細胞を抗-PRO364又は-PRO175抗体に暴露し、前記抗体の前記細胞への結合を測定することを含む、PRO364又はPRO175ポリペプチドの存在を測定する方法を提供する。

また更なる実施態様では、本発明は、(a)該哺乳動物から得た組織細胞の試験試料を抗-PRO364又は-PRO175抗体と接触させ、そして(b)試験試料中での抗-PRO364又は-PRO175抗体とPRO364又はPRO175ポリペプチドとの複合体形成を検出することを含む、哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を診断する方法を提供する。質的または量的に検出され、同じ細胞型の既知の通常組織細胞のコントロールサンプルにおける複合体形成のモニタリングと比較して実施されうる。試験サンプルで形成される複合体の量の大小は、試験組織細胞を得た哺乳動物の心臓血管、内皮、及び血管形成機能障害の存在を示す。抗体は、好ましくは検出可能な標識を担持する。複合体形成は

、例えば光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、又は当該分野で既知の他の技術によりモニターすることができる。試験試料は、通常心臓血管、内皮、及び血管形成疾患を有すると推測される個体から得られる。

更なる実施態様では、本発明は抗-PRO364又は-PRO175抗体と担体とを適切な包装内に含む、癌の診断キットを提供する。好ましくは該キットは、PRO364又はPRO175ポリペプチドを検出するための前記抗体の使用説明を更に含む。好ましくは担体は、例えばバッファーである。

更なる実施態様では、本発明は：

容器；

容器上のラベル；及び

容器内に収容された抗-PRO-364又は-175抗体を含む組成物を含む製造品を提供し、容器上の該ラベルに該組成物が心臓血管、内皮、及び血管形成疾患を治療するために使用することができることを示す。

#### 【0044】

また他の実施態様では、本発明は、抗-PRO364又は-PRO175抗体の治療的有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物においてPRO364又はPRO175ポリペプチドにより誘発される血管形成を抑制する方法を提供する。好ましくは、哺乳動物はヒトであり、更に好ましくは哺乳動物が腫瘍又は網膜疾患を有する。

またさらなる実施態様において、本発明は、PRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする遺伝子を哺乳動物に投与することを含む、心臓血管、内皮又は血管形成疾患を患っている哺乳動物の心臓血管、内皮、及び血管形成疾患の治療方法を提供する。好ましい実施態様において哺乳動物はヒトである。他の好ましい実施態様において、遺伝子は、エキソビボの遺伝子治療を介して投与される。さらなる好ましい実施態様において、遺伝子はベクター、より好ましくはアデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レンチウイルス、又はレトロウイルスベクター内に包含される。

また、他の態様では、本発明は、本質的にプロモーター、PRO365又はPRO175ポリペプチドをコードする核酸、及びポリペプチドの細胞分泌のシグ

ナル配列からなるレトロウィルスベクターを含む組換えレトロウィルス粒子を提供し、ここでのレトロウィルスベクターはレトロウィルス構造タンパク質と結合している。好ましくはシグナル配列は哺乳動物由来、例えば、天然のPRO364又はPRO175ポリペプチド由来である。

また、さらなる実施態様において、本発明は、レトロウィルス構造タンパク質を発現する核酸構造体含有し、また、プロモータ、PRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする核酸分子、及びポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列から本質的になるレトロウィルスベクターも含有するエキソピボ産生細胞(producer cell)を提供し、ここで当該産生細胞は、組換えレトロウィルス粒子を生産する構造タンパク質を付随するレトロウィルスベクターを提供する。

#### 【0045】

(発明の詳細な記載)

##### 1. 定義

「心臓血管、内皮、及び血管形成疾患」、及び「心臓血管、内皮、及び血管形成機能不全」という用語は相互交換可能に使用され、真性糖尿病等の血管に影響を及ぼす全身疾患、並びに血管、例えば動脈、毛細管、静脈、及び/又はリンパ管それ自体の病気の一部を指す。これには、血管形成及び/又は心血管形成を刺激する徴候、及び血管形成及び/又は心血管形成を阻害する徴候が含まれている。このような疾患には、例えば動脈の病気、例えばアテローム性動脈硬化、高血圧、炎症性脈管炎、レーノー病及びレーノー現象、動脈瘤、及び動脈再狭窄；静脈及びリンパ管の疾患、例えば血栓静脈炎、リンパ管炎、及びリンパ浮腫；及び他の血管疾患、例えば末梢血管病、癌、例えば血管腫瘍、例えば血管腫(毛細管及び海綿状)、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮細胞腫、カポジ肉腫、リンパ管腫、及びリンパ管肉腫、腫瘍血管形成、外傷、例えば創傷、火傷、及び他に損傷を被った組織、移植固定、癒痕化、虚血再灌流傷害、慢性関節リュウマチ、脳血管の病気、腎臓病、例えば急性腎不全、及び骨粗鬆症が含まれる。また、アンギナ(狭心症)、心筋梗塞、例えば急性心筋梗塞、心臓肥大、及び心不全、例えばCHFも含まれる。

## 【0046】

ここで使用される場合の「肥大」とは、腫瘍形成に関与しない正常な成長とは無関係に組織又は構造体の大きさが増加することとして定義される。器官又は組織の肥大は個々の細胞の大きさの増加(真性肥大)、又は組織を形成する細胞数の増加(過形成)、又はその両方のいずれかによる。ある種の器官、例えば心臓は誕生後、短い期間で分割能力を失う。従って、「心臓肥大」は心臓の大きさが増加するものとして定義され、成人においては、細胞分割が付随することのない、収縮性タンパク質の含有量とミオサイトの細胞サイズの増加により特徴付けられる。肥大を刺激する原因となるストレスの特徴(例えば、プレロードの増加、アフターロードの増加、心筋梗塞の場合と同様のミオサイトの損失、収縮性の一次低下)が、反応の性質の決定において重要な役割を担っていることは明らかである。心臓肥大の初期段階は、通常、ミオフィブリンとミトコンドリアのサイズの増加、並びにミトコンドリアと核の拡大により形態学的に特徴付けられる。この段階において、筋細胞は正常なものよりもより大きくなり、細胞組織はかなり保存される。心臓肥大の段階がさらに進行すると、特定のオルガネラ、例えばミトコンドリアの数及びサイズが優先的に増加し、新規の収縮エレメントは不規則な方法で、細胞の局在領域に添加される。長年にわたって肥大を被っている細胞は、隣接するミオフィブリンを置換し、正常なZ膜レジストレーションの破壊を引き起こす、高度に分葉された膜を有する、かなり拡大した核を含む、細胞組織体におけるより明らかな分裂を示す。「心臓肥大」という用語は、根底にある心疾患に関係なく、心筋の種々の度合いの構造的ダメージにより特徴付けられる病状の進行における全ての段階を含むように使用される。よって、その用語は、心臓肥大の発達における生理学的病状、例えば血圧の上昇、大動脈狭窄、又は心筋梗塞も含む。

## 【0047】

「心不全」は、心臓が代謝中の組織の要求が必要とする速さで血液を送らない心機能の異常を指す。心不全は虚血、先天的、リュウマチ性又は特発的形態を含む多くの因子が原因となり得る。

「鬱血性心不全」(CHF)は、末梢組織まで酸素化された血液を送達させるた

めに、十分な心拍出量(経時的に心臓により押し出される血液量)を供給することのできない心臓の進行性の病状である。CHFが進行すると、構造的及び血行力学的ダメージが生じる。これらのダメージは色々と現れ、一つの特徴的徴候は心室肥大である。CHFは多くの心疾患の共通した最終結果である。

#### 【0048】

「心筋梗塞」は、しばしば多重冠動脈血栓症を伴う、冠動脈のアテローム性動脈硬化の結果であると一般的にされている。それは、2つのタイプ：心室壁の全厚みにわたって心筋壊死がある壁内梗塞、及び心室壁を通過して心外膜に至る全ての経路に伸長することなく、壊死が内皮下層、心筋壁内、又はその両方にある副心内膜(非壁内)梗塞に分けることができる。心筋梗塞は血行力学的影響の変化と心臓のダメージを受けた、及び健康な領域における構造の変化の両方に原因があることが知られている。よって、例えば心筋梗塞により心臓の最大流出量及び心臓鼓動容量が低減する。また、心筋梗塞に関連して、間隙に生じるDNA合成が刺激され、影響を受けていない心臓領域におけるコラーゲンの形成が増加する。

#### 【0049】

長期間にわたる高血圧において、心臓のストレス及び圧力が増加する結果、例えば全末梢耐性が増加して、心臓肥大は長期間「高血圧」を付随するようになる。慢性的に圧力が加わる結果で肥大した心室の特徴は、心拡張の実行が損なわれることである。Fouad等, J. Am. Coll. Cardiol., 4: 1500-1506(1984); Smith等, J. Am. Coll. Cardiol., 5: 869-874(1985)。長期間にわたる左心室の弛緩には、心収縮機能が正常又は通常ではないのかかわらず、早くに本能性高血圧がみられた。Hartford等, Hypertension, 6: 329-338(1984)。しかし、血圧レベルと心臓肥大との間は平行して近接していない。ヒトにおいて、抗高血圧治療に応じた左心室機能の改善は報告されているが、利尿薬(ヒドロクロロチアジド)、  
-ブロッカー(プレパノロール)、又はカルシウムチャンネルブロッカー(ジルチアゼム)で治療している患者は、心拡張機能が改善されることなく左心室肥大への逆戻りがみられる。Inouye等, Am. J. Cardiol., 53: 1583-7(1984)。

#### 【0050】

心臓肥大に関連した他の複合的心疾患は「肥大性心筋症」である。この病状は

形態学的、機能的及び臨床的特性が非常に多様であること(Maron等, N. Engl. J. Med., 316 : 780-789(1987) ; Spirito等, N. Engl. J. Med., 320 : 749-755(1989) ; Louie及びEdwards, Prog. Cardiovasc. Dis., 36 : 275-308(1994) ; Wigle等, Circulation, 92 : 1680-1692(1995))、全年齢の患者を悩ます事実により強調される異種性により特徴付けられる。Spirito等, N. Engl. J. Med., 336 : 775-785(1997)。また、肥大性心筋症の原因となる要因は多様であり、ほとんど理解されていない。一般的に、サルコメアタンパク質をコードする遺伝子における変異が肥大性心筋症に関与している。近年のデータでは、 $\beta$ -ミオシン重鎖変異が、家族性肥大性心筋症の原因の約30から40パーセントであると計測されていることを示唆している。Watkins等, N. Engl. J. Med., 326 : 1108-1114(1992) ; Schwartz等, Circulation, 91 : 532-540(1995) ; Marian及びRoberts, Circulation, 92 : 1336-1347(1995) ; Thierfelder等, Cell, 77 : 701-712(1994) ; Watkins等, Nat. Gen., 11 : 434-437(1995)。 $\beta$ -ミオシン重鎖の他にも、他の位置の遺伝子変異に、心臓トロポニンT、アルファトポミオシン、心臓ミオシン結合プロテインC、必須ミオシン軽鎖、及び調節性ミオシン軽鎖が含まれる。Malik及びWatkins, Curr. Opin. Cardiol., 12 : 295-302(1997)を参照されたい。

#### 【0051】

上弁「大動脈狭窄」は、上行大動脈が狭くなることにより特徴付けられる遺伝性血管疾患であるが、肺動脈を含む他の動脈もさらに影響をうけるおそれがある。未治療の大動脈狭窄では、心内圧力が増加し、結果として心臓肥大が生じ、実際には心不全及び死に至る。この疾患の病因は十分には理解されていないが、中間平滑筋の過形成可能性及び肥大はこの疾患の顕著な特徴である。エラスチン遺伝子の分子変異体が大動脈狭窄の発現及び病因に関与していることが、1997年7月22日発行の米国特許第5,650,282号に報告されている。

「心臓弁逆流」は心臓弁の疾患の結果による心臓病の結果として生じる。リュウマチ熱のような種々の病気は、弁オリフィスの収縮又は引っ張りを引き起こすものであるが、他の病気は、心内膜炎、心内膜又は心房オリフィスの内側の膜の炎症、及び心臓の手術による。欠損、例えば弁狭窄又は弁の欠損近接により、心臓腔における血液の蓄積、又は弁を通過しての血液の逆流が生じる。弁狭窄又は

不全を長期間治癒しないと、心臓肥大や心筋に関連したダメージを被る結果となり、最終的には弁の交換が必要となる。

これら全て、及び心臓肥大が付随してもしなくてもよい他の心臓血管、内皮及び血管形成疾患の治療が本発明に含まれる。

#### 【0052】

「癌」、「癌性」及び「悪性」なる用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、腺癌、リンパ腫、芽細胞腫、黒色腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃癌、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、例えば肝癌(hepatic carcinoma)及び肝細胞腫(hepatoma)、膀胱癌、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮体癌、唾液腺癌、腎細胞癌及びウィルムス腫瘍等の腎臓癌、基底細胞癌、黒色腫、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、精巣癌、食道癌、及び様々な種類の頭部及び頸部の癌が含まれる。ここでの治療に好適な癌は乳癌、大腸癌、肺癌、黒色腫、卵巣癌及び上述した血管腫瘍を含むものである。

#### 【0053】

ここで用いられる「細胞毒性薬」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体(例えば、<sup>31</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>90</sup>Y及び<sup>186</sup>Re)、化学治療薬、及び細菌、真菌、植物又は動物起源の酵素活性毒素等の毒素、又はそれらの断片を含むことを意図する。

「化学治療薬」は、癌の治療に有用な化学化合物である。化学治療薬の例には、アルキル化剤、葉酸アンタゴニスト、核酸代謝の抗-代謝産物、抗生物質、ピリミジン類似物、5-フルオロウラシル、シスプラチン、プリンヌクレオシド、アミン類、アミノ酸、トリアゾールヌクレオシド、又はコルチコステロイド類が含まれる。特定の例には、アドリアマイシン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド(「Ara-C」)、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン、タキソール、トキソテア、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド

、イフォスファミド、マイトマイシンC、ミトキサントン、ビンクリスチン、ビノレルビン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラマイシン(米国特許第4,675,187号参照)、メルファラン及び関連するナイトロジェンマスタードを含む。また、タモキシフェン及びオナプリストン等の腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように機能するホルモン薬もこの定義に含まれる。

#### 【0054】

「成長阻害薬」は、ここで用いられる場合、インビトロ又はインビボで、細胞、例えばWnt-過剰発現癌細胞の成長を阻害する化合物又は組成物を指す。すなわち、成長阻害薬は、S相における悪性細胞のパーセンテージをかなり低減させるものである。成長阻害薬の例は、細胞周期の進行を(S相以外の位置で)阻止する薬剤、例えば、G1停止及びM相停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM相ブロッカーは、ピンカス(ビンクリスチン及びビンブラスチン)、タキソール、及びトポII阻害剤、例えばドキソルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。G1停止させるこれらの薬剤は、S相停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル及びAra-Cである。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編集, Chapter 1, Murakamiらによる表題「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」(WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出される。さらなる例には、腫瘍壊死因子(TNF)、酸性又は塩基性FGF又は肝実質細胞成長因子(HGF)の血管形成活性を阻害又は中和可能な抗体、組織因子の凝固活性を阻害又は中和可能な抗体、プロテインC又はプロテインS(1991年2月21日に公開されたW091/01753を参照されたい)、又はHER2レセプターに結合可能な抗体(W089/06692)、例えば4D5抗体(及びそれらの機能的等価物)(例えばW092/22653)が含まれる。

#### 【0055】

「治療」とは、心臓血管、内皮及び血管形成疾患の病的状態の進行又は改変の防止を意図して行われる。治療の概念は最も広い意味に使用され、任意の段階の

心臓血管、内皮及び血管形成疾患の防止(予防)、緩和、低減、及び治癒を特に含む。従って、「治療」は治癒的処置、及び予防的又は防止的手段の両方を指し、患者は心臓血管、内皮及び血管形成疾患、例えば肥大を防止又は遅延化させられる。治療が必要なものとは、既に疾患に罹っているもの、並びに疾患に罹りやすいもの又は疾患が防止されているものを含む。疾患は、特発症、心栄養性(cardi otrophic)、又は筋栄養性の原因、又は虚血又は虚血発作、例えば心筋梗塞を含む、任意の原因の結果によるものである。

「慢性」投与とは、急性の態様とは異なり連続的な形で薬剤を投与し、初期の効果、例えば抗肥大効果を長時間にわたって維持することを指す。

治療の目的のための「哺乳動物」は、ヒト、家庭及び農業用動物、及び動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ブタなどを含む哺乳類に分類される任意の動物を指す。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

一又は複数のさらなる治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時(同時期)及び任意の順序での連続した投与を含む。

#### 【0056】

「心臓血管、内皮又は血管形成薬」なる用語は、一般的に、心臓血管、内皮及び血管形成疾患の治療に作用する任意の薬剤を指す。心臓血管剤の例は、血圧、心拍数、心収縮、及び内皮及び平滑筋の生物学を調節する血管ホメオスタシスを促進するもので、全因子は心臓血管病における役割を有している。これらの特定の例には、アンギオテンシン-Iレセプターアンタゴニスト：エンドセリンレセプターアンタゴニスト、例えばBOSENTAN™及びMOXONODIN™、インターフェロン-ガンマ(IFN- $\gamma$ )；des-アスパラタート-アンギオテンシンI：血栓溶解剤、例えばストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、t-PA、及び半減期がより長く、非常に高いフィブリン特異性を有するように設計されたt-PA変異体、TNK-t-PA(T103N、N117Q、KHR R(296-299)AAAA t-PA変異体、Keyt等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3670-3674(1994))：強心薬又は昇圧薬、例えばジゴキシゲニン、及び $\beta$ -アドレナリン様レセプターブロック剤、例えばプロプラノロール、チモロール、タータロロール、カルテオロール、ナ

ドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロール、及びカーベジルロール；アンギオテンシン転換酵素(ACE)阻害剤、例えばクイナピリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル、及びリシノプリル；ジウレティクス、例えばクロロチアザイド、ヒドロクロロチアザイド、ヒドロフルメタザイド、メチルクロチアザイド、ベンズチアザイド、ジクロロフェナミド、アセタゾラミド、及びインダパミド；及びカルシウムチャンネルブロッカー、例えばジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル、ニカルジピンが含まれる。この種の好ましい一カテゴリーは、心臓肥大、又は心臓肥大の進行における生理学的状態、例えば血圧の上昇、大動脈狭窄又は心筋梗塞の治療に使用される治療薬である。

#### 【0057】

「血管形成剤」及び「内皮薬」は、血管形成及び/又は内皮細胞の成長、又は適切であるならば管形成を促進する活性剤である。これには、傷の治癒を促進する因子、例えば成長ホルモン、インシュリン様成長因子-I(IGF-I)、VEGF、VIGF、PDGF、表皮成長因子(EGF)、CTGF及びそのファミリーのメンバー、FGF、及びTGF- $\beta$ 及びTGF- $\beta$ が含まれる。

「血管新生抑制剤」は血管形成又は管形成を阻害、又は癌細胞の成長を阻害又は防止する活性剤である。例には、上述した血管形成剤の抗体又は他のアンタゴニスト、例えばVEGFに対する抗体が含まれる。さらに、細胞治療薬、例えば細胞毒性薬、化学治療薬、成長阻害薬、アポトーシス薬、及び癌を治療する他の薬剤、例えば抗-HER-2、抗-CD20、及び生物活性及び有機化学薬が含まれる。

#### 【0058】

本発明における薬理学的意味で、活性剤、例えばPRO364又はPRO175ポリペプチド、又はそれらのアンタゴニストの「治療的有効量」とは、心臓血管、内皮、及び血管形成疾患の治療に有効な量を指すものである。

ここで用いられる用語「PRO364ポリペプチド」は、天然由来のPRO364(配列番号:3)ポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有する天然配列PRO364ポリペプチドを意図して使用される。このような天然配列PRO364

ポリペプチドは、天然のものから単離することもできるし、組換え又は合成手段により生産することもできる。該用語には、特に、PRO364の自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列等を含む可溶性形態)、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びPRO364ポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。ここで使用される場合の「PRO364ポリペプチド」及び「PRO364」は、文献で「GITR」と称される同じポリペプチドを指す。本発明の一実施態様において、天然配列PRO364ポリペプチドはFig 1のアミノ酸1から241(配列番号:3)を含む成熟又は全長天然配列PRO364ポリペプチドである。更なる実施態様では、Fig 2(配列番号:3)のアミノ酸26-241を含むPRO364ポリペプチドを指す。本発明の他の実施態様において、天然配列PRO364ポリペプチドは全長PRO364タンパク質の細胞外ドメイン配列であり、Fig 2(配列番号:3)に示される配列のアミノ酸162-180を含む全長PRO364タンパク質の推定の膜貫通ドメインである。あるいは、PRO364ポリペプチドはATCC209436として寄託されているベクターDNA47365-1206のcDNA挿入物によりコードされるポリペプチドを発現することにより得られるか又は得ることができる。よって、本発明の更なる実施態様ではFig 2(配列番号:3)に示されるアミノ酸配列のアミノ酸1-161又は26-161を含むポリペプチドを指す。

#### 【0059】

PRO364ポリペプチドを意図して使用される場合の「細胞外ドメイン」という用語は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しないPRO364ポリペプチドの形態を指す。通常、PROポリペプチドECDは、それらの膜貫通及び/又は細胞質ドメインを1%未満、好ましくはそのようなドメインを0.5%未満しか持たない。包含されるのは1又は複数のアミノ酸がN-又はC-末端から欠失した全長又はECDの欠失変異体又は断片である。好ましくは、このような欠失変異体又は断片は、ここに記載されるような所望の活性を有する。本発明のPRO364ポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従

い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインのいずれかの末端から約5アミノ酸を越えない可能性が高い。従って、PROポリペプチドECDは、場合によっては、Fig 2 (配列番号: 3)のアミノ酸YからXを含んでもよく、YはFig 2 (配列番号: 3)のアミノ酸残基の1から26の何れか1つ、Xはアミノ酸残基157から167の何れか1つである。

#### 【0060】

PRO364ポリペプチドを意図して使用される場合の「変異体」という用語は、下記に定義されるように、全長天然配列PRO364ポリペプチド又はその細胞外ドメイン配列のFig 2 (配列番号: 3)に示される推定のアミノ酸配列を有するPRO364ポリペプチドと、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。このようなPRO364ポリペプチド変異体には、例えば、全長天然アミノ酸配列のN-又はC-末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたPRO364ポリペプチドが含まれる。通常、PRO364ポリペプチド変異体は、Fig 2 (配列番号: 3)のアミノ酸配列と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、更により好ましくは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、更により好ましくは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性を有している。

#### 【0061】

ここで用いられる用語「PRO175ポリペプチド」は、天然由来のPRO175 (配列番号: 14)ポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有する天然配列PRO175ポリペプチドを意図して使用される。このような天然配列PRO175ポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生産することもできる。該用語には、特に、特定のPRO175ポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びPRO175ポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。ここで使用される場合の「PRO175ポリペプチド」及び「PRO175」は、文献で「GLITTER

」と称される同じのポリペプチドを指す。本発明の一実施態様において、PRO 175にコードされる天然配列ポリペプチドは、Fig 5のアミノ酸1から177(配列番号:14)を含む成熟又は全長天然配列ポリペプチドである。更なる実施態様では、PRO 175ポリペプチドは、Fig 5(配列番号:14)のアミノ酸52-177を含む。場合によっては、PRO 175ポリペプチドはATCC 209466として寄託されているベクターのcDNA挿入物によりコードされるポリペプチドを発現することにより得られるか又は得ることができる。よって、本発明の更なる実施態様ではFig 5(配列番号:14)に示されるアミノ酸配列の1から177又は52から177を含むポリペプチドを指す。

#### 【0062】

PRO 175ポリペプチドを意図して使用される場合の「細胞外ドメイン」という用語は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しないPRO 175ポリペプチドの形態を指す。通常、PROポリペプチドECDは、それらの膜貫通及び/又は細胞質ドメインを1%未満、好ましくはそのようなドメインを0.5%未満しか持たない。包含されるのは1又は複数のアミノ酸がN-又は-C末端から欠失した全長又はECDの欠失変異体又は断片である。好ましくは、このような欠失変異体又は断片は、ここに記載されるような所望の活性を有する。本発明のPRO 175ポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインのいずれかの末端から約5アミノ酸を越えない可能性が高い。従って、PRO 175ポリペプチドECDは、場合によっては、Fig 5(配列番号:14)のアミノ酸Xから177を含んでもよく、XはFig 5(配列番号:14)のアミノ酸残基の48から57の何れか1つである。

PRO 175ポリペプチドを意図して使用される場合の「変異体」という用語は、下記に定義されるように、全長天然配列PRO 175ポリペプチド又はその細胞外ドメイン配列のFig 5(配列番号:14)に示される推定のアミノ酸配列を有するPRO 175ポリペプチドと、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。PRO 175ポリペプチド変異体には、例えば、Fig 5(配列

番号：14)の配列のN-又はC-末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたPRO175ポリペプチドが含まれる。通常、PRO175ポリペプチド変異体は、Fig 5(配列番号：14)のアミノ酸配列と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、更により好ましくは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、更により好ましくは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性を有している。

#### 【0063】

ここに同定される配列に対する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、PRO364ポリペプチド配列又はPRO175ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法で達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、以下に記載するように、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが表1に与えられている配列比較プログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、表1に示したソースコードは米国著作権庁、Washington D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2はジェネンテック社、South San Francisco, Californiaを通して公に入手可能である。全ての配列比較パラメータはALIGN-2により設定され、変化しない。配列のアラインメントの実施及び配列同一性の決定の方法は当業者においてよく知られ、過度の経験が無くても実施でき、%同一性の測定値は一定して得ることとができる。

#### 【0064】

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために

使用するとき、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEにより均一になるまで精製される。単離されたポリペプチドには、PRO364又はPRO175リガンドポリペプチドの自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも1つの精製工程により調製される。

「単離された」PRO364又はPRO175核酸分子は、同定され、PRO364又はPRO175核酸の天然源に通常付随している少なくとも1つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたPRO364又はPRO175核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。ゆえに、単離されたPRO364又はPRO175核酸分子は、天然の細胞中に存在するPRO364又はPRO175核酸分子とは区別される。しかし、PRO364又はPRO175核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるPRO364又はPRO175を通常は発現する細胞に含まれるPRO364又はPRO175核酸分子を含む。

#### 【0065】

「コントロール配列」という用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に

参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのPRO364又はPRO175ポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

#### 【0066】

ハイブリッド形成反応の「緊縮性」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度を低くする必要がある。ハイブリッド形成は、一般的に、相補的ストランドがその融点より低い環境に存在する場合における変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリッド形成可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をより緊縮性にするが、低い温度は緊縮性を低下させる。ハイブリッド形成反応の緊縮性の更なる詳細及び説明は、Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biology (Wiley Interscience Publishers, 1995)を参照のこと。

ここで定義される「緊縮性条件」又は「高度の緊縮性条件」は、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50℃において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2)ハイブリッド形成中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42℃において50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエ

ン酸ナトリウムを用いるもの；(3)42 における50%ホルムアミド、5×SSC(0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハード液、超音波処理サケ精子DNA(50μg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストラン硫酸と、42 における0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中の洗浄及び55 での50%ホルムアミド、次いで55 におけるEDTAを含む0.1×SSCからなる高緊縮性洗浄を用いるものによって同定される。

「中程度の緊縮性条件」は、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されているように同定され、上記の緊縮性より低い洗浄溶液及びハイブリッド形成条件(例えば、温度、イオン強度及び%SDS)の使用を含む。中程度の緊縮性条件の例には、20%ホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハード液、10%デキストラン硫酸、及び20mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の37 での終夜インキュベーション、次いで1×SSC中37-50 でのフィルターの洗浄といった条件が含まれる。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識するであろう。

#### 【0067】

「エピトープタグ」なる修飾詞は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したPRO364又はPRO175ポリペプチドを含むキメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するに十分な数の残基を有しているが、その長さは融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8~50のアミノ酸残基(好ましくは約10~約20のアミノ酸残基)を有する。

PRO364又はPRO175変異体における「活性な」及び「活性」とは、

天然又は自然に生じるPRO364又はPRO175ポリペプチドの生物学的及び/又は免疫学的活性を保持するPRO364又はPRO175タンパク質の形態を指す。

ここで開示されているスクリーニングアッセイにより同定可能なPRO364又はPRO175ポリペプチドに拮抗する分子(例えば、有機又は無機小分子、ペプチド等)における「生物学的活性」とは、ここで同定されたPRO364又はPRO175ポリペプチドに結合又は複合体化、又は他の細胞タンパク質とPRO364又はPRO175ポリペプチドとの相互作用を干渉するこのような分子の能力を指すときに使用される。特に好ましい生物学的活性には、血管に影響を及ぼす全身疾患、例えば真性糖尿病、並びに動脈、毛細管、静脈及び/又はリンパ管の病気、及び癌に作用する心臓肥大活性が含まれる。

#### 【0068】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然PRO364又はPRO175ポリペプチドの一又は複数の生物学的活性、例えば適切であるならば、その分裂促進又は血管形成活性を阻止、阻害、又は中和する任意の分子を含む。PRO364又はPRO175ポリペプチドのアンタゴニストは、PRO364又はPRO175ポリペプチドの細胞レセプターへの結合に干渉する、PRO364又はPRO175ポリペプチドにより活性化される細胞を無力化又は死亡させる、又はPRO364又はPRO175ポリペプチドが細胞レセプターに結合した後に血管内皮細胞の活性化に干渉することにより作用する。PRO364又はPRO175ポリペプチドアンタゴニストによる仲介のこのような点の全ては、この発明の目的と等しいと考えられる。アンタゴニストは、分裂促進、血管形成、又はPRO364又はPRO175ポリペプチドの他の生物学的活性を阻害し、よって、腫瘍、特に固形悪性腫瘍、慢性関節リュウマチ、乾癬、アテローム性動脈硬化、糖尿病、他の網膜症、水晶体後繊維増殖症、年齢関連性斑変性、血管新生緑内障、血管腫、甲状腺過形成(グレイブス病)、角膜及び他の組織の移植、及び慢性炎症を含む、所望しない過度の新血管新生により特徴付けられる病気又は疾患の治療に有用である。また、アンタゴニストは、所望しない過度の血管浸透性により特徴付けられる病気又は疾患、例えば脳腫瘍

に関連した浮腫、悪性腫瘍に関連した腹水症、メーグス症候群、肺炎、ネフローゼ症候群、心外膜液(例えば心膜炎に関連したもの)、胸膜滲出の治療に有用である。同様に「アゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然PRO364又はPRO175ポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を含む。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然PRO364又はPRO175ポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、有機小分子等を含む。

#### 【0069】

「抗体」(Abs)と「免疫グロブリン」(Igs)は同じ構造的特徴を有する糖タンパク質である。抗体は特定の抗原に対して結合特異性を示すものであるが、免疫グロブリンは、抗体及び抗原特異性を欠く他の抗体様分子の両方を含むものである。後者の種類のポリペプチドは、例えばリンパ系により低レベルで、骨髄腫により増加したレベルで産生される。「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、限定するものではないが、特に無傷のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷の抗体から形成された多重特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、及びそれらが所望の生物活性を示す限り抗体断片も含む。

「天然抗体」及び「天然免疫グロブリン」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖からなる、約150000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は、異なった免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の中で変化する。また各重鎖と軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド結合を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン( $V_H$ )を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン( $V_L$ )を、他端に定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

#### 【0070】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲

に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を指す。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域又は相補性決定領域(CDR)と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つのCDRにより連結されたシート配置を主にとる4つのFR領域をそれぞれ含んでいる。各鎖のCDRは、FRにより近接して結合せしめられ、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している。Kabat等, NIH Publ. No.91-3242, Vol.1, 647-669頁(1991)を参照のこと。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害活性への抗体の関与を示す。

#### 【0071】

「抗体断片」には、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域が含まれる。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>及びFv断片；ダイアボディー(diabodies)；直鎖状抗体(Zapata等, Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995))；単鎖抗体分子；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。

抗体のパパイン消化により、各々が単一の抗原結合部位を有する「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片と、その名称が容易に結晶化する能力を表す、残りの「Fc」断片が産生される。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有し、更に抗原を架橋させ得るF(ab')<sub>2</sub>断片が得られる。

「Fv」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この配置において、各可変ドメインの3つのCDRは相互に作用してV<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つのCDRが抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)でさえ、全結合部位より

も親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

#### 【0072】

またFab断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)を有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でFab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持しているFab'に対するここでの命名である。F(ab')<sub>2</sub>抗体断片は、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生産された。抗体断片の他の化学結合も知られている。

任意の脊椎動物種からの抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ( )及びラムダ( )と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには5つの主たるクラス：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、それらのいくつかは更にサブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及びIgA2に分割される。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\delta$ 及び $\mu$ と呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び3次元構造はよく知られている。

#### 【0073】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能な突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。更に、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的には含む通常の(ポリクローナル)抗体と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンによって汚染されていないハイブリドーマ培養から合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、実質的に均一な抗体集団から得られているという抗体の

特徴を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、最初に Kohler等, Nature 256, 495 (1975)により開示されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えDNA法によって作ることができる(例えば、米国特許第4,816,567号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson等, Nature 352:624-628(1991)、及びMarksほか, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の種由来の抗体あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか相同であり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体あるいは他の抗体クラスあるいはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか相同である「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、並びにそれが所望の生物学的活性を有する限りそれら抗体の断片を特に含む。米国特許第4,816,567号; Morrisonほか, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)。

#### 【0074】

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはそれらの断片(例えばF<sub>v</sub>、F<sub>a</sub>b、F<sub>a</sub>b'、F<sub>(a</sub>b')<sub>2</sub>あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。大部分においてヒト化抗体はレシピエントのCDRの残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのF<sub>v</sub>FR残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練し、最適化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2

つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。更なる詳細は、Jones等, Nature 321, 522-525(1986); Reichmann等, Nature 332, 323-329(1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596(1992)を参照のこと。ヒト化抗体は、抗体の抗原結合領域が、関心ある抗原でマカクザルを免疫化することにより生産された抗体から由来するPRIMATIZED™抗体を含む。

#### 【0075】

「一本鎖Fv」又は「sFv」抗体断片は、抗体のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインを含有するもので、これらのドメインはポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、Fvポリペプチドは、sFvが抗原結合に対する所望の構造を形成できるようにするポリペプチドリンカーをV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインの間に更に含んでいる。sFvのレビューには、例えば、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol.113, Rosenberg及びMoore編(Springer-Verlag, New York, 1994)pp.269-315を参照されたい。

「ダイアボディー」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を指すもので、断片は軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)に結合した重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)を同じポリペプチド鎖(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)に含有する。同じ鎖上での二つのドメイン間の対合が許されないほど短いリンカーを使用することにより、ドメインが、他の鎖の相補的ドメインとの対合を強いられ、二つの抗原結合部位をつくりだす。ダイアボディーは、例えば、欧州特許第404,097号; 国際公開93/11161号; 及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)に更に詳しく記載されている。

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離及び/又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、その抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、(1)ローリー法(Lowry method)で測定した場合95%を越えるまで、最も好ましくは99重量%を越えるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、

少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEにより均一になるまで精製される。単離された抗体には、抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

#### 【0076】

「標識」なる語は、ここで用いられる場合、抗体に直接又は間接的に複合して「標識」抗体を生成する検出可能な化合物又は他の組成物を指す。標識は、それ自身検出可能でもよく(例えば、放射性標識又は蛍光標識)、又は酵素標識の場合、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変換を触媒してもよい。

「固相」とは、本発明の抗体がそれに付着することのできる非水性マトリクスを意味する。ここに含まれる固相の例は、部分的又は全体的に、ガラス(例えば、孔制御ガラス)、多糖類(例えばアガロース)、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンから形成されたものを含む。或る種の実施態様では、内容に応じて、固相はアッセイプレートの穴を構成することができ；その他では精製カラム(例えばアフィニティークロマトグラフィーカラム)とすることもできる。また、この用語は、米国特許第4,275,149号に記載されたような、別個の粒子の不連続な固相も包含する。

#### 【0077】

「リポソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤からなる小型の小胞であり、哺乳動物への薬物(例えば、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はここに開示されているそれらの抗体など)の輸送に有用である。リポソームの成分は、通常は生体膜の脂質配列に類似する二層形式に配列させる。

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質(「アドヘシン」)の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である(すなわち「異種の」)アミノ

酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、I g G-1、I g G-2、I g G-3又はI g G-4サブタイプ、I g A (I g A-1及びI g A-2を含む)、I g E、I g D又はI g Mなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

#### 【0078】

### II . 本発明の組成物及び方法

#### A . P R O 3 6 4 又は P R O 1 7 5 ポリペプチドの調製

本発明は、本出願において P R O 3 6 4 ( また P R O 6 8 7 又は U N Q 3 1 9 と称される ) 又は P R O 1 7 5 と称されるポリペプチドをコードする、新しく同定され、単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、P R O 3 6 4 及び P R O 1 7 5 ポリペプチドをコードする c D N A は以下の実施例にさらに詳しく開示されるようにして同定され、単離された。分離発現ラウンドで作成されたタンパク質は、異なる P R O 番号を与えられ得るが、U N Q 番号は任意の与えられた D N A 及びコードされたタンパク質に独自のものであり、変化し得ない。

以下の説明は、主として、P R O 3 6 4 又は P R O 1 7 5 ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することにより P R O 3 6 4 又は P R O 1 7 5 ポリペプチドを生産する方法に関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いて P R O 3 6 4 又は P R O 1 7 5 を調製することができると考えられる。例えば、P R O 3 6 4 又は P R O 1 7 5 ポリペプチド配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい。例えば、Stewart等、Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)参照。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機(Foster City, CA)を用いて、製造者の指示により実施してもよい。P R O 3 6 4 又は P R O 1 7 5 の種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて全長 P R O 3 6 4 又は P R O 1 7 5

ポリペプチドを生産してもよい。

【0079】

PRO364又はPRO175をコードするDNAの単離

PRO364又はPRO175ポリペプチドをコードするDNAは、PRO364又はPRO175をコードするmRNAを保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたcDNAライブラリーから得ることができる。従って、ヒトPRO364又はヒトPRO175をコードするDNAは、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製されたcDNAライブラリーから簡便に得ることができる。またPRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする遺伝子は、ゲノムライブラリーから又は公知の合成方法(例えば、自動化核酸合成)により得ることもできる。

ライブラリーは、関心ある遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ(PRO364又はPRO175ポリペプチドに対する抗体又は少なくとも約20-80塩基のオリゴヌクレオチド等)によってスクリーニングできる。選択されたプローブによるcDNA又はゲノムライブラリーのスクリーニングは、例えば上掲のSambrook等、に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。PRO364又はPRO175をコードする遺伝子を単離する他の方法はPCR法を使用するものである。Sambrook等、上掲；Dieffenbach等、PCR Primer：A Laboratory Manual (New York：Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)。

【0080】

下記の実施例には、cDNAライブラリーのスクリーニング技術を記載している。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、十分な長さで、疑ポジティブが最小化されるよう十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリー内のDNAとのハイブリッド形成時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、<sup>32</sup>P標識されたATPのような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用が含まれる。中程度の厳密性及び高度の厳密性を含むハイブリッド形成条件は、上掲のSambrook等に与えられている。

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列は、GenBank等の公共データベース又は個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内又は全長に渡っての(アミノ酸又はヌクレオチドレベルのいずれかでの)配列同一性は、ALIGN、DNAスター、及びINHERITのようなコンピュータソフトウェアを用いた配列アラインメントを通して決定することができる。

タンパク質コード配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、cDNAに逆転写されなかったmRNAの生成中間体及び先駆物質を検出する上掲のSambrook等に記述されているような従来のプライマー伸展法を使用し、選択されたcDNA又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより得られる。

#### 【0081】

ここに記載した全長天然配列PRO364又はPRO175ポリペプチドに加えて、PRO364又はPRO175変異体も調製できると考えられる。PRO364又はPRO175変異体は、PRO364-又はPRO175-コード化DNAに適当なヌクレオチド変化を導入することにより、あるいは所望のPRO364又はPRO175ポリペプチドを合成することにより調製できる。当業者であれば、グリコシル化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などのアミノ酸変化がPRO364又はPRO175ポリペプチドの翻訳後プロセスを変えうることを理解するであろう。

天然全長配列PRO364又はPRO175又はここに記載したPRO364又はPRO175ポリペプチドの種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第5,364,934号に記載されている保存的及び非保存的変異についての任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、天然配列PRO364又はPRO175と比較してPRO364又はPRO175ポリペプチドのアミノ酸配列が変化することになるPRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも一つのアミノ酸のPRO364又はPRO175ポリペプチドの

一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、PRO364又はPRO175ポリペプチドの配列を、相同性な既知のタンパク質分子のものと比較し、相同性の高い領域になされるアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸の類似した構造及び/又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては約1から5のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、得られた変異体について以下に記載される任意のインビボアッセイで活性を試験することにより決定される。

#### 【0082】

変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキヤニング、及びPCR突然変異誘発等の当該分野において公知の技術を使用して作成することができる。部位特異的突然変異誘発 [Carter等, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [Wells等, Gene, 34: 315 (1985)]、制限選択突然変異誘発 [Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)] 又は他の周知の技術が、PRO364コード化変異体DNAを製造するために、クローン化されたDNAに実施できる。

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキヤニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキヤニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキヤニングアミノ酸である。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じ

ない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

### 【0083】

#### PRO364の修飾

PRO364又はPRO175ポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一型は、PRO364又はPRO175ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、PRO364又はPRO175ポリペプチドの選択された側鎖又はN-又はC-末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることを含む。二官能性試薬での誘導体化が、例えばPRO364又はPRO175を水不溶性支持体マトリクスあるいは抗-PRO364又は-PRO175抗体の精製方法又はその逆で用いるための表面に架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬を含む。

他の修飾は、グルタミニル及びアスパラギニル残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の -アミノ基のメチル化[T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

### 【0084】

本発明の範囲内に含まれるPRO364又はPRO175ポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、この目的で意図されるのは、天然配列PRO364又はPRO175ポリペプチドに見られる一又は複数の炭水化物部分の欠失、及び/又は天然配列PRO364又はPRO175ポリペプチド

に存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。

PRO364又はPRO175ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴ってもよい。この変更は、例えば、一又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列PRO364又はPRO175ポリペプチド(O-結合グリコシル化部位)への付加、又は置換によってなされてもよい。PRO364又はPRO175アミノ酸配列は、場合によっては、DNAレベルでの変化、特に、PRO364又はPRO175ポリペプチドポリペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生産させることを通して変更されてもよい。

#### 【0085】

PRO364又はPRO175ポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。このような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に公開されたWO 87/05330、及びAplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

PRO364又はPRO175ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)により、及びEdge等, Anal. Biochem., 118: 131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, Meth. Enzymol. 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

PRO364又はPRO175の共有結合的修飾の他の型は、PRO364又はPRO175ポリペプチドの、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つへの、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。

#### 【0086】

また、本発明のPRO364又はPRO175ポリペプチドは、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したPRO364又はPRO175を含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとPRO364又はPRO175ポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的にはPRO364又はPRO175ポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなPRO364又はPRO175ポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗-タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってPRO364又はPRO175ポリペプチドを容易に精製できるようにする。もう一つの実施態様において、キメラ分子はPRO364又はPRO175ポリペプチドの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含む。キメラ分子の二価の形態には、このような融合はIgG分子のFc領域であり得る。場合によっては、キメラ分子は、IgG分子のFc領域に融合したPRO364又はPRO175ECD配列を含む。

種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン(poly-his)又はポリ-ヒスチジン-グリシン(poly-his-gly)タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Field等, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evan等, *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D(gD)タグ及びその抗体 [Paborsky等, *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hopp等, *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド [Martin等, *Science*, 255:192-194 (1992)]； $\alpha$ -チューブリンエピトープペプチド [Skinner等, *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)]を含む。

本発明のPRO364又はPRO175ポリペプチドは、ロイシンジッパーに融合したPRO364又はPRO175ポリペプチドを含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。種々のロイシンジッパーポリペプチドがこの分野で記載されている。例えば、Landschulz等, Science, 240: 1759 (1988); WO 94/10308; Hoppe等, FEBS Letters, 344: 1991 (1994); Maniatis等, Nature, 341: 24 (1989)を参照。PRO364又はPRO175ポリペプチドに融合したロイシンジッパーの使用は、溶液中の可溶性PRO364又はPRO175ポリペプチドの二量体化又は三量体化を助けると考えられる。当業者は、ロイシンジッパーがPRO364又はPRO175分子のN-又はC-末端のいずれかに融合することを認めるであろう。

#### 【0087】

#### 宿主細胞の選択と形質転換

宿主細胞を、ここに記載したPRO364又はPRO175生産のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler編 (IRL Press, 1991)及びSambrook等, 上掲に見出すことができる。

例えば、CaPO<sub>4</sub>治療及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shaw等, Gene, 23:315 (1983)及び1989年6月29日公開のWO 89/05859に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法を使用することができる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の

一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen等, *J. Bact.*, 130:946 (1977)及びHsiao等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown等, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990)及びMansour等, *Nature*, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

#### 【0088】

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294 (ATCC31,446)；大腸菌X1776 (ATCC31,537)；大腸菌株W3110 (ATCC27,325)及びK5772 (ATCC53,635)である。

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、PRO364又はPRO175ポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。

グリコシル化PRO364又はPRO175の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエS2及びスポドスペラSf9等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)及びCOS細胞を含む。多くの特異的な例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株 (COS-7, ATCC CRL 1651)；ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977))；チャイニーズハムスター卵巣細胞ノ-DHFR (CHO, Urlaub及びChasin, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA, 77:4216 (1980));マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980))ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8065); 及びマウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562, ATCC CCL51)を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

#### 【0089】

##### 複製可能なベクターの選択及び使用

PRO364又はPRO175をコードする核酸(例えば、cDNA又はゲノムDNA)は、クローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカ遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

PRO364又はPRO175は直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるが、ベクターに挿入されるDNA PRO364又はPRO175の一部である。シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、1ppあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、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(酵母菌属(Saccharomyces)及びクレイベロマイシス(Kluyveromyces) 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリーダー、白体(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日公開の欧州特許第362179号)、又は1990年11月15日に

公開されたWO 90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

#### 【0090】

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミド pBR322 に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 µプラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選択性マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)例えばバシリに対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

哺乳動物細胞に適切な選べるマーカーの例は、DHFRあるいはチミジンキナーゼのように、PRO364又はPRO175をコードする核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub等により、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたDHFR活性に欠陥のあるCHO株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子であるStinchcomb等, Nature, 282: 39(1979); Kingman等, Gene, 7: 141(1979); Tschemper等, Gene, 10: 157(1980)。trp1遺伝子は、例えば、ATCC番号44076あるいはPEP4-1のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する。Jones, Genetics, 85:12 (1977)。

## 【0091】

発現及びクローニングベクターは、通常、PRO364又はPRO175コードする核酸配列に作用可能に結合し、mRNA合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 (Cahng等, Nature, 275:615 (1978); Goeddel等, Nature, 281:544 (1979))、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系[Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); 欧州特許第 36,776号]、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーターを含む。deBoer等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)。細菌系で使用するプロモーターもまたPRO364又はPRO175をコードするDNAと作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ(S.D.)配列を有する。

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ (Hitzeman等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)) 又は他の糖分解酵素 (Hess等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900(1978))、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは欧州特許第 73,657号に更に記載されている。

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのPRO364又はPRO175核酸転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス(1989年7月5日

公開のUK 2,211,504)、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及びサルウイルス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、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

### 【0092】

より高等の真核生物による所望のPRO364又はPRO175をコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、PRO364又はPRO175のコード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウイルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、PRO364又はPRO175をコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養でのPRO364又はPRO175の合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei等, Nature, 281:40-46 (1979); 欧州特許第 117,060号;

及び欧州特許第 117,058号に記載されている。

### 【0093】

#### 遺伝子増幅 / 発現の検出

遺伝子の増幅及び / 又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンブロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンブロット法 (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980))、ドットブロット法(DNA分析)、又はインサイツハイブリッド形成法によって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。次いで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果二本鎖の表面での形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び / 又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列PRO364又はPRO175ポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はPRO364又はPRO175をコードするDNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

### 【0094】

#### ポリペプチドの精製

PRO364又はPRO175の形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-X<sup>100</sup>)又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。PRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする核酸の発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的

又は物理的手段によって破壊することができる。

PRO364又はPRO175ポリペプチドを、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAEによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過；IgGのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラム；及びPRO364又はPRO175ポリペプチドのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutcher, *Methodes in Enzymology*, 182 (1990)；Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, (Springer-Verlag, New York 1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定のPRO364又はPRO175ポリペプチドの性質に依存する。

#### 【0095】

PRO364又はPRO175ポリペプチドの用途

##### i. 心臓血管、内皮及び血管形成活性のアッセイ

種々のアッセイがここで記載されたポリペプチドの心臓血管、内皮及び血管形成活性を試験するために使用可能である。このようなアッセイは、下記の実施例に提供されるもの含む。

米国特許第5,773,414号に開示されているエンドセリンアンタゴニスト活性を試験するアッセイには、レセプターアッセイにおけるポリペプチドのヨード化エンドセリン-I結合を阻害する能力を試験するラット心室結合アッセイ、ウサギ腎動脈平滑筋細胞を使用し、放射能標識されたエンドセリン-Iの無傷細胞結合性を試験するエンドセリンレセプター結合アッセイ、機能活性が第2のメッセンジャーの細胞内レベルを測定することにより、Rat-I細胞内で測定されるイノシトールホスファート蓄積アッセイ、雄のニュージーランドウサギの内皮を使用するインビボ(単離された管)研究、及びSprague-Dawleyラットを使用するインビトロ研究において、添加化合物の、培養血管平滑筋内に放出されるエンドセリ

ン刺激アラキドン酸を低減させる能力を測定するアラキドン酸放出アッセイが含まれる。

#### 【0096】

組織生成活性のアッセイには、限定するものではないが、W095/16035(骨、軟骨、腱)；W095/05846(神経、ニューロン)、及びW091/07491(皮膚、内皮)に記載されているものが含まれる。

創傷治癒活性のアッセイには、例えば、Eaglstein及びMertz, J. Invest. Dermatol., 71: 382-384(1978)の論文で改変されている、Winter, Epidermal Wound Healing, Maibach, HI及びRovee, DT, 編(Year Book Medical Publishers. Inc., Chicago), pp71-112に記載されているものが含まれる。

エンドセリン $B_1$ (ET $B_1$ )レセプターポリペプチドに結合し、シグナル変換活性を調節するPRO364又はPRO175ポリペプチドに関連したテスト用分子のスクリーニングアッセイは、米国特許第5,773,223号に記載されたようにして、エンドセリン $B_1$ レセプターポリペプチドをコードするDNAで形質転換した宿主細胞を提供し、試験用候補薬に細胞を曝露し、エンドセリン $B_1$ レセプターシグナル変換活性を測定する。

幾つかの心臓肥大アッセイが存在する。インビトロアッセイには、成体ラット心臓ミオサイトの拡散の誘導が含まれる。このアッセイにおいて、心室ミオサイトは、Piper等、「Adult ventricular rat heart muscle cells」, Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research. H.M. Piper. ed(Berlin: Springer-Verlag, 1990), pp.36-60により詳細に記載されている手順を改変したものに本質的に従って、単一の(雄のSprague-Dawley)ラットから単離される。この手順により、成体心室ミオサイトの単離、及び桿体フェノタイプ細胞の長期間にわたる培養が可能になる。フェニレフリンとプロスタグランジン $F_2$ (PGF $_2$ )は、これら成体細胞の転移反応を誘発することが示されている。種々の心臓肥大の潜在的阻害剤による、PGF $_2$ 又はPGF $_2$ 類似体(例えばフルプロステノール)及びフェニレフリンにより誘発されるミオサイト転移阻害を次いで試験する。

#### 【0097】

インビボアッセイの一例は、インビボにおけるフルプロステノールにより誘発される心臓肥大の阻害をテストすることである。この薬理学的モデルは、フルプロステノール(PGF<sub>2</sub>のアゴニスト類似体)の皮下注射によりラット(例えば、雄のWistar又はSprague-Dawley)において誘発された心臓肥大を阻害するPRO364又はPRO175ポリペプチドの能力を試験するものである。心筋梗塞により誘発される病的な心臓肥大のあるラットにおいて、心筋内のPGF<sub>2</sub>が検出可能なレベルまで慢性的に上昇していることが知られている。Lai等, Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.), 271: H2197-H2208(1996)。従って、インビボでの心筋成長におけるフルプロステノールの影響を阻害可能な因子は、心臓肥大の治療に有用である可能性がある。心臓肥大におけるPRO364又はPRO175ポリペプチドの効力は、PRO364又はPRO175ポリペプチドを受容しないフルプロステノール処理されたラットに対する、心臓、心室及び左心室(体重により規格化)の重量を測定することにより決定される。

インビボアッセイの他の例は、圧力負荷心臓肥大アッセイである。インビボ試験において、試験用動物の腹部大動脈の収縮による圧力負荷心臓肥大を誘発することは共通している。典型的なプロトコルにおいて、ラット(例えば雄のWistar又はSprague-Dawley)は麻酔処理され、各ラットの腹部大動脈を横隔膜の真下まで狭窄する。Beznak M., Can. J. Biochem. Physiol., 33: 985-94(1955)。大動脈を外科的切開により曝露し、短い太針を管の隣におく。大動脈を針周囲に絹糸で結紮して収縮させ、すぐに除去し、針の直径まで大動脈の管腔を低減させる。このアプローチは、例えばRossi等, Am. Heart J., 124: 700-709(1992)及びO'Rourke及びReibel, P.S.E.M.B., 200: 95-100(1992)に記載されている。

#### 【0098】

また他のインビボアッセイにおいて、実験的に誘発された心筋梗塞(MI)に続く心臓肥大に対する効果を測定する。ラットにおいて、急性MIを左冠動脈結紮にて誘発し、さらにこれを心電図試験で確認する。また動物の擬似操作グループをコントロール動物として用意する。初期のデータには、心臓肥大はMIを有するグループに存在することが示され、体重に対し心臓重量は18%増加していることが明らかとなった。上掲のLai等。心臓肥大の候補ブロッカー、例えばPR

0364又はPRO175ポリペプチドでこれらの動物を治療し、テストした候補薬の治療可能性についての貴重な情報を提供する。Sprague-Dawleyラットを使用する、心臓肥大の誘発におけるさらなるアッセイテストは米国特許第5,773,415号に開示されている。

癌に対しては、腫瘍の病原及び進行におけるここで同定された遺伝子の役割をさらに理解し、天然PRO364又はPRO175ポリペプチドの抗体及び他のアンタゴニスト、例えば小分子アンタゴニストを含む治療用候補薬の効力をテストするために、種々のよく知られた動物モデルを使用することができる。このようなモデルのインビボの性質は、ヒト患者に前兆となる反応を特に起こさせるものである。腫瘍及び癌(乳癌、結腸癌、前立腺癌、肺癌等)の動物モデルには、非組換え及び組換え(トランスジェニック)動物が含まれる。非組換え動物モデルには、例えば齧歯動物、例えばネズミモデルが含まれる。このようなモデルは標準的な技術、例えば皮下注射、尾静脈注射、脾臓移植、腹膜移植、腎囊下移植、又はオルソピン(orthopin)移植、例えば結腸組織に移植された結腸癌細胞を使用し、同系のマウスに腫瘍細胞を移入することにより作成することができる。例えば、1997年9月18日に公開されたPCT公開番号W097/33551を参照されたい。

おそらくは癌遺伝子の研究に最も頻繁に使用される動物種は、免疫欠損マウス、特にヌードマウスである。胸腺刺激/形成不全を有するヌードマウスがヒト腫瘍異種移植片用の宿主として成功裡に作用するという知見はこの目的への広範な使用に導いた。常染色体劣性nu遺伝子は、例えばASW、A/He、AKR、BALB/c、B10、LP、C17、CH3、C57BL、C57、CBA、DBA、DDD、I/st、NC、NFR、NFS、NFS/N、NZB、NZC、NZW、P、RIII及びSJLを含む、非常に多数の明確に同族のヌードマウスに導入される。さらに、ヌードマウス以外に免疫学的欠損を受け継いだ広範囲の他の動物を育て、腫瘍異種移植片のレシピエントとして使用する。さらなる詳細は、例えばThe Nude Mouse in Oncology Research, E. Boven及びB. Wino grad. eds.(CRC Press, Inc., 1991)を参照されたい。

#### 【0099】

このような動物に導入された細胞は周知の腫瘍/癌細胞、例えば上述にて列挙

した任意の腫瘍細胞系、例えばB104-1-1細胞系(neu原腫瘍遺伝子で形質移入された安定NIH-3T3細胞系); ras-形質移入NIH-3T3細胞; Caco-2(ATCC HTB-37); 又は中程度に分化したグレードIIヒト結腸腺癌細胞系、HT-29(ATCC HTB-38)、又は腫瘍及び癌からのものを誘導可能である。腫瘍又は癌細胞のサンプルは凍結及び液体窒素での保管等を含む標準的な状態で使用され、外科手術により患者から得ることができる。Karmali等, Br. J. Cancer. 48:689-696(1983)。

腫瘍細胞は種々の手順によりヌードマウス等の動物に導入することができる。腫瘍の移植には、マウスの皮下(s.c.)空間が非常に適している。腫瘍は、固体ブロックとして、例えばトロカール(trochar)の使用による針バイオプシー、又は細胞懸濁液を移植することもできる。固体ブロック又はトロカール移植用に適した大きさの腫瘍組織断片が皮下空間に導入される。細胞懸濁液は一次腫瘍又は安定腫瘍細胞系から新鮮に調製され、皮下注射される。また、腫瘍細胞は皮下移植として注射することもできる。この位置において、移植片は真皮結合組織の下部と皮下組織との間に付与される。

#### 【0100】

乳癌の動物モデルは、Drebin等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83:9129-9133(1986)に記載されたようにして、例えばラット神経芽細胞(当初単離されたneu癌遺伝子からのもの)、又はneu-形質転換NIH-3T3細胞を、ヌードマウスに移植することにより作成することができる。

同様に、結腸癌の動物モデルは、動物、例えばヌードマウスに結腸癌細胞を通過させ、これらの動物に腫瘍を出現せしめることにより作成することができる。ヌードマウスにおけるヒト結腸癌の同所移植モデルは、例えばWang等, Cancer Research, 54:4726-4728(1994)及びToo等, Cancer Research, 55:681-684(1995)により記載されている。このモデルはAntiCancer, Inc., (San Diego, California)から販売されている、いわゆる「METAMOUSE™」に基づく。

動物内で生じた腫瘍は除去され、インビトロで培養することができる。ついで、インビトロ培養からの細胞を動物に継代させる。このような腫瘍はさらなるテスト又は薬剤スクリーニングを目的となりうる。あるいは、継代により得られた

腫瘍は単離可能で、継代前細胞及び一又は複数の継代段階の後に単離された細胞のRNAは、関心のある遺伝子の差次的発現用に分析される。このような継代技術は、任意の周知の腫瘍又は癌細胞系で行うことができる。

例えば、Meth A、CMS 4、CMS 5、CMS 21及びWEHI-164はBALB/c雌マウス(DeLeo等, J. Exp. Med., 146:720(1977))の繊維肉腫を化学的に誘発し、種々の薬剤の抗腫瘍活性を研究する高度に制御されたモデル系を提供する。Palladino等, J. Immunol., 138:4023-4032(1987)。簡単に言えば、腫瘍細胞は細胞培養におけるインビトロで増殖される。動物に注射をする前に細胞系を洗浄し、 $10 \times 10^6$ から $10 \times 10^7$ 細胞/mlの細胞密度でバッファーに懸濁させる。ついで、動物に10から100  $\mu$ lの細胞懸濁液を皮下注射すると、1から3週間で腫瘍が出現する。

#### 【0101】

さらに、最も詳細に研究されている試験用腫瘍の一つであるマウスのルイス肺(3LL)癌腫を研究用腫瘍モデルとして使用することができる。この腫瘍モデルの効力は、肺の小細胞癌腫(SCCL)と診断されたヒト患者の治療における好ましい効果と相関している。この腫瘍は、病気になったマウス、又は培養されている細胞からの腫瘍断片を注射することで、正常なマウスに導入することができる。Zupi等, Br. J. Cancer, 41: suppl. 4. 30(1980)。腫瘍が単一細胞の注射から出発して、感染した腫瘍細胞がかなりの高割合で生存しているという証拠が示された。この腫瘍モデルについてのさらなる情報は、Zacharski, Haemostasis, 16: 300-320(1986)を参照されたい。

移植腫瘍を有する動物モデルにおける試験化合物の効果を評価する方法の一つは、治療前又は後の腫瘍の大きさを測定することである。伝統的に、移植腫瘍の大きさは2又は3次元のスライドカリパスで測定される。2次元に限定する測定は腫瘍の大きさを正確に反映せず；よって通常は数式を使用し、対応する量に転換する。しかし、腫瘍サイズの測定は非常に不正確である。候補薬の治療効果は治療誘発性の成長が遅れ、特定の成長が遅れた場合に、より良好であると記載することができる。腫瘍成長の記載における他の重要な変数は腫瘍量が2倍になる時間である。また、腫瘍成長の算出及び記載のためのコンピュータプログラム、

例えばRygaard及びSpang-Thomsen, Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals. Wu及びSheng. eds.(Basel. 1989), p.301により報告されているプログラムが利用できる。しかし、治療後の壊死及び炎症反応は、実際には少なくとも最初は腫瘍サイズが増加する結果となり得ることに留意されるべきである。よって、これらの変化は形態計測法とフローサイトメトリー分析を組み合わせ、注意深く監視する必要がある。

#### 【0102】

さらに、組換え(トランスジェニック)動物モデルは、ここで同定されたPRO364又はPRO175遺伝子のコード化部位を、関心のある動物のゲノムに導入し、トランスジェニック動物を作成するための標準的な技術を使用して操作することができる。トランスジェニック操作の標的として提供可能な動物には、限定するものではないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、及び非ヒト霊長類、例えばヒヒ、チンパンジー及びサルが含まれる。このような動物に導入遺伝子を導入するための、当該分野における周知の技術には、前核のミクロ注射(米国特許第4,873,191号)；胚へのレトロウイルス媒介性遺伝子移動(例えば、Van der Putten等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82:6148-615(1985))；胚幹細胞における遺伝子を標的化(Thompson等, Cell, 56:312-321(1989))；胚のエレクトロポレーション(Lo, Mol. Cell. Biol., 3:1803-1814(1983))；及び精子媒介性遺伝子移動が含まれる。Lavitrano等, Cell, 57:717-73(1989)。レビューには、例えば米国特許第4,736,866号を参照されたい。

本発明の目的に対して、トランスジェニック動物にはそれらの細胞の一部のみに導入遺伝子を担持するもの(「モザイク動物」)が含まれる。導入遺伝子は、単一の導入遺伝子として、又はコンカテマーとして組み込むことができ、例えば、ヘッド対ヘッド又はヘッド対テイルのタンデムで組み込むことができる。また特定の細胞系への導入遺伝子の選択的導入は、例えばLasko等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89:6232-636(1992)の技術に従って可能である。

トランスジェニック動物における導入遺伝子の発現は通常の方法により監視可能である。例えば、サザンブロット分析又はPCR増幅を導入遺伝子の統合を証明するために使用することができる。ついで、mRNAの発現レベルはインシト

ウーハイブリッド形成、ノーザンブロット分析、PCR又は免疫細胞化学等の技術を使用して分析することができる。動物は腫瘍又は癌進行の徴候についてさらに試験される。

#### 【0103】

また、動物の胚性細胞に導入されたPRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする変更ゲノムDNAと、PRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、ここで同定されるPRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする欠陥又は変更遺伝子を有する「ノックアウト」動物を構成することができる。例えば、特定のPRO364又はPRO175ポリペプチドをコードするcDNAは、確立された技術に従い、該ポリペプチドをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。特定のPRO364又はPRO175ポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部を欠失したり、組み込みを監視するために使用する選択可能なマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングDNA(5'と3'末端の両方)を数キロベース含む。例えば、相同的組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503(1987)を参照のこと。ベクターは胚性幹細胞に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞が選択される。例えば、Li等, Cell, 69:915(1992)参照。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する。例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間を置いて「ノックアウト」動物をつくり出す。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、PRO364又はPRO175ポリペプチドが不在であることによるある種の病理的状态及びその病理的状态の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

#### 【0104】

ここで同定されたPRO364又はPRO175ポリペプチドに特異的に結合する抗体、及び他の候補薬の効果は、自然発症性動物腫瘍の治療においてさらに試験することができる。この研究のための適切な標的はネコ口部扁平上皮細胞癌腫(SCC)である。ネコ口部SCCは侵入性が高く、この悪性腫瘍はネコにおいて最も一般的な口部悪性腫瘍とされ、口部腫瘍の60%以上がこの種において繰り返されると計測されている。それは遠くの部位にはめったに転移しないが、転移の発生率が低いのは、この腫瘍を有するネコの生存期間が短いことに反映されている。これらの腫瘍は、主としてネコの口腔の解剖学的構造により、通常外科手術により処理することができない。現在のところ、この腫瘍に対する効果的な治療はない。研究に入る前に、各々のネコを完全な臨床実験用のバイオブシーとし、コンピュータX線断層撮影(CT)によりスキャンする。舌下口部扁平上皮細胞癌腫であると診断されたネコはこの研究から除外する。舌はこのような腫瘍の結果として麻痺し、治療により腫瘍が死亡しても、動物は自分自身で食餌することができない。各々のネコを長期間繰り返し治療する。治療期間中、腫瘍の写真を毎日取り、続いて再チェックする。治療後、各ネコを他のCTスキャンにかける。CTスキャンと胸部放射線写真を、その後8週間毎に評価する。データは、コントロールグループに対し、生存率、反応性及び毒性において異なっていると評価した。ポジティブ反応は、好ましくは生存の質の改善及び/又はライフスパンの増加を伴う腫瘍退行の証拠を必要とする。

さらに、イヌ、ネコ及びヒヒ他の自発的動物腫瘍、例えば繊維肉腫、腺癌、リンパ腫、軟骨腫、又は平滑筋肉腫もテストすることができる。もちろん、イヌ及びネコの乳房腺癌は好ましいモデルであり、その外観及び性質はヒトのものと非常に似ている。しかし、このモデルの使用は動物におけるこの種の腫瘍の発生が希なために制限される。

また当該分野で周知の他のインビトロ及びインビボ心臓血管、内皮及び血管形成試験もここで適切である。

#### 【0105】

##### i i . 組織分布

さらなる研究、例えば種々のヒト組織におけるmRNA発現を測定することに

より、ここで心臓血管、内皮及び血管形成アッセイの結果を証明することができる。

上述したように、種々の組織における遺伝子の増幅及び/又は遺伝子の発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンブロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンブロット法(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980))、ドットブロット法(DNA分析)、又はインサイトハイブリッド形成法によって測定することができる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。

あるいは、種々の組織における遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び/又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列PRO364又はPRO175ポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はPRO364又はPRO175DNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。抗体生産のための一般的な技術、及びインサイト-ハイブリッド形成のための特別なプロトコルは以下に提供する。

#### 【0106】

##### iii. 抗体結合性の研究

心臓血管、内皮及び血管形成アッセイに使用される内皮細胞又は他の細胞におけるPRO364又はPRO175ポリペプチドの効果を阻害する抗-PRO364又は-PRO175抗体の能力を試験する、心臓血管、内皮及び血管形成研究の結果は、抗体結合性を研究することで証明することができる。抗体の例としては、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロ抱合体抗体が含まれ、その調製は以下に記載する。

抗体結合性の研究は任意の周知のアッセイ方法、例えば競合結合アッセイ、直

接及び間接サンドイッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイ等で行われうる。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, (CRC Press, Inc. 1987) p. 147-158。

競合結合アッセイは、有限量の抗体との結合における、試験用サンプルに対して競合する標識された標準体の能力による。試験用サンプル中の標的タンパク質の量は、抗体が結合する標準体の量に対して逆比例する。結合する標準体の量の測定を容易にするため、好ましくは抗体は競合の前後に不溶化され、抗体に結合する分析物及び標準体は、便宜上、結合しないで残存する標準体及び分析物から分離する。

サンドイッチアッセイでは、検出される互いに異なる免疫原部分、又はエピトープ、又はタンパク質に結合可能な2つの抗体が使用される。サンドイッチアッセイにおいて、分析されるテスト用サンプルは、固体支持体に固定化された第1の抗体に結合し、その後、第2の抗体が分析物に結合し、よって不溶性の3部位複合体が形成される。例えば、米国特許第4,376,100号を参照されたい。第2の抗体は検出可能な部分で、それ自身が標識されてもよく(直接サンドイッチアッセイ)、又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使用して測定してもよい(間接サンドイッチアッセイ)。例えば、一方の種類のサンドイッチアッセイはELISAアッセイであり、この場合、検出可能な部分は酵素である。

免疫組織化学において、組織サンプルは新鮮なものでも凍結されていても、パラフィンに埋設されていてもよく、防腐剤、例えばホルマリンで固定されていてもよい。

#### 【0107】

##### i v . 細胞ベースの腫瘍アッセイ

心臓血管、内皮及び血管形成疾患、例えば腫瘍のための細胞ベースのアッセイ及び動物モデルは、ここで心臓血管、内皮及び血管形成アッセイの知見を立証し、さらに、ここで同定された遺伝子と所望しない心臓血管、内皮及び血管形成細胞成長の進行及び病因との関係を理解するために使用可能である。所望しない心臓血管、内皮及び血管形成細胞成長、例えば腫瘍の進行及び病因におけるここで同定された遺伝子産物の役割は、PRO364又はPRO175ポリペプチドに

より刺激又は阻害されると同定された細胞又は細胞系を使用して試験することができる。このような細胞には、例えば以下の実施例に示すものが含まれる。

異なるアプローチにおいて、特定の心臓血管、内皮及び血管形成疾患に係る周知の細胞種の細胞を、cDNAを用いて形質移入し、これらのcDNAが過度の成長を誘発するか、又は成長を阻害する能力を分析する。心臓血管、内皮及び血管形成疾患が癌である場合、適切な腫瘍細胞には、例えば安定腫瘍細胞系、例えばB104-1細胞系(neu原腫瘍遺伝子で形質移入された安定NIH-3T3細胞系)及びras-形質移入NIH-3T3細胞が含まれ、これらは所望する遺伝子を形質移入することができ、腫瘍形成成長を監視することができる。ついで、このような形質移入細胞系を使用し、ポリ-又はモノクローナル抗体又は抗体組成物が、形質移入細胞の成長における細胞増殖抑制又は細胞毒性活性を働かせることによる、又は抗体-依存性細胞性細胞毒性(ADCC)を媒介することによる腫瘍形成細胞成長を阻害する能力をテストする。さらに、ここで同定された遺伝子のコード化配列で形質移入された細胞を、心臓血管、内皮及び血管形成疾患、例えば癌の治療用の候補薬を同定するのに使用することができる。

さらに、トランスジェニック動物の腫瘍から得られた一次培地(上述に記載)を細胞ベースのアッセイに使用することができるが、安定細胞系が好ましい。トランスジェニック動物から一定の細胞系を誘導するための技術は当該分野においてよく知られている。例えばSmall等, Mol. Cell. Biol., 5: 642-648(1985)を参照されたい。

#### 【0108】

##### v. 遺伝子治療

ここで、PRO364又はPRO175ポリペプチド、及びポリペプチド性アゴニスト及びアンタゴニストは、それらのポリペプチドをインビボでの発現により本発明に従って用いてもよく、これはしばしば遺伝子治療と呼ばれる。

核酸(場合によってはベクター内に含まれたもの)を患者の細胞に入れるために：インビボ及びエキソビボという2つの主要な方法がある。インビボ送達では、核酸は、通常はPRO364又はPRO175ポリペプチドが必要とされている部位、すなわちPRO364又はPRO175ポリペプチドの合成部位、もし知

られているならばPRO364又はPRO175ポリペプチドの生物学的活性が必要とされる部位(例えば創傷)に、患者に直接注入される。エキソピボ処理では、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入し、修飾された細胞を患者に、直接、又は例えば患者に埋め込まれる多孔性膜にカプセル化して投与する(米国特許第4,892,538号及び第5,283,187号参照)。

核酸を生細胞に導入するために利用可能な種々の技術がある。これらの技術は、核酸が培養された細胞にインビトロで移入されるか、又は対象とする宿主にインピボで移入されるかに依る。哺乳動物細胞にインビトロで核酸を移入するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などを含む。形質導入は、複製欠陥、組換えウイルス(好ましくはレトロウイルス)粒子の細胞レセプターとの結合、次いで粒子に含まれる核酸の細胞への導入を含む。遺伝子のエキソピボ送達に通常用いられるベクターはレトロウイルスである。

#### 【0109】

現在インピボ核酸移入技術で好ましいのは、ウイルス又は非ウイルスベクター(アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスIウイルス、又はアデノ関連ウイルス(AAV))、及び脂質ベースの系(遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、例えば、DOTMA、DOPE、及びDC-Cholである；例えば、Tonkinson等, Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996) 参照)での形質移入を含む。遺伝子治療で使用するために最も好ましいベクターはウイルス、最も好ましくはアデノウイルス、AAV、レンチウイルス、又はレトロウイルスである。レトロウイルスベクター等のウイルスベクターは、少なくとも1つの転写プロモーター/エンハンサー又は位置決定因子、あるいは選択的スプライシング、核RNA輸出、又はメッセンジャーの翻訳後修飾などの他の手段により遺伝子発現を制御する他の因子を含む。さらに、レトロウイルスベクター等のウイルスベクターは、PRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする遺伝子の存在下で転写されたとき、それに作用可能に結合し、翻訳開始配列として機能する核酸分子を含む。このようなベクター作成物はまた、用いるウイルスに適したパッケージ

ングシグナル、末端反復配列(LTR)又はその一部、及びポジティブ及びネガティブストランドプライマー結合部位を含む(これらがウイルスベクターに既に存在しない場合)。さらに、これらのベクターは、典型的には、それらが配置される宿主細胞からPRO364又はPRO175ポリペプチドを分泌させるシグナル配列を含む。好ましくは、この目的のためのシグナル配列は哺乳動物シグナル配列、最も好ましくはPRO364又はPRO175ポリペプチドのための天然シグナル配列である。場合によっては、ベクター作成物は、ポリアデニル化を指示するシグナル並びに一又は複数の制限部位及び翻訳終結配列も含む。例として、このようなベクターは典型的には5'LTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、第二鎖DNA合成の開始点、及び3'LTR又はその一部を含む。非ウイルスの他のベクター、例えばカチオン性脂質、ポリリジン、及びデンドリマーを用いることもできる。

#### 【0110】

幾つかの状況では、核酸供給源に標的細胞をターゲティングする試薬、例えば細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターのリガンドなどを供給するのが望ましい。リポソームが用いられる場合、エンドサイトーシスに伴う細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質が、ターゲティング及び/又は取り込みの促進のために用いられ、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクリングにおいて内部移行を受けるタンパク質の抗体、及び細胞内局在化をターゲティングし細胞内半減期を向上させるタンパク質である。レセプター媒介エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wu等、*J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432 (1987); 及びWagner等、*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 3410-3414 (1990)に記載されている。現在知られている遺伝子マーキング及び遺伝子治療プロトコールの概説については、Anderson等、*Science*, 256:808-813 (1992)を参照のこと。また、WO 93/25673及びそこに引用された参考文献も参照。

好適な遺伝子治療及びレトロウイルス粒子及び構造タンパク質の作成方法は、米国特許第5,681,746号に見出される。

#### 【0111】

#### v i . 診断法としての遺伝子の用途

また本発明は、診断法としてのPRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする遺伝子の用途に関する。PRO364又はPRO175ポリペプチド中の変異体は腫瘍の原因であるため、変異した形態のPRO364又はPRO175ポリペプチドの検出は、心臓血管、内皮及び血管形成疾患、又は心臓血管、内皮及び血管形成疾患、例えば腫瘍への感染性の診断を可能にする。

ヒトPRO364又はヒトPRO175ポリペプチドをコードする遺伝子に変異体を持つ個人は、種々の技術でDNAレベルが検出される。診断用の核酸は患者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織バイオプシー、及び検屍物質から得ることができる。ゲノムDNAは、分析の前にPCRを使用して酵素的に増幅させる(Saiki等, Nature, 324: 163-166(1986))か、又は直接検出に使用することができる。RNA又はcDNAは同じ目的のために使用することができる。例として、PRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする核酸に相補的なPCRプライマーを、PRO364又はPRO175ポリペプチド変異体の同定及び分析に使用することができる。例えば、欠失及び挿入は正常な遺伝子型と比較した増幅産物の大きさの変化により検出することができる。ポイントミューテーションは、PRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする放射能標識されたRNA、又はPRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする放射能標識されたアンチセンスDNA配列に対し、増幅DNAをハイブリッド形成させることにより同定することができる。好ましい適合配列はRNアーゼA消化又は溶解温度の相違により非適合二重鎖と区別することができる。

#### 【0112】

DNA配列の相違に基づく遺伝子試験は、変性剤有又は無のゲル中でのDNA断片の電気泳動移動度の変化を検出することにより達成される。小配列の欠失及び挿入は高解像度のゲル電気泳動により可視化することができる。異なる配列のDNA断片は、変性ホルムアミジン勾配ゲルにおいて区別され、異なるDNA断片の移動は、特定の溶解又は部分的な溶解温度により、ゲルの異なる位置で阻害される。例えば、Myers等, Science, 230: 1242(1985)。

また特定の位置における配列変化はヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばRNア

ーゼ及びS I保護、又は化学的切断方法、例えばCotton等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85 : 4397-4401(1985)により明らかになる。

よって、特定のDNA配列の欠失はハイブリッド形成、RNアーゼ保護、化学的切断、直接DNA配列化、又は制限酵素の使用、例えば制限断片長多型(RFLP)、及びゲノムDNAのサザンブロット等の方法により達成することができる。

#### 【0113】

v i i . PRO364又はPRO175ポリペプチドレベル検出のための用途

より一般的なゲル電気泳動及びDNA配列決定に加えて、変異はインサイツ分析で検出することもできる。

PRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする核酸の発現は、腫瘍形成に関連した血管の病気又は新血管新生に関係している。PRO364又はPRO175ポリペプチドがシグナル配列を有している場合は、mRNAは平滑筋細胞では少ないのに対して内皮細胞では高度に発現しており、このことはPRO364又はPRO175ポリペプチドが血清中に存在していることを示している。従って、このPRO364又はPRO175ポリペプチドのレベルの変化が腫瘍形成に関連した血管の病気、又は新血管新生であることを示しているために、抗-PRO364又は-PRO175ポリペプチド抗体は、このような疾患の診断に使用することができる。

PRO364又はPRO175ポリペプチドに特異的な抗体を固体支持体に付着させ、標識されたPRO364又はPRO175ポリペプチド及び宿主から誘導されたサンプルを固体支持体上を通過させる競合アッセイを使用することもでき、固体支持体に付着された検出される標識の量がサンプル中のPRO364又はPRO175ポリペプチドの量と相関関係がありうる。

#### 【0114】

v i i i . 染色体マッピング

また、本発明の配列は染色体同定に対して価値がある。配列は特異的に標的とされ、個人のヒト染色体の特定の位置にハイブリッド形成させることができる。

さらに、染色体の特定の部位を同定する必要性が現在ある。実際の配列データ(反復多型性)に基づいたいくつかの染色体マーキング試薬は、現在、染色体位置のマーキングに利用できる。本発明の染色体のDNAマッピングは、病気に関連した遺伝子にその配列を相関させる際の重要な第1段階である。

簡単に言えば、配列はcDNAからPCRプライマー(好ましくは15-25塩基対)を調製することにより、染色体にマッピングすることができる。3'-非翻訳領域のコンピュータ分析を使用すると、ゲノムDNAの一エクソン以上のスパンではないプライマーが素早く選択され、よって増幅プロセスがより複雑になる。これらのプライマーを、次に、個々のヒト染色体を含有する体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングに使用する。プライマーに対応するヒト遺伝子を含有するハイブリッドのみが、増幅断片を作成するであろう。

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の染色体に特定のDNAを割り当てるための迅速な手順である。本発明において同様のオリゴヌクレオチドプライマーを本発明で使用すると、サブ局所限定を、類似した方法で、大きなゲノムクローンのプール又は特定の染色体からの断片のパネルで達成することができる。同様に、その染色体へのマッピングに使用可能な他のマッピング方法には、インサイツハイブリッド形成、標識されたフローソート染色体を用いたプレスクリーニング、及び染色体特異性cDNAライブラリーを組み立てるためのハイブリッド形成によるプレ選択が含まれる。

#### 【0115】

中期染色体展開へのcDNAクローンの蛍光インサイツハイブリッド形成(FISH)を、正確な染色体位置を一工程で提供するために使用することができる。この技術は500又は600塩基と短いcDNAで使用することができるが；2000塩基対を越える長さのクローンは、単純な検出に対して十分なシグナル強さを有する独特の染色体位置に結合する見込みが高い。FISHには、PRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする遺伝子を誘導するクローンの使用が必要であり、長くなればなる程良好になる。例えば、2000塩基対で良好であり、4000塩基対でより好ましく、4000を越えても、時間の合理的なパーセンテージの良好な結果を得るのには、おそらく必要ではない。この技術

のレビューについては、Verma等, Human Chromosomes ; a Manual of Basic Techniques(Pergamon Press, New York. 1988)を参照されたい。

一度、配列を厳密な染色体位置にマッピングすると、染色体上の配列の物理的位置は遺伝子地図データと相関付けられる。このようなデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man(Johns Hopkins University Welch Medical Libraryからオンラインで入手可能)に見出される。次に、同じ染色体領域にマッピングされる遺伝子と病気の間を連鎖アッセイにより同定する(物理的に隣接する遺伝子の共同相続)。

次に、病気に罹患した又は病気に罹患しなかった個体間のcDNA又はゲノム配列における差異を測定する必要がある。変異が病気に罹患し個体の数人又は全員に見出され、正常な個体では見出されない場合、変異は病気の原因であると思われる。

物理的マッピング及び遺伝子マッピング技術の現在の解像度によれば、病気に関連した染色体領域に厳密に位置するcDNAは、50と500潜在的原因遺伝子の間の一つである(このことは、1メガベースのマッピング解像度で、20kb当たり1遺伝子であると仮定している)。

#### 【0116】

##### ix . 候補薬のスクリーニングアッセイ

本発明は、PRO364又はPRO175ポリペプチドを模倣する(アゴニスト)又はPRO364又はPRO175ポリペプチドの効果を阻害する(アンタゴニスト)ものを同定するための化合物のスクリーニング方法も包含する。アンタゴニスト候補薬のスクリーニングアッセイは、ここに同定した遺伝子にコードされるPRO364又はPRO175ポリペプチドと結合又は複合体形成する化合物、又は他にコード化ポリペプチドと他の細胞性タンパク質との相互作用を阻害する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、それを特に小分子候補薬の同定に適したものにする、化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングに適用可能なアッセイを含む。

このアッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、免疫アッセイ、及び細胞ベースのアッセイを含む種々の方式で

実施され、それらはこの分野で良好に特徴付けされている。アンタゴニストについての全てのアッセイは、それらが候補薬をここで同定された核酸にコードされるPRO364又はPRO175ポリペプチドと、これら2つの成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間で接触させることを必要とすることにおいて共通する。

#### 【0117】

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるPRO364又はPRO175ポリペプチド又は候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をPRO364又はPRO175ポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化されるPRO364又はPRO175ポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、それを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体を使用することによって検出できる。

#### 【0118】

候補化合物が相互作用するがここに同定した遺伝子にコードされる特定のPRO364又はPRO175ポリペプチドに結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Chevray及びNathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)に開示されているようにして、F

ields及び共同研究者等(Fiels及びSong, Nature(London) 340, 245-246 (1989); Chien等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991))に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより監視することができる。酵母菌GAL4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系(一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる)は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-lacZリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット(MATCHMAKER™)は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

#### 【0119】

ここで同定されたPRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする遺伝子と細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験できる：通常は反応混合物は、遺伝子産物と細胞外又は細胞内成分を、それら2つの生成物が相互作用及び結合する条件下及び時間で含むように調製される。候補化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。さらに、プラシーボを第3の反応混合物に添加してポジティブコントロールを提供してもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は細胞外成分との結合(複合体形成)は上記のように監視される。試験化合物を含有する反応混合物ではなくコントロール反応における複合体の形成は、試験化合物が試験化合物とその結合パートナーとの相互作用を阻害することを示す。

PRO364又はPRO175ポリペプチドが同時有糸分裂促進物質ConA

の存在下で内皮細胞の増殖を刺激する能力を有している場合、スクリーニング方法の一例では、この能力の利点が利用される。特に、増殖アッセイにおいて、ヒト臍帯静脈内皮細胞を得、96-穴平底培養皿(Costar, Cambridge, MA)で培養し、細胞の増殖を容易にするのに適切な反応混合物を補い、該混合物はCon-A (Calbiochem, La Jolla, CA)を含有している。Con-A及びスクリーニングされる化合物を添加し、37℃でインキュベートした後、培養物を<sup>3</sup>Hチミジンで標識し、ガラス繊維フィルター上に収集する(pH D ; Cambridge Technology, Watertown, MA)。3媒体の平均<sup>3</sup>Hチミジン取り込み(cpm)を、液体シンチレーション計測器を使用して測定する(Beckman Instruments, Irvine, CA)。有意な<sup>3</sup>Hチミジン混入率が内皮細胞増殖の刺激において示された。

#### 【0120】

アンタゴニストを検定するために、上述したアッセイを行うが、このアッセイにおいて、PRO364又はPRO175ポリペプチドはスクリーニングされる化合物とともに添加してよく、PRO364又はPRO175ポリペプチド存在下での<sup>3</sup>Hチミジン導入を阻害する化合物の能力が、化合物がPRO364又はPRO175ポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、PRO364又はPRO175ポリペプチド及び膜結合PRO364又はPRO175ポリペプチドレセプター又は組換えレセプターを持つ潜在的アンタゴニストを、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。PRO364又はPRO175ポリペプチドは、放射活性等で標識でき、レセプターに結合したPRO364又はPRO175ポリペプチド分子の数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパンニング及びFACSソートにより同定できる。Coligan等, Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991)。好ましくは、発現クローニングが用いられ、ポリアデニル化RNAがPRO364又はPRO175ポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このRNAから生成されたcDNAライブラリーがプールに分配され、COS細胞又はPRO364又はPRO175ポリペプチド反応性でない他の細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移

入細胞を標識したPRO364又はPRO175ポリペプチドに暴露する。PRO364又はPRO175ポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフィ分析を施す。ポジティブプールを同定し、相互作用サブプール化及び再スクリーニング工程を用いてサブプールを調製して再形質移入し、結果的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

#### 【0121】

これに換わるレセプター同定のアプローチとして、標識したPRO364又はPRO175ポリペプチドをレセプター分子を発現する細胞膜又は抽出調製物に光親和性結合させることができる。架橋材料はPAGEに溶解させ、X線フィルムに露光する。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチド断片に分離し、タンパク質マイクロ配列決定を施すことができる。マイクロ配列から得たアミノ酸配列は、推定レセプターをコードする遺伝子を同定するcDNAライブラリーをスクリーニングする分解性オリゴヌクレオチドプローブの組の設計に用いられる。

アンタゴニストの他のアッセイでは、レセプターを発現する哺乳動物細胞又は膜調製物を、候補化合物の存在下で標識PRO364又はPRO175ポリペプチドとともにインキュベートする。次いで、この相互作用を促進又は阻止する化合物の能力を測定する。

心臓血管、内皮及び血管形成疾患の治療に有用な組成物には、限定するものではないが、標的遺伝子産物の活性及び/又は発現を阻害する抗体、小有機及び無機分子、ペプチド、リンペプチド、アンチセンス及びリボザイム分子、トリプルヘリックス分子が含まれる。

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンとPRO364又はPRO175ポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、単鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニスト

は、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが影響せず、それによりPRO364又はPRO175ポリペプチドの作用を競合的に阻害するPRO364又はPRO175ポリペプチドの変異形態であってもよい。

#### 【0122】

他の潜在的なPRO364又はPRO175ポリペプチドアンタゴニスト又はアゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスRNA又はDNA作成物であり、例えば、アンチセンスRNA又はDNA分子は、標的mRNAにハイブリッド形成してタンパク質翻訳を妨害することによりmRNAの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、トリプルヘリックス形成又はアンチセンスDNA又はRNAを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法はともに、ポリヌクレオチドのDNA又はRNAへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟PRO364又はPRO175ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード化部分は、約10から40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドの設計に使用される。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され(トリプルヘリックス - Lee等, Nucl. Acid Res., 6: 3073 (1979); Cooney等, Science, 241: 456 (1988); Dervan等, Science, 251: 1360 (1991)参照)、それによりPRO364又はPRO175ポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはインビボでmRNAにハイブリッド形成してmRNA分子のPRO364又はPRO175ポリペプチドへの翻訳を阻止する(アンチセンス - Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988))。上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に輸送され、アンチセンスRNA又はDNAをインビボで発現させて、PRO364又はPRO175ポリペプチドの生産を阻害することもできる。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

#### 【0123】

潜在的アンタゴニストは、PRO364又はPRO175ポリペプチドの活性

部位、レセプター結合部位、又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それによりPRO364又はPRO175リペプチドの正常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリッド形成、次いでヌクレオチド鎖切断的切断により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4: 469-471 (1994)及びPCT公開番号WO 97/33551(1997年9月18日公開)を参照されたい。

転写阻害に用いられるトリプルヘリックス形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介するトリプルヘリックス形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。さらなる詳細は、例えば、上掲のPCT公開番号WO 97/33551を参照されたい。

これらの小分子は、上記で議論したスクリーニングアッセイの一又は複数の任意のものにより及び/又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

#### 【0124】

##### x. 治療される心臓血管、内皮及び血管形成疾患の型

ここで記載された心臓血管、内皮及び血管形成アッセイにおいて活性を有し、及び/又はそれらの遺伝子産物が心臓血管系に位置することが見出されているPRO364又はPRO175ポリペプチド又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニストは、血管に影響を及ぼす全身疾患、例えば真性糖尿病を含む種々の心臓血管、内皮及び血管形成疾患において治療用途を有していると思われる。それらの治療有効性は、動脈、毛細管、静脈、及び/又はリンパ管の病気を含みうる。以下治療例には、筋肉消耗病治療、骨粗鬆症治療、移植周囲の細胞成長を刺激する

ための移植固定補助、よってその意図する部位への結合を容易にするもの、組織又は血清中のIGF安定性の増加、適切であるならば、IGFレセプターへの結合性の増加(IGFがヒト骨髄赤血球及び顆粒球原種細胞の成長を高めることが、インビトロで示されているため)が含まれる。

また、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストは、赤血球生成又は顆粒球生成を刺激し、傷の治癒及び組織の再生を刺激し、組織、例えば結合組織、皮膚、骨、軟骨、筋肉、肺又は腎臓の再成長に関連した治療に関連し、血管形成の促進、内皮細胞の移動を刺激又は阻害、及び血管平滑筋の成長及び内皮細胞生成を高めるために使用することができる。PRO364又はPRO175ポリペプチド又はアンタゴニストにより媒介される血管形成の増加は、虚血組織と冠動脈狭窄に続く心臓の側枝冠動脈に有益である。アンタゴニストはこのようなポリペプチドの作用を阻害し、PRO364又はPRO175ポリペプチドがこのような生成を促進するならば、例えば傷の治癒又は胚線維症の間に、過度の結合組織の生成を制限するために使用される。これには急性心筋梗塞及び心不全が含まれる。

#### 【0125】

さらに、本発明は、原因にかかわらず、治療的有効量のPRO364又はPRO175ポリペプチド、又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニストを投与することによる、心臓肥大の治療に関する。目的がヒト患者の治療である場合、PRO364又はPRO175ポリペプチドは、好ましくは組換えヒトPRO364又はPRO175ポリペプチド(rhPRO364又はPRO175ポリペプチド)である。心臓肥大の治療は、心筋梗塞、高血圧、肥大性心筋症、及び心臓弁逆流を含む、多種多様な病状の結果おける、その種々の段階の任意において行うことができる。治療は、根本にある心疾患にかかわらず、心筋の構造的ダメージを有するか又は有さない、心臓肥大の進行の全ての段階に広げることができる。

分子のアンタゴニストと異なり、特定の適応に対し、分子それ自身又はそのアゴニストを使用するか否かの決定は、主として、分子が心血管形成、内皮細胞の発生、又は血管形成を促進する、又はこれらの病状を阻害するか否かに依存する。例えば、分子が血管形成を促進する場合は、そのアンタゴニストは血管形成の

制限又は防止が所望されている疾患の治療に有用である。このような疾病の例には、血管腫瘍、例えば血管腫、腫瘍血管形成、網膜の新血管新生、糖尿病性網膜症又は時期尚早の幼児性網膜症又は黄斑変性及び増殖性硝子体網膜症に関連した脈絡膜又は角膜、慢性関節リュウマチ、クローン病、アテローム性動脈硬化、卵巣過剰刺激、乾癬、新血管新生に関連した子宮内膜症、気球血管形成に続く再狭窄、癒痕組織過剰生成、例えば外科手術の後の形成されるケロイドのようなもの、心筋梗塞の後の線維症、又は胚線維症に関連した線維症障害が含まれる。

しかし、分子が血管形成を阻害するならば、上述した病状の治療に直接使用されることが期待される。

#### 【0126】

他方、分子が血管形成を刺激する場合、それ自体(又はそのアゴニスト)が、例えば末梢血管病、高血圧、血管炎、レーノー病及びレーノー現象、動脈瘤、及び動脈再狭窄、血栓静脈炎、リンパ管炎、リンパ浮腫、創傷治癒及び組織の修復、虚血再灌流傷害、アンギナ、心筋梗塞、例えば急性心筋梗塞、慢性心疾患、心不全、例えば鬱血性心不全、及び骨粗鬆症等のように血管形成が望まれる適応に対して使用される。

しかし、分子が血管形成を阻害するならば、そのアンタゴニストが血管形成が所望される病状の治療に使用される。

ここでのPRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストが疾患の予防、又は治療のための治療標的として、又は標的とする血管関連剤に有用なものとなる特定のタイプの病気を以下に記載する。アテローム性動脈硬化は、体液の蓄積、平滑筋細胞の増殖、及び動脈壁内の繊維組織の形成により、動脈内の厚みが増した脈管内膜にプラークが蓄積することにより特徴付けられる病気である。病気は、任意の器官において大、中及び小動脈を襲う。内皮及び血管平滑筋細胞機能の変化は、これらのプラークの蓄積及び緩和を調節する、重要な役割を担っていることが知られている。

高血圧は全身性動脈、肺動脈、又は門脈系において血圧が上昇することにより特徴付けられる。上昇した血圧は、欠陥のある内皮機能及び/又は血管病に帰着するか、又はこれらに起因する。

## 【0127】

血管炎には、巨大細胞動脈炎、タカヤス動脈炎、多発性結節性動脈炎(細小血管障害形態を含む)、カワサキ病、微小多発性血管炎、ウェゲナー肉芽腫症、種々の感染症関連の血管疾患(Henoch-Schonlein紫斑病を含む)が含まれる。変更内皮細胞機能はこれらの病気において重要であることが示されている。

レーノー病及びレーノー現象は、冷気にさらされた手足を通して、循環の間欠性異常欠陥により特徴付けられるものである。変更内皮細胞機能がこれらの病気において重要であることが示されている。

動脈瘤は、変更内皮細胞及び/又は血管平滑筋細胞に関連した動脈又は静脈樹状分の嚢状又は紡錘状拡張症である。

動脈再狭窄(動脈壁再狭窄)は、内皮及び血管平滑筋細胞の増殖及び機能の変更の結果として血管形成に続いて生じる。

血栓静脈炎は及びリンパ管炎は静脈及びリンパ管の炎症性疾患であり、それぞれ内皮細胞機能の変更に帰着するか、及び/又は起因する。同様に、リンパ浮腫は内皮細胞機能からのリンパ管の欠陥に関連した病状である。

良性及び悪性血管腫瘍のファミリーは、血管系の細胞エレメントの異常な増殖及び成長により特徴付けられる。例えば、リンパ管腫は、先天的で、しばしば膀胱のリンパ系の良性腫瘍、通常新生児に生じるリンパの奇形である。膀胱腫瘍は隣接した組織内で成長する傾向にある。膀胱腫瘍は、通常、子宮頸部及び腋窩領域に生じる。また、それらは四肢の軟組織でも生じる。主たる徴候は膨張であり、時折、網状に構造化されたリンパ及び結合組織に囲まれたリンパ嚢胞である。リンパ管腫は、胎性リンパ管又はそれらの欠失に不適當に結合することに起因すると仮定されている。結果は局所的にリンパドレナージュを害している。Griener等, *Lymphology*, 4: 140-144 (1971)。

## 【0128】

ここでのPRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストの他の用途は、成長及び/又は転移可能な腫瘍の血管新生に関与する腫瘍血管形成にある。このプロセスは新しい血管の成長に依存する。新生物及び腫瘍血管形成に係る関連した病状の例には、乳癌腫、肺癌腫、胃癌腫、食道癌腫、結腸直腸

癌腫、肝臓癌腫、卵巣癌腫、テコーム、男性胚腫、子宮頸部癌腫、子宮内膜癌腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、繊維肉腫、絨毛癌、頭部及び首部の癌、鼻咽腔癌腫、喉頭癌腫、肝臓芽腫、カボジ肉腫、黒色腫、皮膚癌腫、血管腫、海面性血管腫、血管芽腫、膵臓癌腫、網膜癌腫、星状細胞腫、膠芽腫、シュワン細胞腫、乏突起膠細胞腫、髓芽腫、神経芽腫、横紋筋肉腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、尿路肉腫、甲状腺癌腫、ウィルムス腫瘍、腎細胞癌腫、前立腺癌腫、母斑症 (phakomatoses) に関連した異常な血管増殖、浮腫(例えば脳腫瘍に関連したもの)、及びMeigs症候群が含まれる。

加齢性黄斑変性(AMD)は年輩者の集団における、ひどい視覚損失に至る原因である。AMDの滲出形態は脈絡膜新血管新生及び網膜色素内皮細胞剥離により特徴付けられる。脈絡膜新血管新生が予後の動的低下に関連しているため、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそれらのアンタゴニストは、重症のAMDを低減させるのに有用であることが期待される。

#### 【0129】

また、外傷の治癒、例えば傷の治癒及び組織の修復は、ここでのPRO364又はPRO175ポリペプチド又はそれらのアンタゴニストが目的とする用途である。新しい血管の形成及び緩和は、本質的に組織の治癒及び修復である。この範疇には、骨、軟骨、腱、靭帯、及び/又は神経組織の成長又は再生、並びに傷の治癒及び組織の再生及び交換、及び火傷、切断、及び潰瘍の治療が含まれる。骨が正常に形成されない環境で軟骨及び/又は骨の成長を誘発するPRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストは、骨折及び軟骨のダメージ、又はヒト及び他の動物の欠損の治療に適用される。PRO364又はPRO175ポリペプチドまたはそのアンタゴニストを使用するこのような調製物は、骨折の低減及び人工関節の固定の改善において予防的に使用される。骨形成剤により誘発される新たな骨の形成は、先天的、外傷誘発性、又は腫瘍学的、切除誘発性頭蓋欠損の修復に寄与し、また美容形成外科においても有用である。

さらに、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストは、限定するものではないが、圧迫潰瘍、血管不全に関連した潰瘍、外科的又は外傷的な傷等を含む治癒していない傷を、より良好により早く閉塞させることを

促進させるのに有用である。

またさらに、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストは、他の組織、例えば器官(例えば、脾臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚又は内皮を含む)、筋肉(平滑筋、骨格筋又は心筋)、及び血管(血管内皮を含む)組織の生成又は再生、又はこのような組織を含む細胞成長の促進活性を示し得る。所望の効果の一部は、線維性癒痕化を阻害又は調節して、正常な組織を再生することである。

#### 【0130】

またここでのPRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストは、全身的サイトカインダメージからの病状、及び種々の組織における傷の再灌流、肺又は肝臓線維症の治療、及び再生又は保護に有用である。また、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストは、先駆組織又は細胞からの上述した組織の分化を促進又は阻害、又は上述した組織の成長を阻害するのに有用である。

さらに、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストは歯周病の治療及び他の歯修復プロセスに使用することができる。このような薬剤は骨形成細胞を誘引し、骨形成細胞の成長を刺激し、又は骨形成細胞の原種の分化を誘発する環境で提供される。ここでのPRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストは、血管が、骨の回転及び成長の調節において重要な役割を担っているため、骨粗鬆症又は骨関節症の、例えば骨及び/又は軟骨修復を刺激、又は炎症プロセスにより媒介される組織破壊(コラゲナーゼ活性、破骨細胞等)のプロセス又は炎症をブロックすることによる治療に有用である。

ここでPRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストにあるとされる組織再生活性の他の範疇は、腱/靭帯形成である。組織が通常形成されない環境での腱/靭帯様組織又は他の組織形成を誘発するタンパク質は、ヒト及び他の動物の腱又は靭帯の裂け目、奇形、及びの腱又は靭帯の欠損の治療に適用される。このような調製物は、腱又は靭帯組織へのダメージの予防、並びに腱又は靭帯の骨又は他の組織への固定の改善、及び腱又は靭帯組織の欠損の修復

において予防的に使用される。ここでのPRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストの組成物により誘発される新しい腱/靭帯様組織形成は、先天的、外傷誘発性、又は他の由来による腱又は靭帯のたの欠損の修復に寄与し、また腱又は靭帯の取り付け又は修復のための美容形成外科においても有用である。ここでの組成物は、腱-又は靭帯-形成細胞を誘引、腱-又は靭帯-形成細胞の成長を刺激、腱-又は靭帯-形成細胞原種の分化を誘発、又はイクスピボでの回復、インビボでの組織修復効果における腱/靭帯細胞又は原種の成長を誘発する環境で提供される。また、ここでの組成物は、腱炎、手根管症候群、及び他の腱又は靭帯欠損にも有用である。さらに組成物は、当該分野でよく知られている担体と同じ適切なマトリクス及び/又は金属イオン封鎖剤を含む。

#### 【0131】

PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストは神経細胞の増殖、及び神経及び脳組織の再生、すなわち神経細胞又は神経組織の変性、死亡又は外傷に關与する中枢及び末梢神経系の病気及び神経障害、並びに機械的又は外傷的疾患の治療に有用である。特に、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストは、末梢神経系の病気、例えば末梢神経損傷、末梢神経障害及び局所的神経障害、及び中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、及びシャイ・ドレーガー症候群の治療に使用される。本発明で治療されるさらなる病状には、機械的又は外傷的疾患、例えば脊髄疾患、頭部外傷及び脳血管疾患、例えば脳卒中が含まれる。また、化学療法又は他の医学的療法の結果による末梢神経障害も、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそれに対するアンタゴニストを使用しての治療が可能である。

虚血-再灌流傷害は他の徴候である。内皮細胞機能不全は虚血-再灌流傷害に続いて生じる事象の後遺症の開始及び調節の両方において重要である。

慢性関節リュウマチはさらなる徴候である。血管成長及び脈管構造を通過する炎症細胞の標的は、関節炎のリュウマチ様及び血清ネガティブの形態の病因の重要な要因である。

#### 【0132】

また、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストは、病状の進行の防止、無症候性の患者の死を含む急死の回避のために、心臓肥大を有する患者に予防的に投与される。このような予防的治療は大きな左心室心臓肥大(成人においては最大壁厚が35mm又はそれ以上、又は子供においてはそれに匹敵する値)であると診断された患者のケース、又は心臓における血管腫の負荷が特に強くなった場合の例において、特に正当化される。

さらにPRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストは、肥大性心筋症と診断された患者のかなりの部分に発現する、心房細動の治療に有用である。

さらなる徴候には、アンギナ、心筋梗塞、例えば急性心筋梗塞、及び心不全、例えば鬱血性心不全が含まれる。さらなる、非新生物病状には乾癬、糖尿病、及び時期尚早の網膜症、水晶体後方繊維増殖症、新血管緑内障を含む他の増殖性網膜症、甲状腺過形成(グレーブス病を含む)、角膜及び他の組織の移植、慢性的炎症、肺炎、ネフローゼ症候群、子癇前症、腹水、心膜滲出(例えば心膜炎に関連するもの)、及び胸膜滲出が含まれる。

上述した観点から、内皮細胞機能、増殖及び/又は形態を変更又はこれに衝撃を与えると示されている、ここで記載されたPRO364又はPRO175ポリペプチド、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストは、上述した多くの又は全ての疾患の原因及び病因において重要な役割を担っており、これらの疾患を標的とする血管関連剤、又はこれらのプロセスを増大又は阻害するための治療標的として提供可能であると思われる。

### 【0133】

#### x i . 投与プロトコール、スケジュール、用量及び製剤

ここに記載された分子及びそれらのアゴニスト及びアンタゴニストは、上述した種々の疾患及び病気の予防及び治療薬として製薬的に有用である。

PRO364又はPRO175ポリペプチド又はアゴニスト又はアンタゴニストの治療用組成物は、適当な純度を持つ所望の分子を任意の製薬的に許容される担体、賦形剤、又は安定化剤(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A.編, (1980))と、凍結乾燥した製剤又は水溶液の形態で混合する

ことにより調製することができる。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる投与量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンザルコニウムクロライド；ベンゼトニウムクロライド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール)；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体)；及びノ又はTWEEN™、PLURONICS™又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。

#### 【0134】

このような担体の更なる例は、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミン、緩衝物質、例えばリン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、塩、又は電解質、例えば硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイダルシリカ、マグネシウムトリシリケート、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質、及びプロピレングリコールを含む。局所用の担体又はアンタゴニストのゲルベースの形態は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース又はメチルセルロース等の多糖類、ポリビニルピロリドン、ポリアクリレート、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロックコポリマー、ポリエチレングリコール、及びモクロウアルコールを含む。あらゆる投与について、従来のデポー形態が好適に用いられる。このような形態は、例えば、マイクロカプセル、ナノ-カプセル

、リポソーム、硬膏剤、吸入形態、鼻スプレー、舌下錠剤、及び除放射性製剤を含む。PRO230、PRO216、又はPRO302ポリペプチド又はアゴニスト又はアンタゴニストは、典型的にはそのような媒体中に約0.1mg/mlから100mg/mlの濃度で処方される。

【0135】

他の調製物は、形成された製品中に、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそれらのアンタゴニストを導入して含有される。このような製品は内皮細胞の成長及び血管形成の調節に使用することができる。加えて、腫瘍侵入及び転移をこれらの製品で調節してよい。

インビボ投与に用いられるPRO364又はPRO175ポリペプチド又はアンタゴニストは無菌でなければならない。これは、凍結乾燥及び再形成の前又は後の滅菌濾過膜を通した濾過によって容易に達成される。PRO364又はPRO175ポリペプチドは通常は凍結乾燥形態又は全身投与される場合には溶液中に貯蔵される。凍結乾燥形態にある場合、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアゴニストは典型的には使用時の適当な希釈剤を含む他の成分と組み合わせて処方される。PRO364又はPRO175ポリペプチド又はアンタゴニストの液体製剤の例は、無菌の、透明な、無色の生鮮溶液で、皮下注射用の1回投与バイアルに充填されている。繰り返し使用に適切な防腐製薬組成物は、例えばポリペプチドの種類及び適応に主として依存し、

- a) PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニスト；
- b) 溶液中のポリペプチド又は他の分子の安定性を最大にする範囲内のpH、好ましくは約4-8のpHを維持可能なバッファー；
- c) 主として、攪拌誘発性集合体に対しポリペプチド又は分子を安定化させる洗浄剤/界面活性剤；
- d) 等張剤；
- e) フェノール、ベンジルアルコール及びベンゼトニウムハロゲン化物、例えば塩化物の群から選択される防腐剤；及び
- f) 水；

を含有し得る。

#### 【0136】

使用される洗浄剤が非イオン性であるならば、それは、例えばポリソルベート(例えば、POLYSORBATE™(TWEEN™)20、80等)、ポロキサマー(例えば、POLOXAMER™188等)であってよい。非イオン性界面活性剤を使用することにより、タンパク質の変性を引き起こすことなく、表面応力の剪断に調製物をさらすことができる。さらに、このような界面活性剤含有調製物は、エアゾール装置、例えば肺投与、及びニードレスジェット注入ガンに使用されるものにおいて、使用され得る(例えば、欧州特許第257,956号を参照されたい)。

等張剤は、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストの液体組成物を確実に等浸透圧とするために存在し、多価糖アルコール、好ましくは3価又は高級糖アルコール、例えばグリセリン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール及びマンニトールが含まれる。これらの糖アルコールは、単独で、又は組合せて使用することもできる。あるいは、塩化ナトリウム又は他の適切な無機塩を、溶液を等張にするために使用してもよい。

バッファーは、所望するpHに応じて、アセタート、シタラート、スクシナート又はホスファートバッファーであってよい。本発明の液体製剤のタイプのpHは、約4から8の範囲、好ましくはほぼ生理学的pHで緩衝される。

防腐剤、フェノール、ベンジルアルコール及びベンゼトニウムハロゲン化物、例えば塩化物は、使用可能な周知の抗菌薬である。

#### 【0137】

治療用PRO364又はPRO175ポリペプチド組成物は、一般的に無菌のアクセスポートを具備する容器、例えば、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針で穿孔可能なストッパーを具備するバイアルに配される。製剤は、好ましくは繰り返し静脈内(i.v.)、皮下(s.c.)、又は筋肉内(i.m.)注射として、あるいは鼻内又は肺内送達に適したエアロゾル製剤として投与される(肺内送達については、例えば欧州特許第257,956号参照)。

また、PRO364又はPRO175ポリペプチドは持続放出製剤の形態で投与することもできる。持続放出製剤の好適な例は、タンパク質を含む固体疎水性

ポリマーの半透性マトリクスを含み、当該マトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、Langer等, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981)及びLanger, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)に記載されたようなポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール)、ポリアクチド(米国特許第3,773,919号、欧州特許第 58,481号)、L-グルタミン酸及びガンマエチル-L-グルタメートのコポリマー(Sidman等, Biopolymers, 22: 547-556 (1983))、非分解性エチレン-酢酸ビニル(Langer等, 上掲)、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLupron Depot™(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能な微小球)、及びポリ-D-( -)-3-ヒドロキシブチル酸(欧州特許第 133,988号)を含む。

#### 【0138】

エチレン-酢酸ビニルや乳酸-グリコール酸等の重合体は100日以上分子を放出できるが、特定のヒドロゲルはより短い時間タンパク質を放出する。カプセル化タンパク質は、長時間体内に残存すると、37℃で水分に曝されることで、変性又は凝集し、生理活性の喪失や免疫原性の変化のおそれがある。かかる機構によるタンパク質安定性を得るための合理的な処置が考えられる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合であることが分かったら、スルフヒドリル残基を変更し、酸性溶液から凍結乾燥し、水分量を調整し、適当な添加物を使用し、特定の重合体マトリクス化合物を開発することで安定性を達成することができる。

PRO364又はPRO175ポリペプチドの持続放出組成物は、リポソーム的に封入されたPRO364又はPRO175ポリペプチドを含む。PRO364又はPRO175ポリペプチドを含有するリポソームは、それ自体周知である方法、例えば、DE 3,218,121、Epstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985)、Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4034 (1980)；欧州特許第 52,322号；同 36,676号；同 88,046；同 143,949号；同 142,641号；日本国特許出願第83-118008号；米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号；及び欧州特許第 102,324号等による方法によって調製する。通常、リポソーム

は、脂質含有量が約30モル%以上コレステロールであり、選択される割合が最適な治療法に対して調整された微小(約200-800オングストローム)な単ラメラ状のものである。

#### 【0139】

PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストの治療的有効量は、当然のことながら、治療(予防を含む)すべき病理学的状態、投与方法、治療に用いられる化合物の型、包含される任意の同時治療、患者の年齢、体重、一般的な医学的状态、医学的履歴などの要因によって変化し、それは担当する医師の技量の範囲内で良好に決定される。従って、治療者は、最大の治療効果が得られるように、投与量を滴定し投与経路を修正する必要がある。PRO364又はPRO175ポリペプチドが狭い範囲の宿主を有しているならば、ヒトの患者の治療には、ヒトPRO364又はヒトPRO175ポリペプチド、より好ましくは天然配列ヒトPRO364又はヒトPRO175ポリペプチドを含有する調製物であることが好ましい。臨床医は投与量が当該病状の治療において所望する効果が得られるまで、PRO364又はPRO175ポリペプチドを投与するであろう。例えば、目的がCHFの治療である場合、この病状に関連した進行性心臓肥大を阻害する量とされる。この治療の進行状況は、エコーカルジオグラフィにより容易に監視される。同様に、肥大性心筋症の患者には、経験に基づいてPRO364又はPRO175ポリペプチドを投与することができる。

上記の指針では、有効投与量は、一般的に約0.001から約1.0mg/kg、好ましくは約0.01-1.0mg/kg、最も好ましくは約0.01-0.1mg/kgの範囲内である。

#### 【0140】

成人の高血圧の治療における非経口用途では、注射の形態で、体重1kg当たり約0.01から50mg、好ましくは約0.05から20mg、最も好ましくは1から20mgのPRO364又はPRO175ポリペプチドを、静脈内注射により1日に1から3回投与するのが有利である。経口投与では、PRO364又はPRO175ポリペプチドをベースとする分子を、好ましくは体重1kg当たり約5mgから1g、好ましくは約10から100mg、1日に1から3回投

与する。内毒素汚染物質は、安全レベルの最小量、例えば0.5 ng/mgタンパク質未満に保持すべきである。さらにヒト投与では、調製物は好ましくは滅菌され、発熱性であり、一般的に安全で、FDA Office and Biologics standardsで要求されるようにして精製される。

組織再生に使用されるPRO364又はPRO175ポリペプチドを含有する製薬組成物の用量計画は、ポリペプチドの作用を変える種々の要因、例えば形成が望まれる組織、ダメージを受けた部位、ダメージを受けた組織の状態、傷の大きさ、ダメージを受けた組織の種類(例えば骨)、患者の年齢、性別、食餌、感染症の重傷度、投与時間、及び他の臨床的要因を考慮して、担当する医師により決定されるであろう。用量は、再構成に使用されるマトリクスの種類、製薬組成物の他のタンパク質含有物により変わり得る。例えば、他の周知の成長因子、例えばIGF-Iを最終組成物に添加すると、さらに用量に影響を与える。進行状況は組織/骨の成長及び/又は修復を、例えばX線、組織形態測定(histomorphometric determinations)及びテトラサイクリン標識化により、定期的に評価することにより監視可能である。

#### 【0141】

PRO364又はPRO175ポリペプチド又はアンタゴニスト又はアゴニスト投与の経路は周知の方法に従い、例えば静脈内、筋肉内、脳内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、眼内、関節内、滑膜内、包膜内、経口、局所又は吸入経路による注射又は注入、あるいは以下に記載する持続放出系による。またPRO364又はPRO175ポリペプチド又はそれらのアンタゴニストは腫瘍内、腫瘍周辺、病巣内、又は病巣周辺経路で好適に投与され、局所的並びに全身に治療効果を発揮する。腹腔内経路は、例えば卵巣腫瘍の治療に特に有用であることが期待される。

ペプチド又は小分子がアンタゴニスト又はアゴニストとして使用される場合、好ましくは、液体又は固体の形態で経口的又は非経口的に哺乳動物に投与される。

塩を形成し下記において有用な分子の薬理的に許容される塩類の例には、アルカリ金属塩(例えばナトリウム塩、カリウム塩)、アルカリ土類金属塩(例えば

カルシウム塩、マグネシウム塩)、アンモニウム塩、有機塩基塩(例えばピリジン塩、トリエチルアミン塩)、無機酸塩(例えば塩酸、硫酸塩、硝酸塩)及び有機酸塩(例えば酢酸塩、シュウ酸塩、p-トルエンスルホン酸塩)が含まれる。

ここで記載され、骨、軟骨、腱、又は靭帯再生に有用な組成物における治療方法には、移植又は装置としての、局所的(topically)、全身的又は局部的(locally)な組成物の投与が含まれる。投与した場合、使用される治療用組成物は、発熱物質を含有しない生理学的に許容される形態である。さらに組成物は、骨、軟骨又は組織のダメージ部位に送達される粘性のある形態で注射されるかカプセル化されることが望ましい。局所的投与は傷の治癒及び組織の修復に適している。好ましくは、骨及び/又は軟骨の形成のためには、組成物は、骨及び/又は軟骨のダメージ部位にタンパク質含有組成物を送達せしめ、好ましくは体内に再吸収可能な骨及び軟骨を発育する構造体を提供することのできるマトリクスを含む。このようなマトリクスは他の移植医療用途に使用される材料で作成される。

#### 【0142】

マトリクス材料の選択は、生物学的融和性、生物分解性能、機械的特性、美容的外観、及び界面活性に基づく。組成物の特定の用途は、適切な処方により定義される。組成物の潜在的マトリクスは生物分解性であり、化学的に定義される硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、及びポリ無水物であってよい。他の潜在的マトリクスは生物分解性で生物学的に明確に定義された、例えば骨又は真皮コラーゲンである。さらなるマトリクスは純粋タンパク質又は細胞外マトリクス成分からなる。他の潜在的マトリクスは、非生物分解性であり、化学的に定義された、例えば焼結ヒドロキシアパタイト、生体ガラス、アルミナート、又は他のセラミックスである。マトリクスは上述した任意の種類材料、例えばポリ乳酸とヒドロキシアパタイト又はコラーゲンとリン酸三カルシウムの組合せからなるものであってもよい。生物セラミックは組成において、例えばカルシウム-アルミナート-ホスファートに変えてもよく、孔サイズ、粒子サイズ、粒子形状及び生物分解性能を変更するための加工が施されていてもよい。

特定の一実施態様では、乳酸とグリコール酸が50:50(モル重量)のコポリ

マーであり、150から180ミクロンの範囲の直径を有する多孔質粒子の形態である。いくつかの用途において、金属イオン封鎖剤、例えばカルボキシメチルセルロース、又は自己移植血塊を利用し、マトリクスからの分離から組成物を保護するのに有用である。

一好適なファミリーの金属イオン封鎖剤は、セルロース材料、例えばメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース及びカルボキシメチルセルロースを含むアルキルセルロース(ヒドロキシアルキルセルロースを含む)であり、好ましくはカルボキシメチルセルロース(CMC)のカチオン塩である。他の好ましい金属イオン封鎖剤には、ヒアルロン酸、アルギニン酸ナトリウム、ポリ(エチレングリコール)、ポリオキシエチレンオキシド、カルボキシビニルポリマー、及びポリ(ビニルアルコール)が含まれる。ここで有用な金属イオン封鎖剤の量は、調製物の全量に基づき、0.5 - 20重量%、好ましくは1 - 10重量%であり、ポリマーマトリクスからのポリペプチド(又はそのアンタゴニスト)の脱着を防止し、組成物に適切な操作性を付与し、さらに原細胞のマトリクスへの浸透を防止し、よって、ポリペプチド(又はそのアンタゴニスト)に原細胞の骨形成活性を助長する機会を付与するのに必要な量である。

#### 【0143】

##### x i i . 組合せ治療

当問題となる疾患の防止又は治療におけるPRO364又はPRO175ポリペプチド、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの効力は、同じ組成物又は別個の組成物において、これらの目的のために有効な他の薬剤と組合せるか、又は活性剤を連続して投与することにより改善される。

例えば、心臓肥大の治療のためには、PRO364又はPRO175ポリペプチド治療は、周知の心筋ミオサイト肥大因子の阻害剤、例えばフェニレフリン等の $\alpha$ -アドレナリンアゴニストの阻害剤；エンドセリン-I阻害剤、例えばBOSENTAN™及びMOXONODIN™；CT-1に対する阻害剤(米国特許第5,679,545号)；LIFに対する阻害剤；ACE阻害剤；デス-アスパラタート-アンギオテンシンI阻害剤(米国特許第5,773,415号)及びアンギオテンシンII阻害剤の投与を組合せ

ることができる。

高血圧に関連した心臓肥大の治療のためには、PRO364又はPRO175ポリペプチドを、 $\beta$ -アドレナリン様レセプターブロック剤、例えばプロプラノロール、チモロール、タータロロール、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロール、又はカーベジロール；ACE阻害剤、例えばクイナピリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル又はリシノプリル；ジウレティクス、例えばクロロチアザイド、ヒドロクロロチアザイド、ヒドロフルメタザイド、メチルクロチアザイド、ベンズチアザイド、ジクロロフェナミド、アセタゾラミド、又はインダパミド；及び/又はカルシウムチャンネルブロッカー、例えばジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル又はニカルジピンと組合せて投与することができる。一般名によりここで同定された治療薬を含有する製薬用組成物は市販されており、用量、投与方法、副作用、禁忌等の製造者の使用説明書に従い投与される。例えば、Physicians' Desk Reference (Medical Economics Data Production Co. : Montvale, N.J., 1997), 51th Editionを参照されたい。

#### 【0144】

肥大性心筋症の治療における組合せ治療用の好ましい候補薬は、 $\beta$ -アドレナリン様レセプターブロック剤(例えば、プロプラノロール、チモロール、タータロロール、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロール、又はカーベジロール)、ベラパミル、ジフェジピン、又はジルチアゼムである。高血圧を伴う肥大の治療には、カルシウムチャンネルブロッカー、例えばジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル又はニカルジピン； $\beta$ -アドレナリン様レセプターブロック剤；ジウレティクス、例えばクロロチアザイド、ヒドロクロロチアザイド、ヒドロフルメタザイド、メチルクロチアザイド、ベンズチアザイド、ジクロロフェナミド、アセタゾラミド、又はインダパミド；及び/又はACE阻害剤、例えばクイナピリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル又はリシノプリルを使用する、抗高血圧治療薬の使用が必要である。

他の徴候のために、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそれらのアンタゴニストは、当該問題における骨及び/又は軟骨欠損、傷又は組織の治療に有用な他の薬剤と組合せてもよい。このような薬剤には、種々の成長因子、例えばEGF、PDGF、TGF- $\beta$ 又はTGF- $\alpha$ 、IGF、FGF、及びCTGFが含まれる。

加えて、癌の治療に使用されるPRO364又はPRO175ポリペプチド又はそれらのアンタゴニストは、上述にて特定したような細胞毒性薬、化学治療薬又は成長阻害薬と組合せられる。また癌の治療のために、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストは適切に連続投与されるか、又は、放射活性物質の照射又は投与を含んでも含まなくても、放射線学的治療と組合せられる。

PRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアンタゴニストと組合せて投与される治療薬の有効量は、医師又は獣医の裁量による。投与量とその調節は処理される病状に最大の治療効果が達成されるようになされる。例えば、高血圧の治療においては、これらの量は、理想的には利尿薬又はジギタリスの使用、及び高血圧又は低血圧、腎損傷等を考慮に入れる。用量は、治療される特定の患者及び使用される治療薬の種類等の因子に依存する。典型的には、使用される量は、治療薬をPRO364又はPRO175ポリペプチドと共に投与しない場合と同じ用量である。

#### 【0145】

##### x i i i . 製造品

上述した疾患の診断又は治療に有用なPRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを含むキットのような製造品は、少なくとも1つの容器及びラベルを具備する。適切な容器には、例えばボトル、バイアル、シリンジ及び試験管が含まれる。容器はガラス又はプラスチックのような種々の物質から形成できる。容器は、状態の診断又は治療に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る(例えば、容器は皮下注射針で穿孔可能なストッパーを具備する静脈液バッグ又はバイアルであってよい)。組成物中の活性剤はPRO364又はPRO175ポリペプチド又はそのアゴニスト又はア

ンタゴニストである。容器上又は添付されるラベルには、組成物が選択した状態の診断又は治療に使用されることが示されている。この製造品は、製薬的に許容されるバッファー、例えばリン酸緩衝塩水、リンガー液、及びデキストロース溶液を収容した第2の容器をさらに具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用説明書を備えた包装挿入物を含む、商業的及び使用者の立場から望ましい他の材料を具備してもよい。また、この製造品は、上述の他の活性剤を収容した第2又は第3の容器を具備してもよい。

#### 【0146】

##### E. 抗体

本発明で最も有望な候補薬の幾つかは、ここで同定された遺伝子の産生又は遺伝子産物を阻害及び/又は遺伝子産物の活性を低減する抗体及び抗体断片である。

##### i. ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫化剤、及び所望するのであればアジュバントを、一又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫化剤及び/又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫化剤は、PRO364又はPRO175ポリペプチド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫化剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に抱合させるのが有用である。このような免疫原タンパク質の例は限られないが、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及び大豆トリプシン阻害剤が含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びMPL-TDMアジュバント(モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコラート)が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

#### 【0147】

##### ii. モノクローナル抗体

あるいは、抗-PRO364又は-PRO175抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature, 256:495 (1

975)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用することで調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫化剤により免疫化することで、免疫化剤に特異的に結合する抗体を生成するかあるいは生成可能なリンパ球を誘発する。また、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。

免疫化剤は、典型的にはPRO364又はPRO175ポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「PBL」)が使用され、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する。Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, (New York ; Academic Press, 1986) pp. 59-103。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髓腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髓腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠いていると、ハイブリドーマ培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプチリン及びチミジンを含み(「HAT培地」)、この物質がHGPRT欠乏性細胞の増殖を阻止する。

#### 【0148】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髓腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやバージニア州マナサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫株化細胞も開示されている。Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applicati*

ons, (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) pp. 51-63.

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、PRO364又はPRO175ポリペプチドに対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(RIA)や酵素結合免疫測定法(ELISA)等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキャッチャード分析法によって測定することができる。

#### 【0149】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを制限希釈工程によりサブクローニングし、標準的な方法で成長させることができる。Goding, 上掲。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地及びRPMI-1640培地が含まれる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として成長させることもできる。

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来免疫グロブリン精製方法によって培養培地又は腹水液から単離又は精製される。

#### 【0150】

また、モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作成することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常套的な方法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に配することができる、これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髓腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクロー

ナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより(米国特許第4,816,567号; Morrison等, 上掲)、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られてる。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するようにFc領域の任意の点で切断される。あるいは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。

一価抗体の調製にはインビトロ法がまた適している。抗体の消化による、その断片、特にFab断片の生成は、当該分野において知られている慣用的技術を使用して達成できる。

#### 【0151】

##### iii. ヒト及びヒト化抗体

抗-PRO364又は-PRO175抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はCDRの残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域

域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。Jones等, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann等, *Nature*, 332:323-329 (1988); 及びPresta, *Curr. Op Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)。

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒトを源にする一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンター(winter)及び共同研究者(Jones等, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann等, *Nature*, 332:323-329 (1988); Verhoeyen等, *Science*, 239:1534-1536 (1988))の方法に従って実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

#### 【0152】

また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリーを含むこの分野で知られた種々の技術を用いて作成することもできる。Hoogenboom及びWinter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)。また、Cole等及びBoerner等の方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる。Cole等, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss. p.77(1985)及びBoerner等, *J. Immunol.*, 147(1):86-95(1991)。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生

産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、及び次の科学文献：Marks等, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992)；Lonberg等, *Nature* 368 856-859 (1994)；Morrison, *Nature* 368, 812-813 (1994)；Fishwild等, *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)；Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996)；Lonberg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995)に記載されている。

### 【0153】

#### i v . 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本ケースの場合において、結合特異性の一方はPRO364又はPRO175に対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づく。Milstein及びCuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のWO 93/08829、及びTraunecker等, *EMBO J.*, 10:3655-3656 (1991)に開示されている。

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、CH2及びCH3領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするDNA、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入

し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作成するための更なる詳細については、例えばSuresh等, *Methods in Enzymology*, 121:210(1986)を参照されたい。

#### 【0154】

##### v . ヘテロ抱合抗体

ヘテロ抱合抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため(米国特許第4,676,980号)及びH I V感染の治療のために(WO 91/00360; WO 92/200373; 欧州特許第 03089号)提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されているものが含まれる。

#### 【0155】

##### v i . エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌治療における抗体の有効性を向上させるのが望ましい。例えば、システイン残基をF c領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させるようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上した内部移行能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存性細胞毒性(A D C C)を有しうる。Caron等, *J. Exp. Med.* 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992)参照。向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体はまた、Wolff等, *Cancer research* 53: 2560-2565 (1993)に記載されたような異種二官能性架橋を用いても調製しうる。あるいは、抗体は、2つのF c領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びA D C C能力を向上させることもできる。Stevenson等, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989)参照。

#### 【0156】

##### v i i . 免疫抱合体

本発明はまた、化学治療薬、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)などの細胞毒性薬、あるいは放射性同位体(即ち、放射性抱合)に複合された抗体を含む免疫抱合体にも関する。

このような免疫抱合体の生成に有用な化学治療薬は上記した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)タンパク質(P A P I、P A P I I、及びP A P - S)、モルディカ・チャランチア(momordica charantia)阻害剤、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)阻害剤、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)を含む。様々な放射性ヌクレオチドが放射性抱合抗体の生成に利用可能である。例として、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{131}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 及び $^{186}\text{Re}$ を含む。

抗体及び細胞毒性薬の抱合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(S P D P)、イミノチオラン(I T)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートH C L等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(例えばビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等、Science 238: 1098 (1987)に記載されたように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(M X - D T P A)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。WO 94/11026参照。

他の実施態様では、腫瘍の予備標的化で使用するために、抗体は「レセプター」(ストレプトアビジン等)に抱合されてもよく、抗体-レセプター抱合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合抱合体を循環から除去し、次に細胞毒性薬(例えば、放射性ヌクレオチド等)に抱合された「リガンド」(アビジン等)を投与する。

#### 【0157】

##### v i i i . 免疫リポソーム

また、ここに開示する抗体は、免疫リポソームとして調製してもよい。抗体を含むリポソームは、Epstein等, Proc. Natl. acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang等, Proc. natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、所定サイズの孔のフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体のFab'断片は、Martin等, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに抱合され得る。化学治療薬(ドキシソルピシン等)は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizon等, J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989)参照。

#### 【0158】

##### i x . 抗体の製薬組成物

ここで同定されるPRO364又はPRO175ポリペプチドに特異的に結合する抗体、並びに上記に開示したスクリーニングアッセイで同定された他の分子は、上記及び下記に記した種々の疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

PRO364又はPRO175ポリペプチドが細胞内であり、全抗体が阻害剤として用いられる場合、内在化抗体が好ましい。しかし、リポフェクション又は

リポソームも抗体、又は抗体断片を細胞に導入するのに使用できる。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、及び/又は組換えDNA技術によって生成できる。例えば、Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)を参照。

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に1以上の活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物はその機能を高める薬剤、例えば細胞毒性薬、サイトカイン、化学治療薬又は成長阻害剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルション中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science, 上掲に開示されている。

#### 【0159】

インピボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

持続放出製剤を調製してもよい。持続放出製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。持続放出性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸及び $\gamma$ -エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT™(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リユープロリドの注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、

ポリ-(D)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が体内に長時間残ると、それらは37%の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通した分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

#### 【0160】

##### x. 抗体を使用する治療方法

PRO364又はPRO175ポリペプチドに対する抗体を上述した種々の心臓血管、内皮及び血管形成病の治療に使用できることが予期されている。

抗体は、哺乳動物、好ましくはヒトに、周知の方法、例えば、ポラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入経路などにより投与される。抗体の静脈内投与が好ましい。

他の治療的養生法を例えば本発明の抗体の投与と組み合わせてもよい。例えば、抗体で癌の治療をする場合は、このような抗体で治療される患者は放射線治療を受けてもよい。あるいは、又はそれに加えて、患者に化学治療薬を投与してもよい。このような化学治療薬の調製法及び用量スケジュールは、製造者の指示に従って使用されるか、熟練した実務者により経験的に決定される。そのような化学治療に対する調製法及び用量スケジュールはまたChemotherapy Service M.C. Perry編, (Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992)にも記載されている。化学治療薬は、抗体の投与に先立って、又は続いて投与してもよく、あるいはそれらと同時に投与してもよい。抗体は、タモキシフェン又はEVIST<sup>TM</sup>等の抗エストロゲン化合物又はオナプリストンなどの抗プロゲステロン(欧州特許第616812号参照)の、それらの分子について知られた用量と組み合わせてもよい。

また、抗体を癌の治療に使用する場合、他の腫瘍関連抗原に対する抗体、例えば一又は複数のE r b B 2、E G F R、E r b B 3、E r b B 4、又はV E G Fレセプターに結合する抗体を投与することも好ましい。また、上述した薬剤も含む。抗体は適切に連続投与されるか、又は、放射活性物質の照射又は投与を含んでも含まなくても、放射線学的治療と組合せられる。あるいは、又はそれに加えて、ここで開示されており、同じか、又は二又はそれ以上の異なる抗原に対して結合する二又はそれ以上の抗体を、患者に同時投与してもよい。ときには、患者に一又は複数のサイトカインを投与することも有利である。好ましい実施態様では、この抗体は、成長阻害剤と同時投与される。例えば、まず成長阻害剤を投与し、続いて本発明の抗体を投与する。しかしながら、同時投与、又は本発明の抗癌剤を最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は現在用いられている量であるが、成長阻害剤とこの抗体との組み合わせ(相乗)効果により減少させ得る。

#### 【0161】

一実施態様において、腫瘍の血管新生は、組合せ治療において攻撃される。抗-P R O 3 6 4又は-P R O 1 7 5ポリペプチド抗体及び他の抗体(例えば抗-V E G F)は、例えば腫瘍又は転移病巣の壊死がみられるように決定された治療的有効量で、腫瘍を有する患者に投与される。この治療は、好ましい効果が観察されるか、又は腫瘍又は任意の転移病巣の痕跡がなくなるまで続けられる。ついで、T N Fを、補助剤、例えばアルファ-、ベータ-又はガンマ-インターフェロン、抗-H E R 2抗体、ヘレグリン(heregulin)、抗ヘレグリン抗体、D-因子、インターロイキン-1(I L - 1)、インターロイキン-2(I L - 2)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(G M - C S F)、又は腫瘍中の微細血管凝固促進剤、例えば抗-プロテインC抗体、抗-プロテインS抗体、又はC 4 b結合プロテイン(1991年2月21日公開のW091/01753)、又は熱又は放射線を単独で、又は組合せて投与する。

補助剤はその有効性に応じて変わり、便宜的な方式でスクリーニングされるマトリクスにより、腫瘍における影響力と比較することが望ましい。抗-P R O 3 6 4又は-P R O 1 7 5ポリペプチド抗体及びT N Fの投与は、所望する臨床効

果が達成されるまで繰り返される。また、抗-PRO364又は-PRO175ポリペプチド抗体は、TNF、場合によっては補助剤と共に投与される。固形腫瘍が、四肢又は一般的な循環器からの単離が可能な他の位置で見出される例では、ここに記載される治療薬は単離された腫瘍又は器官に投与される。他の実施態様において、FGF又はPDGFアンタゴニスト、例えば抗-FGF又は抗-PDGF中和剤は、抗-PRO364又は-PRO175ポリペプチド抗体と共に患者に投与される。抗-PRO364又は-PRO175ポリペプチド抗体を用いた治療は、好ましくは傷の治癒又は所望する新血管新生の期間中は中止する。

#### 【0162】

心臓血管、内皮及び血管形成疾患の予防又は治療のための、ここでの抗体の適切な用量は、上記で定義したような治療される疾患の型、疾患の重篤さ及び経過、防止又は治療目的で薬剤が投与されるか否か、従前の治療、患者の臨床履歴及び抗体に対する反応、及び主治医の裁量による。抗体は、適切には患者に一回又は一連の治療に渡って適切に投与される。

例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $50\text{mg}/\text{kg}$ (例えば、 $0.1 - 20\text{mg}/\text{kg}$ )の抗体が、例えば、1又はそれ以上の別々の投与あるいは連続注入のいずれにしても、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な1日又は1週間の用量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ 又はそれ以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。この治療の進行は、例えばX線腫瘍イメージングを含む従来の技術及びアッセイによって容易に監視される。

#### 【0163】

x i . 抗体を収容する製造品

また、抗体を収容する容器とラベルをも具備する製造品も提供される。このような製造品は上述しており、ここで活性剤は抗-PRO364又は-PRO175抗体である。

x i i . 抗体を使用する腫瘍の診断及び予知

抗体が使用される徴候が癌である場合、或る種の腫瘍で過剰発現される成長レセプター等の細胞表面タンパク質は候補薬剤又は腫瘍(例えば、癌)治療の優れた標的であるが、PRO364又はPRO175ポリペプチドと同じタンパク質は腫瘍の診断及び予知におけるさらなる用途が見出されている。例えば、PRO364又はPRO175ポリペプチドに対して向けられる抗体は腫瘍の診断及び予知に使用することができる。

例えば、抗体断片を含む抗体は、PRO364又はPRO175ポリペプチドをコードする遺伝子を含む遺伝子の発現の定性的又は定量的検出に用いることができる。抗体は、好ましくは検出可能な、例えば蛍光標識を備え、結合は光学顕微鏡、フローサイトメトリー、フルオロメトリー、又はこの分野で知られた他の技術によって監視できる。このような結合アッセイは、実質的に上述のように実施される。

マーカー遺伝子産物に結合する抗体のインサイト検出は、例えば、免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡によって実施できる。この目的のために、組織学的試料を患者から取り出し、好ましくは生物学的試料に抗体を被せることにより、標識抗体をそれに適用する。この手法はまた、試験される組織におけるマーカー遺伝子産物の分布も決定できるようにする。当業者には、インサイト検出のために広範な組織学的方法が容易に利用できることは明らかであろう。

#### 【0164】

以下の実施例は例示するためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

本明細書で引用した全ての特許及び文献の開示の全体を、出典明示によりここに取り込む。

#### (実施例)

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC登録番号により以下の実施例及び明細書を通して同定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、VAである。特に記さない限り、本発明は上記及び以下の教科書に記載されたもののような組換えDNA技術の標準的な手法を用いた：上掲のSambrook

等; Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology(Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989); Innis等, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications(Academic Press, Inc.; N.Y., 1990); Harlow等, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor 1988); Gait, Oligonucleotide Synthesis(IRL Press, Oxford, 1984); Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan等, Current Protocols in Immunology, 1991。

### 【0165】

#### 実施例1

##### ヒトPRO364をコードするcDNAクローンの単離

発現配列タグ(EST)DNAデータベース(LIFESEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA)を検索し、ポリペプチドの腫瘍壊死因子レセプター(TNFR)ファミリーのメンバーと相同性を示すEST(Incyte EST番号3003460)を同定した。

次に、BLAST(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))及び「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>)の繰り返しサイクルを用いてIncyte 3003460 EST及び他のEST配列に対してコンセンサスDNA配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでFig 3A-C中に「<consen01>」と命名した。またここでFig 3A-Cに示される「<consen01>」コンセンサス配列(配列番号: 4)を「DNA44825」と呼ぶ(Fig 4; 配列番号: 4参照)。

Fig 3-4に示されるようなDNA44825及び「<consen01>」コンセンサス配列に基づいて、1)PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリーを同定するため、及び2)PRO364の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。正方向及び逆方向PCRプライマーは一般的に20から30ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約100-1000bp長のPCR産物を与えるように設計される。プローブ配列は典型的には40-55bp長である。ある場合には、コンセンサ

ス配列が約1 - 1.5 kbpよりも大きいときに更なるオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAをAusubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、PCRプライマー対でのPCR増幅によりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いた対象とする遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

【0166】

PCRプライマー対(正方向及び逆方向)を合成した：

正方向PCRプライマー(44825.f1)：5'-CACAGCACGGGGCGATGGG-3'(配列番号：6)

正方向PCRプライマー(44825.f2)：5'-GCTCTGCGTTCTGCTCTG-3'(配列番号：11)

正方向PCRプライマー(44825.GITR.f)：5'-GGCACAGCACGGGGCGATGGGCGCGTTT-3'(配列番号：5)

逆方向PCRプライマー(44825.r1)：5'-CTGGTCACTGCCACCTTCCTGCAC-3'(配列番号：12)

逆方向PCRプライマー(44825.r2)：5'-CGCTGACCCAGGCTGAG-3'(配列番号：8)

逆方向PCRプライマー(44825.GITR.r)：5'-GAAGTCCCCGAGGCACAGTCGATACA-3'(配列番号：10)

さらに、コンセンサスDNA 44825配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリッド形成プローブ(44825.p1)：

5'-GAGGAGTGCTGTTCCGAGTGGGACTGCATGTGTGTCCAGC-3'(配列番号：9)

ハイブリッド形成プローブ(44825.GITR.p)：

5'-AGCCTGGGTCAGCGCCCCACCGGGGTCCCGGTGCGGCC-3'(配列番号：7)

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でPCR増幅した。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及び

PCRプライマーの一方を用いてPRO364遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

#### 【0167】

cDNAライブラリーの構築のためのRNAはヒト骨髄組織から単離した。cDNAクローンを単離するために用いたcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的方法によって形成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライムし、プラントでSalIヘミキナーゼ化したアダプターに結合し、NotIで分割し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター(pRKB又はpRKD等；pRK5Bは、SfiI部位を持たないpRK5Dの前駆体である；Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991)を参照されたい)に独特のXhoI及びNotI部位においてクローン化した。

前記のような単離されたクローンのDNA配列は、PRO364の全長DNA配列[ここでUNQ319(DNA47365-1206)と称される](配列番号：1)及びPRO364の誘導されたタンパク質配列を提供する。

#### 【0168】

UNQ319(DNA47365-1206)の全ヌクレオチド配列は、Fig 1(配列番号：1)に示される。クローンUNQ319(DNA47365-1206)はATCCに寄託され、ATCC寄託番号209436が付与された。クローンUNQ319(DNA47365-1206)はヌクレオチド位置121-123に見かけの転写開始部位をもつ単一のオープンリーディングフレームを含み[上掲のKozakら,]、ヌクレオチド位置844-846の終止コドンで終端する(Fig 1；配列番号：1)。予定ポリペプチド前駆体は、241アミノ酸長である(Fig 2；配列番号：3)。Fig 2に示される全長PRO364タンパク質(配列番号：3)は、見積もり分子量約26,000ダルトン及びpI約6.34を有する。潜在的なN-グリコシル化部位はFig 2(配列番号：3)に示されるアミノ酸配列のアミノ酸146-149の間にある。ヒドロパシー分析(示していない)は1型膜貫通類型を示唆し；推定のシグナル配列はアミノ酸1から25にあり、潜在的な膜貫通ドメインは、Fig 2(配列番号：3)に示される配列の

アミノ酸162から180の間にある。

全長PRO364ポリペプチドのアミノ酸配列の分析は、その一部が腫瘍壊死因子レセプターファミリーのメンバーと相同性を有することを示唆し、よってPRO364が腫瘍壊死因子レセプターファミリーの新規なメンバーであることを示している。PRO364の細胞内ドメインは、TRAF2結合に必要であることが示されたCD30レセプター内、そしてTNFR2内にも存在する最小ドメインに類似するモチーフ(Fig 2; 配列番号: 3のアミノ酸207-214の領域内)を含む[上掲のLeeら, (1996)]。TNFRファミリーに特徴的な3つの見かけの細胞外システインリッチドメインがあり[Naismith及びSprang, Trends Biochem. sci., 23: 74-79 (1998)参照]、その中で第3のCRDは、TNFRファミリーに、より典型的な4または6個のシステインではなく3つを有する。マウスGITR(以下に記載)に比較すると、マウスGITRのCRD1における5つのシステインに対してPRO364アミノ酸配列はCRD1に8個のシステインを有し、マウスGITRにおける4つの潜在的なN-結合グリコシル化部位に比較してECDに1つの潜在的N-結合グリコシル化部位が存在する。

全長天然PRO364ポリペプチドの推定アミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列の詳細な検討により、Nocentini等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6216-6221 (1997)に報告されたマウスGITR(mGITR)タンパク質との配列相同性が明らかとなる。従って、PRO364はNocentini等によって報告されたマウスGITRタンパク質のヒト対応物又は相同分子種を表していることが可能である。

#### 【0169】

### 実施例2

#### ヒトPRO175の単離

Klein等, PNAS, USA 93: 7108-7113 (1996)に記載された方法に以下の修正を加えて用いた。酵母菌形質転換は、複数回形質転換された酵母菌細胞の数を減らすために制限された量の形質転換DNAで実施した。上掲のKlein等に記載されたように、酵母菌からのプラスミドの単離に続いて大腸菌を形質転換するのではなく、単一の酵母菌集団にPCR分析を実施した。これは、最初のスクロース陽

性コロニーを新たなスクロース培地に再画線して陽性コロニーを精製することにより達成した。次いで単一の精製コロニーを以下のプライマーを用いるPCRに使用した：

TGTA AAAACGACGGCCAGTTTCTCTCAGAGAAACAAGCAAAAC (配列番号：15) 及びCAGGAAACAGCTATGACCGAAGTGGACCAAAGGTCTATCGCTA (配列番号：16)。インベルターゼ遺伝子の挿入物及び小部分を増幅し(挿入物がインベルターゼの枠内であることの決定を可能にし)、全体の配列プライマー部位に負荷するためにPCRプライマーは二連とした。

#### 【0170】

インベルターゼに融合したヒトHUV EC細胞から誘導されたcDNA断片のライブラリを酵母菌に形質転換し、形質転換体をSC-URA培地上で選択した。インベルターゼを分泌するクローンを同定するためにURA及び形質転換体をスクロース培地にレプリカプレートした。ポジティブクローンを再試験し、PCR産物を配列決定した。1つのクローン、DNA1840の配列をシグナルペプチドコード化配列を含むと同定した。DNA1840の核酸配列を用いてオリゴヌクレオチドプライマー及びプローブを設計した。ヒト臍静脈内皮細胞(HUV EC)からのcDNAの全長プラスミドライブラリを滴定し、約100,000cfuを96-穴丸底プレートに、500cfu/プールで192プールに蒔いた。プールを37℃で振盪(200rpm)させながら終夜成長させた。個々の培地にDNA1840に特異的なプローブを用いてPCRを実施した。アガロースゲル電気泳動を実施し、ポジティブウェルを予想されるサイズのバンドの可視化により同定した。各ポジティブクローンを、コロニーリフト、次いで<sup>32</sup>P-標識オリゴヌクレオチドでのハイブリッド形成により得た。これらのクローンをPCR、制限消化、及びサザンブロット分析により特徴付けした。

#### 【0171】

cDNAクローン(DNA119355)を完全に配列決定した。PRO175の核酸配列をFig5A-B(配列番号：13)に示す。クローンPRO175-1150は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置21-23に見かけの翻訳開始部位を有する[Kozak等, 上掲](Fig5;

配列番号：13)。予測されるポリペプチド前駆体は177アミノ酸長さであり、約20,308ダルトンの計算された分子量を持つ。ヒドロパシー分析により、推定細胞質領域(アミノ酸1-25)；膜貫通領域(アミノ酸26-51)；及び細胞外領域(アミノ酸52-177)を持つII型膜貫通タンパク質の類型が示唆された。2つの潜在的なN-結合グリコシル化部位は、Fig 5(配列番号：14)に示す配列の位置129(Asn)及び位置161(Asn)に特定された。クローンPRO175-1150は、ATCCに寄託され、ATCC寄託番号209466が付与されている。PRO175ポリペプチドは、寄託されたATCC209466ベクターのcDNA挿入物にコードされる分子を発現させることにより得られ又は得られうる。ベクターのXbaI及びNotI制限酵素での消化は、1411bp断片及び668bp断片を生ずるであろう。

#### 【0172】

細胞外配列の(ALIGNコンピュータプログラムを用いた)BLAST及びFastA配列アラインメント分析に基づくと、PRO175は、TNFサイトカインファミリーの幾つかのメンバーとアミノ酸配列同一性、特にヒトApo-2L(19.8%)、Fas/Apo1-リガンド(19.0%)、TNF-(20.6%)及びリンホトキシン-(17.5%)を示す。ほとんどのアミノ酸配列同一性は、TNF-の結晶構造の $\beta$ -ストランドに相当する領域に見出される[Bannerら, Cell, 73:431-435(1993); Eckら, J. Biol. Chem., 264:17595-605(1989); Lewit-Bentleyら, J. Mol. Biol., 199:389-92(1988)]。ストランドCの配列は特にファミリーの全てのメンバーで保存されている。PRO175ポリペプチドの第1の $\beta$ -ストランドと推定膜貫通ドメインとの間の配列は、TNF-、CD95L又はApo-2リガンドで約30~約80残基であるのと比較して、5残基を含むといった具合に比較的短い。

#### 【0173】

##### 実施例3

##### PRO175のノーザンプロット分析

ヒト組織及び腫瘍株化細胞におけるPRO175mRNAの発現を、ノーザンプロット分析によって試験した(Fig 8参照)。ヒトRNAプロットを、全長

PRO175 cDNAをコードするpRK5プラスミドをXba-Iで消化することにより生成したおよそ700bp長の<sup>32</sup>P標識DNAプローブにハイブリッド形成したが；このプローブは、全コード配列プラス幾つかのフランキング5'及び3'配列に相当する。

ヒト胎児、成人、又は癌株化細胞mRNAプロット(クローンテック)を、DNAプローブと共にハイブリッド形成用バッファー(5XSSPE；2Xデンハード溶液；100mg/mLの変性剪断されたサケ精子DNA；50%のホルムアミド；2%のSDS)中で、42°Cで60時間インキュベートした。プロットを2XSSC；0.05%のSDS中、室温で1時間、数回洗浄し、次いで0.1XSSC；0.1%のSDS中、50°Cで30分間洗浄した。プロットを終夜暴露した後、リン光体イメージャー分析(Fuji)により展開した。

Fig 8に示すように、約3.2kBの優勢なmRNA転写物を、胎児腎臓及び肺、及び成人小腸に検出した。また、発現は試験した8つのヒト腫瘍株化細胞中の6つでも検出され、それらは、ほぼ同じの3.2kB転写物を示し、並びに約1.5及び5kB転写物のより弱い発現も検出された。

結果は、PRO175ポリペプチドのmRNA発現が、正常組織では比較的抑制されるが、リンパ系並びに非リンパ系由来からの腫瘍株化細胞では顕著に増大することを示している。

#### 【0174】

実施例4：ヒト細胞及び組織におけるPRO364mRNAの発現を検出するアッセイ

正常ヒト組織及び癌株化細胞におけるPRO364mRNAの発現を試験するアッセイを実施した。

PRO364転写物の検出のために種々のヒト組織及び癌株化細胞(Clontech)をノーザンプロットハイブリッド形成により試験したが、全く検出されなかった。定量的逆転写酵素PCRを用いて、PRO364mRNAを、PBL、脳、骨髄、脾臓、胸腺及び肺で、そして腎臓、心臓、小腸及び肝臓組織では比較的低レベルで検出した(Fig 6参照)。相対的mRNA発現レベルを、以下のPRO364特異的プライマー及び蛍光発生プローブ：

DNA47365.tm.f - CCACTGAAACCTTGGACAGA (配列番号: 17)

DNA47365.tm.p - CCCAGTTCGGGTTTTCTCACTGTGTTCC (配列番号: 18)

DNA47365.tm.r - ACAGCGTTGTGGGTCTTGTTTC (配列番号: 19)

を用いて、Heid等, Genome Res., 6: 986-94 (1994)に本質的に記載されている Taqman装置 (ABI) を用いた定量的PCRで決定した。PCR産物の信頼性は、対応するcDNAに対するサザンブロットハイブリッド形成により確認した。発現レベルは小腸組織に対して規格化した。

#### 【0175】

別のアッセイにおいて、一次ヒトT細胞 (T細胞富化カラム (R & D Systems) を用いてドナー全血から単離) 及び単球/マクロファージ (組織培養フラスコへの接着によりドナー全血から単離) を、10% FBS及び2mMグルタミンを添加したRPMI中に保持した。次いで細胞を、PHA (1マイクログラム/ml; Sigma)、抗-CD3抗体 (1マイクログラム/ml; Pharmingen)、LPS (1マイクログラム/ml; Sigma)、TNF- $\alpha$  (1マイクログラム/ml; Pennica等, Nature, 312: 724-729 (1984)に記載されたように調製)、又は可溶性PRO175リガンド (5マイクログラム/ml) で24時間処理した。次いで相対的mRNA発現レベルを上述のTaqman手法によって分析した。発現レベルは、バッファー処理したT細胞に対して規格化した。

結果をFig 7に示す。フィットヘマグルチニン (PHA) 又は抗-CD3抗体で刺激した後、単離した血液T細胞においてPRO364mRNAの実質的アップレギュレーションが観察された。高レベルの発現は単離した単球/マクロファージで観察され、この発現はLPSによってさらに増大した (Fig 7参照)。

#### 【0176】

##### 実施例5

##### 大腸菌におけるPRO175の発現

PRO175ポリペプチドの細胞外領域 (Fig 5のアミノ酸52~177; 配列番号: 14) をコードするDNA配列 (Fig 5A-B; 配列番号13) を、各々隣接するNdeI及びXbaI制限部位を含むPCRプライマー: 正: 5' - GAC GAC AAG CAT ATG TTA GAG ACT GCT AAG GAG CCC TG -3' (配列番号: 20

) ; 逆 : 5' - TAG CAG CCG GAT CCT AGG AGA TGA ATT GGG GATT -3' (配列番号 : 21) とともに増幅した。PCRを消化し、(プラスミドから誘導された) 12 アミノ酸のエンテロキナーゼ切断部位に続くMet Gly His<sub>10</sub>配列 :

Met Gly His Ser Ser Gly His Ile Asp Asp Asp Asp Lys His Met (配列番号 : 22) の下流かつ枠内で、プラスミド pET19B (Novagen) のNdeI及びXbaI部位にクローニングした。

得られたプラスミドを、上掲のSambrook等に記載された方法を用いて、大腸菌株JM109 (ATCC 53323) を形質転換するのに用いた。形質転換体をPCRで同定した。プラスミドDNAを単離し、制限分析及びDNA配列分析により確認した。

選択したクローンを抗生物質添加の液体培養培地LB中で終夜成長させた。続いて、終夜培地を、より大規模な培養を接種するのに用いた。細胞を所定の光学密度まで成長させ、その間に発現プロモーターが作動する。

#### 【0177】

細胞をさらに数時間培養した後、遠心分離により細胞を収集した。遠心分離で得た細胞ペレットを、0.1Mトリス、0.2M NaCl、50mM EDTA、pH8.0を含むバッファー中にマイクロフリューダイザーを用いて可溶化した。可溶化したPRO175タンパク質は、ニッケル-セファロースのアフィニティクロマトグラフィを用いて精製した。

PRO175タンパク質を、SDS-PAGEで分析し、次いでニッケル複合セイヨウワサビペルオキシダーゼでのウェスタンブロット、次いでECL検出 (Boehringer Mannheim) をした。3つの優勢なタンパク質バンドが検出され、それらはタンパク質の単量体、同種二量体、及び同種三量体形態のサイズに相当する (Fig 9)。この結果に基づいて、可溶性PRO175タンパク質が、その天然形態で、SDS変性無しに同種三量体を形成できると考えられる。

#### 【0178】

##### 実施例6

PRO175のPRO364レセプターに対する結合特異性

PRO175ポリペプチド (上記実施例2、3及び5に記載) が、Nocentini

等, Proc. Natl. Acad. Sci., 94: 6216-6221 (1997)に記載されたマウスGITR (mGITR) ポリペプチドのヒト相同分子種であると信じられているPRO364と相互作用し特異的に結合するか否かを決定するためのアッセイを実施した。

結合性を試験するために、PRO364細胞外ドメイン (Fig 2; 配列番号: 3のアミノ酸1-161参照) を含む可溶性免疫グロブリン融合タンパク質 (イムノアドヘシン) を昆虫細胞で発現させた。PRO364ECDは、バキュロウイルスを用いて昆虫細胞においてC-末端IgG-Fcタグ形態として発現させた。可溶性PRO175を実施例5に上記したようにECDを発現することにより調製した。

#### 【0179】

可溶性PRO175ECD分子を、そのPRO364イムノアドヘシンと相互作用する能力を試験するために<sup>125</sup>Iで標識した。比較のため、以下のTNFレセプターファミリーメンバー: CD95、DR4、DR5、TNFR1、TNFR2、及びApo-3のイムノアドヘシン作成物も製造した。CD95、DR4、DR5、TNFR1、TNFR2、及びApo-3イムノアドヘシンは、TNFR1について既に記載されているように [Ashkenazi等, Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 10535-10539 (1991)]、各レセプターのECDをヒトIgGのヒンジ又はFc部分に融合させることにより調製した。個々のTNFレセプターファミリーメンバーは、発明部分の背景 (及び引用した関連参考文献) に記載されている。

同時沈殿アッセイのために、各イムノアドヘシン (5マイクログラム) を<sup>125</sup>I標識可溶性PRO175ポリペプチド (1マイクログラム) とともに24で1時間インキュベートした後、氷上で30分間プロテインA-セファロースをした。反応混合物を遠心沈殿させ、PBSで数回洗浄し、20mMジチオトールを含むSDS-PAGEバッファー中で煮沸し、次いでSDS-PAGEに再溶解してオートラジオグラフィを行った。

#### 【0180】

結果をFig 9に示す。分子量マーカー (kDa) の位置を図に示した。PR

O364-IgG結合は放射性ヨウ素化可溶性PRO175ポリペプチドに結合した。しかしながら、PRO364-IgGは、CD95、DR4、DR5、TNFR1、TNFR2、及びApo-3のイムノアドヘシン作成物には結合しなかった。

他のアッセイにおいて、ヒト293細胞を全長PRO175で一過的に形質移入し、PRO364、TNFR1、HVEM、及びDcR1のレセプターイムノアドヘシン作成物のこれらの形質移入細胞に結合する能力をFACS分析で決定した。293細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)、2mMグルタミン、100マイクログラム/mlペニシリン、及び100マイクログラム/mlストレプトマイシンを添加した高グルコースDMEM培地中に維持した。形質移入細胞( $1 \times 10^5$ )を、1マイクログラムの各レセプター又はリガンドイムノアドヘシンを含む200マイクロリットルの2%FBS/PBS中、4℃で60分間インキュベートした。次いで、細胞を2%のFBS/PBSで洗浄し、R-フィコエリスリン抱合ヤギ抗ヒト抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)で染色した。次に、細胞をFACSで分析した。個々のイムノアドヘシンの一過性形質移入細胞への結合性を試験するために、CD4の発現ベクター(pRK5-CD4; Smith等, Science, 328: 1704-1707 (1987))をPRO175発現ベクター(上記参照)と同時形質移入した。次いで、FACS分析における形質移入細胞集団を同定しゲートするために、FITC抱合抗CD4(Pharmingen, San Diego, CA)を用いた。

#### 【0181】

Fig 11Aに示すように、PRO364-IgGは、全長PRO175をコードする発現プラスミドで形質移入した細胞表面に特異的に結合した。このような結合は、TNFR1、HVEM又はDcR1イムノアドヘシンのいずれにも観察されなかった。PRO364-IgGはコントロールプラスミドで形質移入した細胞には結合しなかった(データは示さず)。

これらの結果は、PRO175ポリペプチドとPRO364との特異的結合性相互作用、及びPRO175ポリペプチドが試験した他のTNFレセプターファミリーメンバーのいずれとも相互作用しないことを示している。

PRO175ポリペプチドは、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)ライブラリで同定され、PRO175ポリペプチド転写物はRT-PCRによってHUVECにおいて容易に検出可能であった(データは示さず)。PRO364-IgGの特異的結合がFACS分析によりHUVECで示されるか否かを試験するためにFACS分析アッセイを実施した。HUVECはCell System(Kirkland, WA)から購入し、10%ウシ胎児血清、2mMのL-グルタミン、10mMのHepes、及び10ng/mlの塩基性FGFを含有するHam's F12と低グルコースDMEM培地との50:50混合物中で成長させた。細胞を、一次抗体としてPBS、PRO364-IgG、TNFR1-IgG又はFas-IgGでFACS選別し、ヤギ抗ヒトFab'2をフィコエリスリン(CalTag, Burlingame, CA)に抱合させた。

PRO364-IgGはHUVECに特異的に結合することが見出された。(Fig 11B参照)。Fas-IgGもTNFR1-IgGも内皮細胞に対する特異的結合性を示さなかった。

#### 【0182】

#### 実施例7

#### 染色体マッピング

ヒトPRO175遺伝子の染色体局在化を、放射性ハイブリッド(RH)パネル分析によって試験した。RHマッピングを、マウス-ヒト細胞の放射線ハイブリッドパネル(Research Genetics)及びPRO175 cDNAのコード領域に基づくプライマーを使用するPCRにより実施した[Gelb等, Hum. Genet., 98: 141 (1996)]。スタンフォードヒトゲノムセンターデータベースを使用したPCRデータの解析は、PRO175がSTSマーカーD1S2790及びゲネトンマーカーAFMb352xe9に結合し、ヒト染色体1q23にマッピングされることを示した。特記すべきは、CD95Lも染色体1q23にマッピングされるが[Takahashi等, Int. Immunol., 6: 1567-1574 (1994)]、OX40リガンドは染色体1q25にマッピングされることである[Baum等, EMBO J., 13: 3992-4001 (1994)]。従って、これらのTNFファミリーメンバーは共通の祖先遺伝子の複製及び分岐によって生じ得る。

## 【0183】

## 実施例8

## 内皮細胞における c - f o s の誘導

このアッセイはPRO364 (ヒトGITR) が内皮細胞において c - f o s を誘導する能力を示すか否を決定するために実施された。

成長培地(50%のハムのF12w/oGHT:低グルコース、及びグリシンなしの50%DMEM:NaHCO<sub>3</sub>、1%グルタミン、10mMのHEPES、10%のFBS、10ng/mlのbFGF)中のヒト静脈臍静脈内皮細胞(HUVEC, Cell Systems)を1x10<sup>4</sup>細胞/ウェルの細胞密度で96穴マイクロタイタープレートにプレーティングした。プレーティングの次の日、成長培地を除き、100μl/ウェルの無血清培地(FBS又はbFGFなしの成長培地)を加えることにより細胞を飢餓させた。24時間後、無血清培地が取り除かれた。細胞を100μl/ウェルの試験試料とコントロール(ポジティブコントロール:成長培地;陰性コントロール:10mMのHEPES、140mMのNaCl、4%(w/v)マンニトール、pH6.8)で処理した。細胞を5%CO<sub>2</sub>中で37℃において30分間インキュベートした。試料を取り除いて、bDNAキットプロトコール(Chiron Diagnostics, cat.#6005-037)の最初の部分に従った。ここで、下記の各大文字の試薬/バッファーはキットから利用可能であった。

簡単には、試験に必要なTM溶菌バッファー(TM Lysis Buffer)及びプローブの量を製造者により提供された情報に基づいて計算した。適当な量の解凍プローブをTM溶菌バッファーに添加した。捕獲ハイブリッド形成バッファー(Capture Hybridization Buffer)を室温まで温めた。bDNA条片を金属条片ホルダーにセットアップし、100μlの捕獲ハイブリッド形成バッファーを必要な各b-DNAウェルに添加し、少なくとも30分インキュベートした。細胞の入った試験プレートをインキュベータから取り除き、真空マニフォールドを使用して培地を穏やかに除いた。マイクロタイタープレートの各ウェルに100μlのプローブを伴う溶菌ハイブリッド形成バッファーをピペットで素早く添加した。ついで、プレートを15分間55℃でインキュベートした。インキュベータからの取り出し、マイクロタイターアダプターヘッドを備えたボルテックスミキサーにプレートを配し

、1分の間、#2の設定でボルテックスした。80  $\mu$ lの溶菌液を取り除き、捕獲ハイブリッド形成バッファーを含むbDNAウェルに添加し、ピペットで上下して混合した。プレートを少なくとも16時間の間53 でインキュベートした。

【0184】

次の日に、bDNAキットプロトコールの第2の部分に従った。特に、プレートをインキュベーターから取り除き、ベンチに配置して10分間冷却した。必要な添加の容積は製造者により提供された情報に基づいて計算した。ALハイブリッド形成バッファー中に1:100の希釈のアンプリファイア濃縮物(Amplifier Concentrate)(20fm/ $\mu$ l)を作成することによりアンプリファイア作用液を調製した。ハイブリッド形成混合物をプレートから除去し、洗浄剤Aで2回洗浄した。50  $\mu$ lのアンプリファイア作用液を各ウェルに添加し、ウェルを53 で30分間インキュベートした。次にプレートをインキュベーターから取り除き、10分間冷却した。標識プローブ作用液を、ALハイブリッド形成バッファー中に1:100の希釈で標識濃縮物(40pmoles/ $\mu$ l)を作成することにより調製した。10分の冷却期間後、アンプリファイアハイブリッド形成混合物を除去し、プレートを洗浄剤Aで2回洗浄した。50  $\mu$ lの標識プローブ作用液を各ウェルに添加し、ウェルを53 で15分間インキュベートした。基質溶液は、基質バッファーで基質エンハンサーを1:100に希釈することで調製される。プレートを10分間冷却し、標識ハイブリッド形成混合物を取り除き、プレートを洗浄剤Aで2回、洗浄剤Dで3回洗浄した。50  $\mu$ lのエンハンサーを伴う基質溶液を各ウェルに添加した。プレートを37 で30分間インキュベートし、RLUを適当な照度計で読みとった。

複製を平均化し変動係数を決定した。ネガティブコントロール(上述のHEPE Sバッファー)値に対する増加倍数の活性の測定は化学発光単位(RLU)によって示された。サンプルがネガティブコントロールの値に対して少なくとも2倍の値を示す場合はポジティブと考えた。

PRO364アッセイ結果:

1. ネガティブコントロール = 2.57 RLU

ポジティブコントロール = 29.57 RLU

0.01%のPRO364 = 8.60 RLU

0.1%のPRO364 = 9.66 RLU

1%のPRO364 = 3.44 RLU

2. ネガティブコントロール = 3.19 RLU

ポジティブコントロール = 18.22 RLU

0.01%のPRO364 = 3.51 RLU

0.1%のPRO364 = 4.54 RLU

1%のPRO364 = 6.98 RLU

上記のように、PRO364は、2倍ポジティブであると検定され、内皮細胞のc-fos発現を誘導するその能力を示している。

【0185】

#### 実施例9

このアッセイはPRO175 (hGLITTER) が周皮細胞においてc-fosを誘導する能力を示すか否を決定するために設計されている。

1日目に、成長培地中ウシ周皮細胞(VEC Technologies)の4つのT-25組織培養フラスコを取得した。5mlの培地以外全てを取り出し、フラスコを5%CO<sub>2</sub>、37℃のインキュベータに入れた。2日目に周皮細胞をトリプシン化し、遠心沈降させ、成長培地(20%FBS、1Xペニシリン及びストレプトマイシン及び1Xファンジゾン(fungizone)を含有する低グルコースDMEM)に再懸濁し、4つの96穴マイクロタイタープレートに蒔いた。7日目に培地を取り出し、周皮細胞を100µlの試験試料及びコントロール(アッセイ希釈液: DMEM + 5%FBS; ポジティブコントロール: DMEM + 5%血清 + / - PDGF @50ng/ml; ネガティブコントロール: タンパク質32)で処理した。細胞を5%CO<sub>2</sub>、37℃でインキュベートした。試料を取り出し、bDNAキット(Chiron)プロトコールの第1部分に従った。

c-fosのプローブをbDNAキットに含まれる溶菌バッファー(Lysis Buffer)に添加した。30分のインキュベーションの後、培地は細胞から離され、c-fosプローブを含む100µlの溶菌バッファーを各ウェルに加えた。ついで、プレートを15分間55℃でインキュベートした。この間に100µlの捕獲ハイブリッド形成バッファー(Capture Hybridization Buffer)をキットに入れられた

b-DNAプレートに添加した。15分後、細胞をインキュベーターからの取り出し、マイクロタイタープレート攪拌機で1分間、ボルテックした。85 $\mu$ lの溶菌液を取り除き、bDNAプレートの100 $\mu$ lの捕獲ハイブリッド形成バッファーに添加した。プレートを少なくとも16時間の間53 でインキュベートした。

【0186】

次の日に、bDNAキットプロトコールの第2の部分に従った。全ての試薬をキットから取り除き、室温にした。プレートをインキュベーターから取り除き、ベンチにおいて10分間冷却した。アンプリファイアー/標識プローブ希釈液でアンプリファイアーを1:100の希釈した。10分後、ハイブリッド形成混合物をプレートから取り出し、洗浄バッファーAで2回洗浄した。50 $\mu$ lの希釈したアンプリファイアーを各ウェルに添加し、プレートを53 で30分間インキュベートした。次にプレートをインキュベーターから取り除き、ベンチに配置して10分間冷却した。標識プローブを、アンプリファイアー/標識プローブ希釈液で1:100に希釈した。10分の後、アンプリファイアーを取り出し、プレートを洗浄バッファーAで2回再び洗浄した。50 $\mu$ lの希釈した標識プローブを各ウェルに添加し、プレートを53 で15分間インキュベートした。次いでプレートをインキュベーターから取り出し、10分間冷却した。ここで、アッセイに必要な各モルの基質に3 $\mu$ lの基質エンハンサーを添加して基質溶液を調製した。標識プローブ混合物をウェルから取り除き、プレートを洗浄バッファーAで2回、洗浄バッファーBで3回洗浄した。50 $\mu$ lの基質溶液を各ウェルに添加し、プレートを37 で30分間インキュベートした。プレートは、照度計を用いて化学発光を読みとった。

複製を平均化し、変動の標準偏差/係数を決定した。ネガティブコントロール(プロテイン32)値に対する増加倍数の活性の測定は、化学発光単位(RLU)によって示された。試料がネガティブコントロール値に対して少なくとも2倍の値を示す場合はポジティブと考えた。これらの分析の結果は、Fig 12に示される。

Fig 12に示されるように、PRO175は、ウシ周皮細胞でのc-fos発現の誘発においてポジティブであると分析された。

【0187】

## 材料の寄託

次の材料をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, 10801 ユニバーシティ ブルバード、マナッサス、バージニア米国(ATCC)に寄託した：

材料	ATCC寄託番号	寄託日
DNA47365-1206	ATCC209436	1997年 11月7日
DNA19355-1150	ATCC209466	1997年11月7日

これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存培養物が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、何れが最初に来ようとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条35 USC及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号8860G638の37 CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

本出願の譲受人は、寄託した材料の培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと速やかに取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの材料の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈される

ものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に変形することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

【図面の簡単な説明】

【F i g 1】 天然配列 P R O 3 6 4 c D N A (ヌクレオチド 1 2 1 - 8 4 3) の核酸配列 (配列番号 : 2) を含む核酸配列 (配列番号 : 1) を示す図であり、核酸配列 (配列番号 : 1) は、ここで「UNQ 3 1 9」及び/又は「DNA 4 7 3 6 5 - 1 2 0 6」と命名されるクローンである。また、イニシエータメチオン残基の位置を示し、並びに「4 7 3 6 5 . t m . f」、「4 7 3 6 5 . t m . p」及び「4 7 3 6 5 . t m . r」と命名される3つのオリゴヌクレオチドプライマーは下線で示した。タンパク質の推定膜貫通ドメインは図のヌクレオチド 6 0 4 - 6 6 0 でコードされる。

【F i g 2】 F i g 1 (配列番号 : 2) に示した核酸配列のヌクレオチド 1 2 1 - 8 4 3 から誘導されたアミノ酸配列 (配列番号 : 3) を示す図である。潜在的な膜貫通ドメインは図のアミノ酸 1 6 2 と 1 8 0 の間に存在しそれらを含む。

【F i g 3 A - C】 「(consen01)」と命名されるコンセンサス核酸配列 (配列番号 : 4) を示す図である。

【F i g 4】 本発明で DNA 4 4 8 2 5 (配列番号 : 4) と命名される F i g 3 A - C に示した「(consen01)」コンセンサス核酸配列を示す図である。また、「4 4 8 2 5 . G I T R . f」(配列番号 : 5)、「4 4 8 2 5 . f 1」(配列番号 : 6)、「4 4 8 2 5 . G I T R . p」(配列番号 : 7)、「4 4 8 2 5 . r 2」(配列番号 : 8)、「4 4 8 2 5 . p 1」(配列番号 : 9)、「4 4 8 2 5 . G I T R . r」(配列番号 : 1 0)、「4 4 8 2 5 . f 2」(配列番号 : 1 1) 及び「4 4 8 2 5 . r 1」(配列番号 : 1 2) の位置を下線で示した。

【F i g 5 A - B】 ここで P R O 1 7 5 - 1 1 5 0 と命名される c D N A クローンのコード核酸配列 (配列番号 : 1 3) 及び推定アミノ酸配列 (配列番号 : 1 4) を示す図である。

【F i g 6】 定量的逆転写 P C R で決定した場合の、種々のヒト細胞及び

組織におけるPRO364の相対的mRNA発現を示す図である。

【Fig 7】 定量的逆転写PCRで決定した場合の、(抗-CD3抗体、PHA又はLPSで処理した)一次ヒトT細胞及び単球におけるPRO364の相対的mRNA発現を示す図である。

【Fig 8】 ヒト組織(同定された成人及び胎児組織)及び腫瘍株化細胞(HL60前骨髄球性白血病、HeLa S3頸部癌、K562慢性骨髄性白血病、MOLT4リンパ芽球性白血病、ラージバーキットのリンパ腫、SW480結腸直腸腺癌、A549肺癌、及びG361黒色腫)でのPRO175 mRNA発現のノーザンブロット分析を示す図である。

【Fig 9】 可溶性PRO175ポリペプチドのSDS-PAGEによる分析を示す図である。

【Fig 10】 上記の実施例6に記載した同時沈殿アッセイの結果を示す図である。SDS-PAGEゲルのオートラジオグラフは、PRO364-IgG分子が放射性ヨウ素化DNA19355ポリペプチドに結合したことを明示した。結合は、表示した他のイムノアドヘシン作成物では観察されなかった。

【Fig 11A】 同定したレセプター又はリガンドイムノアドヘシン作成物への結合性について検定された形質移入293細胞のFACS分析結果を示す図である。

【Fig 11B】 同定したイムノアドヘシン作成物への結合性について検定されたHUVEC細胞のFACS分析結果を示す図である。

【Fig 12】 ヒト周皮細胞のc-fos発現におけるPRO175リガンドの影響を示した棒グラフである。

【 1 】

1 CAGCAGCTTC ACCTGGTGG GGAATCTCAG GTCATGAACG GTCCAGGCA CCTCCGGGCA GGGCGGGTGA GGACGGGAC GGGCGGTGTC CAACTGGGTG  
GTGGTGAAG TGGACCCAGC CCTAAGAGTC CAGTACTGC CAGGTTCGGT GGAGGCCCGT CCGGCCCACT CTGCCCCCTG CCGCCACAG GTTGACCCGAC

101 TGGGCTCTTG AAACCCGAGC ATGGCACAGC ACGGGGGAT GGGGGCGTTT CCGGCCCTGT GCGGCTGTCG GCGCTCAGCC TGGGTCAAGC  
ACCCGAGAAC TTTGGGTGCG TACCGTGTGCG TGCCCGGTA CCGGGGCAA GCGCGGACA CCGCGGACCG CGACGACAGC CGGAGTCCG ACCCAGTCCG  
1 M A Q H G A M G A F R A L C G L A L L C A L S L G Q R  
^MET

201 CCCACCCGGG GGTCCCGGGT GCGGCCCTGG GCGCCTCCTG CTTGGGACGG GAACGGACGG CCGCTGCTGC CGGTTTACA CGACGGCTG CTGCCGGAT  
GGGTGGCCC CCAGGGCCA CCGCGGACC CCGGGAGAC GAACCTGCG CTGTCCTGG CCGACGAGG GCCCAAGTGT GTGCGGAC GTGCGGCGTA  
28 P T G G P G C G P G R L L L G T G T D A R C C R V H T T R C C R D

301 TACCCGGGG AGGAGTGTG TTCCGAGTGG GACTGCATGT GTGTCCAGCC TGAATCCAC TGGGAGACC CTGCTGCAC GACCTGCCG CACACCCCTT  
ATGGCCCCG TCCTCAGAC AAGGCTACC CTGACGTACA CACAGTCCG ACTAAGTGC ACGCCTGCG GAACGACGTG CTGGACGGCC GTGGTGGAA  
61 Y P G E E C S E W D C M C V Q P E F H C G D P C C T T C R H H P C

401 GTCGCCAGG CCAGGGGTA CAGTCCCAGG GGAATTCAG TTTGGCTTC CAGTGTATCG GGGACCTTC TCCGGGGCC ACGAAGGGA  
CAGGGGTCC GGTCCCCCAT GTCCGGTCC CTTAAGTC AAACCGAAG GTACATAGC TGACACGGAG CCCCTGGAAG AGSCCCCGG TGCTTCCGT  
95 P P G Q G V Q S Q G K F S F G F Q C I D C A S G T F S G G H E G H ^47365.tm.f

501 CTGCAACCT TGGACAGCT GCACCCAGTT CCGGTTTCTC ACNIGTITCC CTGGGAACAA GACCCACAAC GCTGTGTGG TCCAGGGTC CCGCCGGCA  
GACGTTTGA ACCTGTCTGA CFTGGTCAA GCCAAAGAG TGACACAAGG GACCCTTGT CTGSGTGTG CGACACACCG AGGTCCCAAG GGGCGGCCGT  
128 C K P W T D C T Q F G F L T V F P G N K T H N A V C V P G S P P A ^47365.tm.f

601 GAGCGCTTG GTGGCTGAC CGTCGTCTC CTGGCCGTGG CCGCTGCGT CCTCCTCCTG ACCTCGGCC AGCTGGACT GCACATCTGG CAGCTGAGGA  
CTCGCGAAC CCACCGACTG GCACGAGGAG GACCGGCACC GCGGACCGCA GGAGGAGGAC TGGAGCCGGG TCGAACCTGA CGTGTAGACC GTCGACTCCT  
161 E P L G W L T V L L A V A A C V L L L T S A Q L G L H I W Q L R S

701 GTCAGTGCAT GTGCCCCGA GAGACCCAGC TGCTGTGGA GTGCGCCCGG TCGACCGAAG ACGCCAGATC CTGCCAGTTC CCGGAGGAG AGCGGGCGGA  
CAGTACGTA CACCGGGCT CTCTGGGTGG ACACGACCT CCAGGGCGGC AGCTGGCTTC TGGGTCTTC GACGTCAG GGGTCTCCTC TCGCCCCCGT  
195 Q C M W P R E T Q L L L E V P P S T E D A R S C Q F P E E R G E

801 GCGATCGGA GAGGAGAGG GCGGGTGG AGACCTGTTG GTGTGAGCCT GCGCGTCTC CCGGCCACC GACCGCAGCC AGCCCTCC CAGGAGTCC  
CGCTAGCCGT CTCCTCTCC CCGCGGACC TCTGGACACC CACACTCGA CCGGACGAG GCCCGGGTGG CTGGCGTGG TCGGGGAGG GTCCTCGAGG  
228 R S A E E K G R L G D L W V O

901 CCAGCGGCA GGGGCTCAG GTTCTGTCT GGGCGGGCC CTGTCCCCT GCGAGCAGAA GTGGTGCAG GAAGTGGCA GTGACGAGC CCCTGGACCA  
GGTCCGGCGT CCGGAGACG CAGACGAGA CCGGCCCGG GACGAGGGA CCGTGTCTT CACCCACGTC CTTCACCGT CACTGGTCCG GGGACTTGT

1001 TGCAGTTC  
ACGTCAAG



## 【 3 】

<consen01> 1 GGCACAGCACGGGGCGATGGGCGCGTTTCGGGCCCTGTGCGGCCTGGCGC  
<consen01> 51 TGCTGTGCGCGCTCAGCCTGGGTGAGCGCCCCACCGGGGT-CCCGGGTG  
<consen01> 101 CGGCCCTGGGCGCCTCCTGCTTGGGACGGGAACGGACGCGCGCTGCTGCC  
<consen01> 151 GGGTTCACACGACGCGCTGCTGCCGCGATTACCGGGCGAGGAGTGCTGT  
<consen01> 201 TCCGAGTGGGACTGCATGTGTGTCCAGCCTGAATCCACTGCGGAGACCC  
<consen01> 251 TTGCTGCACGACCTGCCGGCACCACCCTTGTCCCCAGGCCAGGGGGTAC  
<consen01> 301 AGTCCCAGGGGAAATTCAGTTTTGGCTTCCAGTGTATCGACTGTGCCTCG  
<consen01> 351 GG-GACCTTCTCCGGGGGCCACGAAG--GCCACTGCAAACCTTGGACAGA  
<consen01> 401 CTGCACCCAGTT-CGGG-TTTC'CACTGTGTTCCCTGGGGAACAAGACCC  
<consen01> 451 -ACAA-CGCTGTGTGCGTCCCAGGGTCCCCG-CCGGCAGAGCCGCTT-GG  
<consen01> 501 GTGGCTGACCGTCGTCCTCCTGGCCGT-GGCCGCCTGCGTC-TCCTCCTG  
<consen01> 551 ACCTCGGCCCAGCTTGGACTGCACATCTGGCAGCTGAGGAGTCAGTGCAT  
<consen01> 601 GTGGCCCCGAGGTCTGTCACAGCCTGGTGCGGGGAGGTGGGAGCATGGCT  
<consen01> 651 GCCTGCTGACCGTGGCCCCCTGCATAGACCAGCTGCTGCTGGAGGTGC  
<consen01> 701 CGCCGTCGACCGAAGACGCCAGAAGCTGCCAGTTC'CCCGAGGAAGAGCGG  
<consen01> 751 GCGGAGCGATCGGCAGAGGAGAAGGGGCGGCTGGGAGACCTGTGGGTGTG  
<consen01> 801 AGCCTGGCTGTCTCCGGGGCCACCGACCGCAGCCAGCCCCTCCCAGGA  
<consen01> 851 GCTCCCCAGGCCGCAGGGGCTCTGCGTTC'GCTCTGGGCCGGGCCCTGCT  
<consen01> 901 CCCCTGGCAGCAGAAGTGGGTGCAGGAAGGTGGCAGTGACCAGCGCCCTG  
<consen01> 951 GACCATGCAGTTC

【 4 】

1 GGACAGAC GGGGGATG GCGGTTTG GGCCTGTG GGCCTGGC TGCTGTGG GGTACGCTG GGTACGGCC CCACGGGGG TCCTGGGTG  
 CGTGTGCGT CCCCCTACC CGCGAAGC CCGGACAG CCGACCGG ACAGACGG CGAGTGGAC CAGTGGCG GGTGCCCC AGGGCCACG  
 1 M G A F R A L C G L A L L C A L S L G Q R P T G G P G C  
 ^44825.GITR.f ^orf  
 ^44825.GITR.P ^44825.r2  
 ^44825.f1

101 GGCCCTGGC GCCTCTGCT TGGACGGGA ACGGACGGC GGTGTGCG GGTTCACAG ACGCGTGT GCCCGGATTA CCCGGGGAG GAGTGTGTT  
 CCGGACCCG CGGAGACGA ACCCTGCCCT TGCTGCGG CGACGAGGC CCACTGTG TCGCGGAGA CGCGGTAAT GGGCCGTC CTCACGACAA  
 29 G P G R L L L G T G T D A R C C R V H T T R C C R D Y P G E C C S  
 ^44825.p1

201 CCAGTGGGA CTGCATGT GTCCAGCCTG AATCCACTG GGGAGACCT TGCTGCACGA CTGCGCGCA CCACCTTGT CCCCAGGCC AGGGGGTACA  
 GGCTACCCCT GACGTACACA CAGTCCGGAC TTAAGGTGAC GCCTCTGGG ACGAGTGT GAGGGCCGT GGTGGNAACA GGGGTCCCG TCCCCATGT  
 63 E W D C M C V Q P E F H C G D P C C T T C R H H P C P P G Q G V Q

301 GTCCAGGG AAATCAGT TTGGCTTCA GTGTATGAC TGTCCCTCG GACCTTTC CGGGGGCCAC GAAGGCACT CAACACCTTG GACAGACTG  
 CAGGTCCCC TTTAAGTCAA AACCGAAGT CAGATAGCTG ACACGGAGCC CCTGGAAGAG GCCCCCCGTG CTTCCGGTGA CGTTGGAC CTGTCTGAC  
 96 S Q G K F S F G F Q C I D C A S G T F S G G H E G H C K P W T D C  
 ^44825.GITR.f

401 ACCAGTTC GGTTCAC TGTTCCTT GGGAAACAG ACCCAACG CTGTGTGCT CCGAGGTCC CCGCCGGCAG AGCCGCTTG GTGGCTGAC  
 TGGTCAAGC CCNAGAGT ACACAAGGA CCCTTGTTC TGGTGTG GACACAGCA GGTGCCAGG GCGGGCGTC TCGGGAACC CACCGACTGG  
 129 T Q F G F L T V F P G E Q D P Q R C V R P R V P A G R A A W V A D R

501 GTGTCCTC TGGCGTGC CGCTGCGT TCCTCTGAC CTCGGCCAG CTTGACTGC ACATCTGCA GCTGAGAGT CAGTCACTG GGCCTGAGG  
 CAGCAGAGG ACCGGACCG GCGACGCGAG AGGAGACTG GAGCCGGTC GAACCTGAG TGTAGCCGT CGACTCTCA GTCACGTACA CCGGGGTCC  
 163 R P P G R G R L R L L L T S A Q L G L H I W Q L R S Q C M W P R G

601 TCTGTACAG CTTGTGCG GAGGTGGGA GCATGGTGC CTGTGACC TGGCCCCCT GCATAGACC AGTGTGCT GGAGTGGC CCGTCCAGCC  
 AGACAGTGC GGACCAGCC CTCACCCCT CBTACCAGC GACGACTGC ACCGGGGA CBTATCTGG TCGACGACGA CTTCCACGC GGCAGTGGC  
 196 L S Q P G A G R W E H G C L L T V A P L H R P S C C W R C R R P

701 AAGAGCCAG ARGTCCAG TTCCCGAG AAGAGCGGG CGAGCATCG GCAGAGAGA AGGGCGGCT GGGAGACTG TGGTGTGAG CCGTGGTGT  
 TTCTGCGTC TTCGAGGTC AAGGGCTCC TTCTCGCCC GTCGCTAGC CGTCTCTT TCCCGCGGA CCCTCTGGC ACCCACACTC GACCCGACAG  
 229 K T P E A A S S P R K S G A S D R Q R R R G G W E T C G C E P G C P

801 CTCGGGCC ACCGACCGA GCCAGCCCT CCCCAGAGC TCCCAGGC GCAGGGTTC TCGTTCGCT TCTGGCCCG GCCCTGCTC CCGTGGCAGCA  
 GAGCCCCGG TGGTGGCGT CGGTGGGGA GGGTCTCTG AGGGTCCCG GTCCCCGAG AGCCAACAG AGNCCCGCC CCGGACGAGG GACCCCTGCT  
 263 P G P P T A A S P S P G A P Q A A G A L R S A L G R A L L P W Q Q  
 ^44825.f2

901 GAAGTGGTG CAGGAAGTG GCATGACCA GGCCTTGA CCATCAGT CCGNGCCCG GINGGCCCT  
 CTTACCCAC GTCCTCCAC CGTCACTGT CCGGGACCT GGTACTCAA GCNCCGGCC CACCCGGA  
 296 K W V Q E G G S D Q R P G P C S S X A G X A  
 ^44825.r1

【 5 A 】

1 CAGCTCICAT TTCTCCAAA ATGTGTTTGA GGCACCTTGGG AAATATGGCT TTAAGCCATT CAAGAACCTCA AGGAGCTCAG AGATCATCCT GGAAGCTGTG  
GTCGAGAGTA AAGAGGTTTT TACACAACT CCGTGAACCT TTTATACCGA AATTCGGTAA GTTCTTGAGT TCCTCGAGTC TCTAGTAGGA CCTTCGACAC  
MetCysLeuS erHisLeuG1 uAsnMetPro LeuSerHisS erArgThrG1 nGlyAlaGln ArgSerSerT rplysLeuTrp  
101 GCTCTTTTGC TCAATAGTTA TGTTGCTATT TCTTTGCTCC TTCAGTTGGC TAATCTTTAT TTTTCTCCAA TTAGAGACTG CTAAGGAGCC CTGTATGGCT  
CGAGAAAACG AGTTATCAAT ACAACGATAA AGAACGAGG AAGTCAACCG ATTAGAAATA AAAAGAGGTT AATCTCTGAC GATTCCTCGG GACATACCGA  
28 LeuPheCys SerIleValM etLeuLeuPh eLeuCysSer PheSerTrpL euillePheI1 ePheLeuGln LeuGluThra laLysGluPr oCysMetAla  
201 AAGTTTGGAC CATTACCCCT AAAATGGCAA ATGGCATCTT CTGAACCTCC TTGCGTGAAT AAGGTGCTG ACTGGAAAGCT GGAGACTACT CAGAATGGCT  
TTCAAACTG GTAATGGGAG TTTTACCGTT TACCCTAGAA GACTTGGAGG AACGCACCTTA TTCCACAGAC TGACCTTCGA CCTCTATGAA GTCTTACCGA  
61 LysPheGlyP roLeuProSe rLysTrpGln MetAlaSerS erGluProPr oCysValAsn LysValSerA spTrpLysLe uGluilleLeu GlnAsnGlyLeu  
301 TATATTTAAT TTATGGCCAA GTGGCTCCCA ATGCAAACTA CAATGATGTA GCTCCTTTTG AGGTGCGGCT GTATAAAAAA AAAGACATGA TACAAACTCT  
ATATAAATA AATACCGGTT CACCGAGGTT TAGGTTGAT GTTACTACAT CGAGGAAAAC FCCACGCCGA CATATTTTTG TTTCTGTACT ATGTTTGAGA  
95 TyrLeuI1 eTyrGlyGln ValAlaProA ValAlaAsnTy rAsnAspVal AlaProPheG luValArgLe uYrLysAsn LysAspMetI leGlnThrLeu  
401 AACRAACAAA TCTAAAATCC AAAATGTAGG AGGACTTAT GAATTTGCTG TTGGGGACAC CATAGACTTG ATATTTCAACT CTGAGCATCA GGTTCATAAA  
TTGTTTGTIT AGATTTTAGG TTTTACATCC TCCCTGAATA CTTAACCTGAC AACCCCTGTG GTATCTGAAC TATAAGTTGA GACTCGTAGT CCAAGATTTT  
128 ThrAsnLys SerLysIleG lnAsnValG1 yGlyThrTyr GluLeuHisV alGlyAspTh rIleAspLeu IlePheAsnS erGluHisG1 nValleuLys  
501 AATAATACAT ACTGGGGTAT CATTTTACTA GCAAAATCCCC AATTCATCTC CTAGAGACTT GATTTGATCT CCTCATTTCC TTCAGCACAT GTAGAGGTGC  
TTATTATGTA TGACCCCATTA GTAAAATGAT CGTTTAGGGG TTAAGTAGAG GATCTCTGAA CTAAACTAGA GGAGTAAGGG AAGTCGTGTA CATCTCCACG  
161 AsnAsnThrT yrTrpGlyI1 eIleLeuLeu AlaAsnProG lnPheIleSe rAM\*  
601 CAGTGGGTGG ATTGGAGGGA GAAGATATTC AATTTCTAGA GTTTGTCTGT CTACAAAAAT CAACACAAAC AGAACTCCTC TGACCGTGAA TTTTCATCTA  
GTCACCCACC TAACCTCCCT CTCTATAAG TTAAGATCT CAACACAGACA GATGTTTTTA GTTGTGTTG TCTTGAGGAG ACGTGCACCT AAAAGTAGAT  
701 TCATGCCTAT CTGAAAGAGA CTCAGGGGAA GAGCCAAAAGA CTTTTGFTG GATCTGCAGA AATACTTCAI TAATCCATGA TAAAACAAAT ATGGATGACA  
AGTACGGATA GACTTTCTCT GAGTCCCTT GAGTCCCTT CTGGTTTCT GAAAACCAAC CTAGACGCTCT TTATGRAAGTA ATTAGGTACT ATTTGTTTA TACCTACTGT  
801 GAGGACATGT GCTTTTCAA GAATCTTTAT CTAATTTCTG AATTCATGAG TGGAAAAATG GAGTTCTATT CCCATGGAAG ATTTACCTGG TATGCAAAA  
CTCCTGTACA CGAAAAGTTT CTTAGANATA GATTAAGAAC TTAAGTACTC ACCTTTTTAC CTCRAAGATA GGGTACCTTC TAAATGGACC ATACGTTTTT  
901 GGATCTGGGG CAGTAGCCTG GCTTTGTTCT CATATTTCTG GCTGCTGTGA ATTCATTCIT CTCATACTCC CATCTTCTGA GACCCCTCCA ATAAAAAGTA  
CCTAGACCCC GTCATCGGAC CGAAAACAAGA GTATAAGAAC CCGACGACAT TAAGTAAGAA GAGTATGAGG GTAGAAGACT CTGGGAGGGT TATTTTTCAT  
1001 GACTGATAGG ATGGCCACAG ATATGCCTAC CATACCCTAC TTTAGATATG GTGGTGTAG AAGATAAAGA ACAATCTGAG AACTATTGGA ATAGAGGTAC  
CTGACTATCC TACCGGTGTC TATACGGATG GTATGGGATG AAATCTATAC CACCACAATC TTCTATTTCT TGTAGACTC TTGATACCT TATCTCCATG

1101 AAGTGGCATA AATGGRAATG TACGGTATCT GGAATTTCT CTTGGTTTFA TCTTCTCAG GATGCAGGGT GCTTTAAAA GCCTATCAA AGGAGTCATT  
 TTCACCGTAT TTTACCTTAC ATGGGATAGA CCTTTAAGA GAACCAAAAT AGAAGGAGTC CTACGTCCCA CGAAATTTT CGGATAGTT TCCTCAGTAA

1201 CCGAACCCCTC ACGTAGAGCT TTGTGAGACC TTAGTGTTC TAAACATTGC TAAATTGTAA GAAAGAGTAA CCATTAGTAA TCATTAGGTT  
 GGCTTGGGAG TGCATCTCGA AACACTCTGG AATGACAACC ACACACACAG ATTTGTACG AATAACATTT CTTTCTCATT GGTAAATCATT AGTAAATCCRA

1301 TAACCCGAGA ATGGTATTAT CATTACTGGA TTATGTCATG TAATGATTTA GTATTTTTC ACAGTTTCCA AAGTGCTTTC GTAACAACAGT  
 ATTGGGTCT TACCATAATA GTAATGACCT AATACAGTAC ATTACTTAAT CATAAAAATC GATCGAAAGG TGTCAAACGT TTCACGAAAG CATTTTGTCA

1401 TAGCAATCT ATGAAGTTAA TTGGGCAGGC ATTTGGGGGA AAATTTAGT GATGAGAATG TGATAGCATA GCATAGCCAA CTTTCTCAA CTCATAGGAC  
 ATCGTTAAGA TACTTCAAT AACCCGTCCG TAAACCCCTT TTTAARAATCA CTACTCTTAC ACTATCGTAT CGTATCGGTT GAAAGGAGTT GAGTATCCTG

1501 AAGTACTAC AAGAGGCAAT GGGTAGTCCC CTGCATTGCA CTGTCTCAGC TTTAGAAATG TTATTTCTGC TATCGTGTTA TAAGACTCTA AAACCTTAGCC  
 TTAGTGTAG TTCTCCGTTA CCCATCAGG GACGTAACGT GACAGATCG AAATCTTAAC AATAAAGACG ATAGCACAAT ATTCTGAGAT TTTGAATCCG

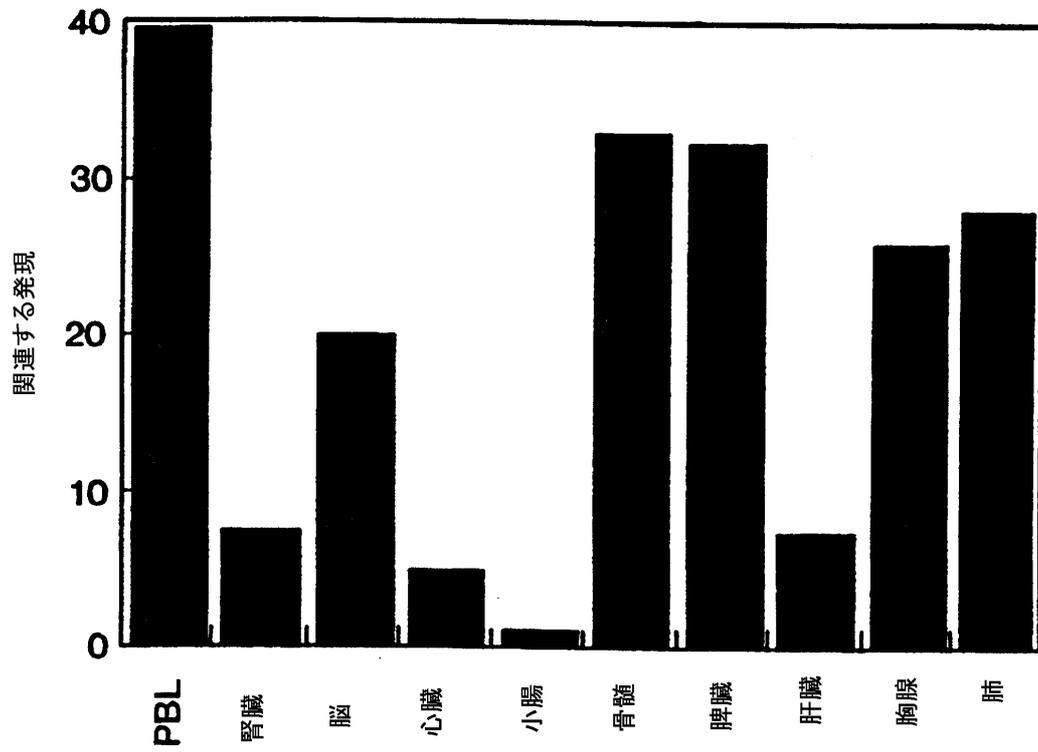
1601 AATTCACTTT TCAGGRAGCA TATTCCTT TAGCCCAAGG TGAGCAGAGT GAAGCTACAA CAGATCTTTC CTTTACCAGC ACACCTTTT TTTTTTTTCC  
 TTAGTGAAA AGTCCCTCGT ATAAGGGGAA ATCGGGTTCC ACTCSICTCA CTTCGATGTT GTCTAGAAG GAAATGGTCC TGTGAAAAA AAAAAAAGG

1701 TGCTGAATC AGGGAGATCC AGGATGCTGT TCAGGCCAAA ATTCCTTTC TCACTTTGCA GGGCCATCT TAGTCAAATG TGCTAACCTC  
 ACGGACTTAG TCCCTCTAGG TCCTACGACA AGTCCCGTTT AAGGGGAAA AGTGAAACGT CCCGGGTAGA ATCAGTTTAC ACGATTGAAG

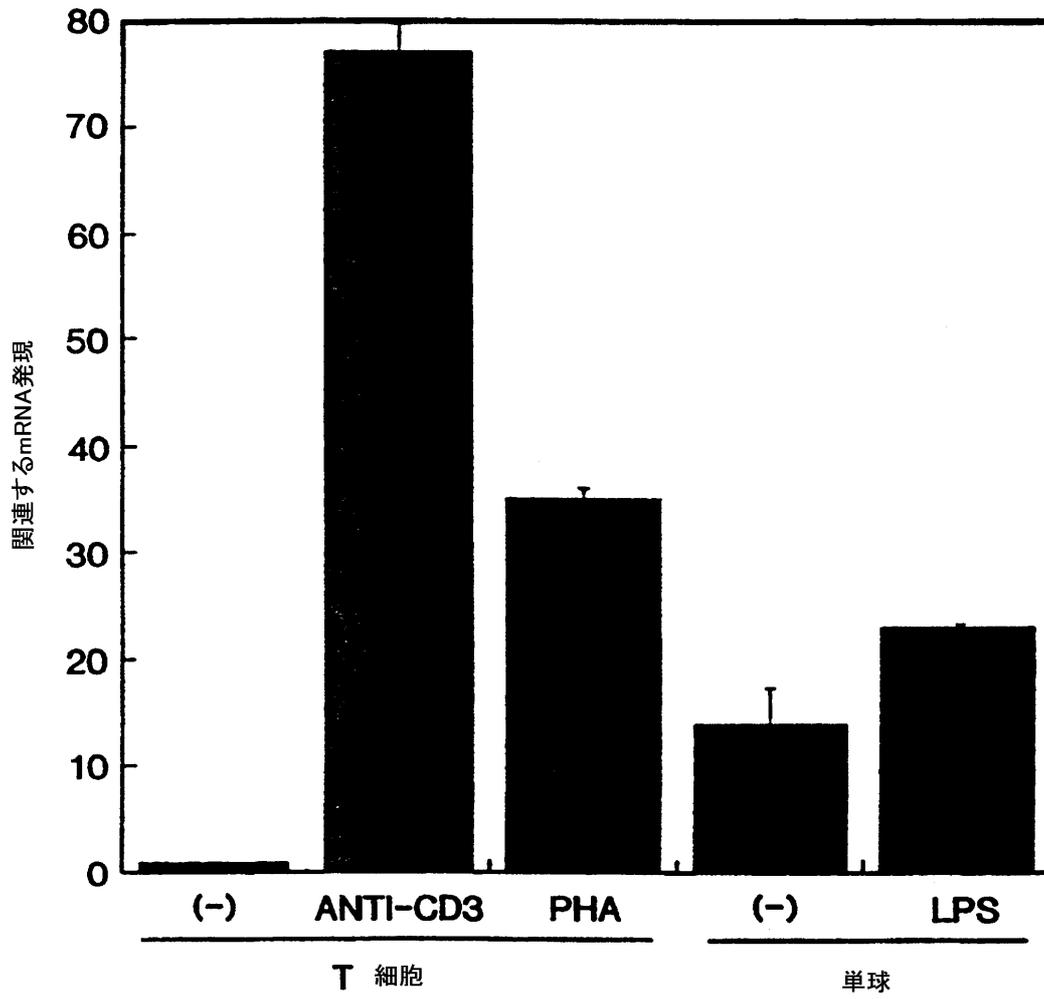
1801 TAAATAATA AATAGACTA ATTCAAAT TTTGGAATCT TAAATAGCT ACTTGCNGST TGCTTGTGTA AAGNATATA ATGATTACAT TGTAAACAAA  
 ATTTATTAT TTATCGTGAT TTAGTTTAA AAACCTTAGA ATTTAATCGA TGRACGNCCA ACGAACRACCT TTCNTATAT TACTAATGTA ACATTTGTTT

1901 TTAANAATAT TTAGGATAT TTGTGAARAG CTGCATTATG TTAATAATA TTACATGTA AGCT  
 AAATTTATA AATACCTATA AACACTTTT CACGTAATAC AATTATTAT AATGTACAT TCGA

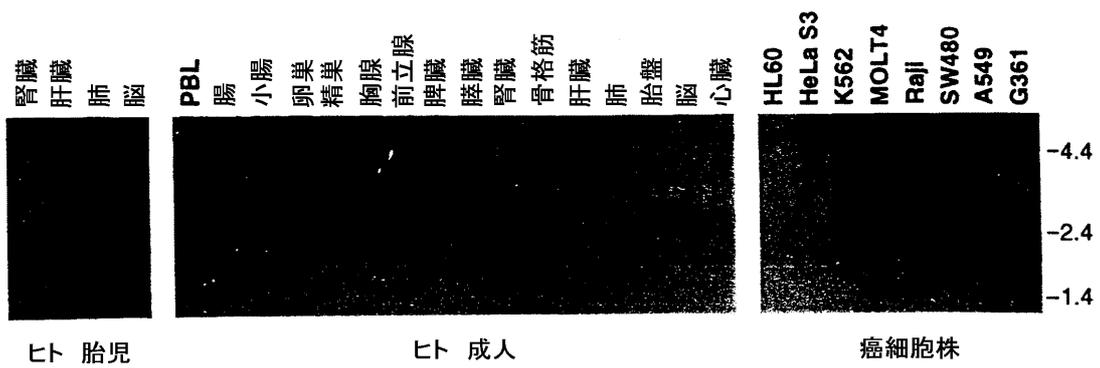
【図6】



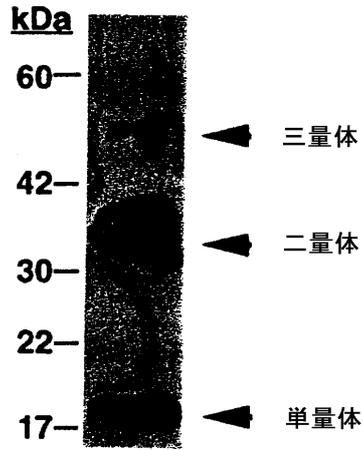
【図7】



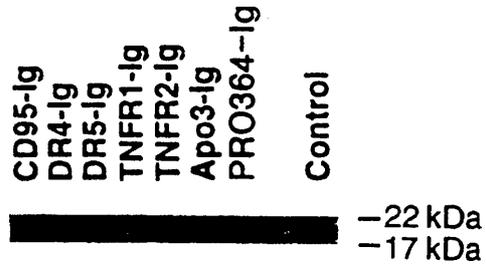
【図8】



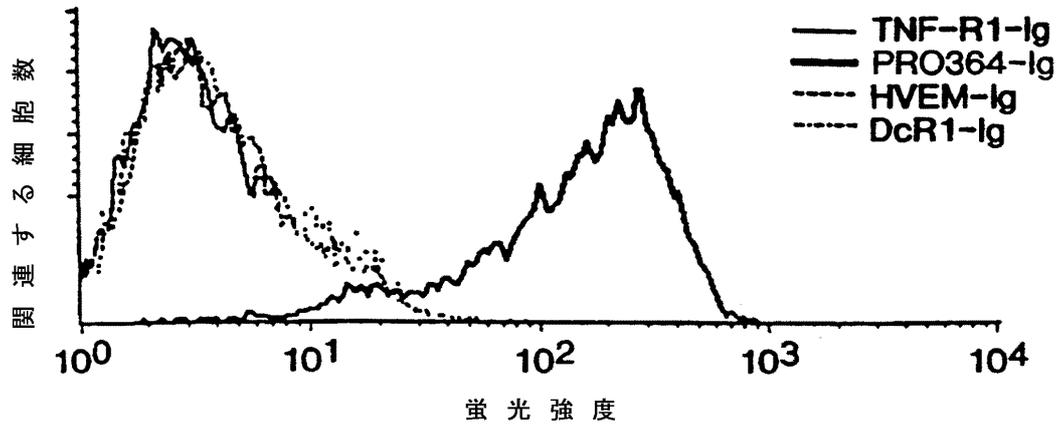
【図9】



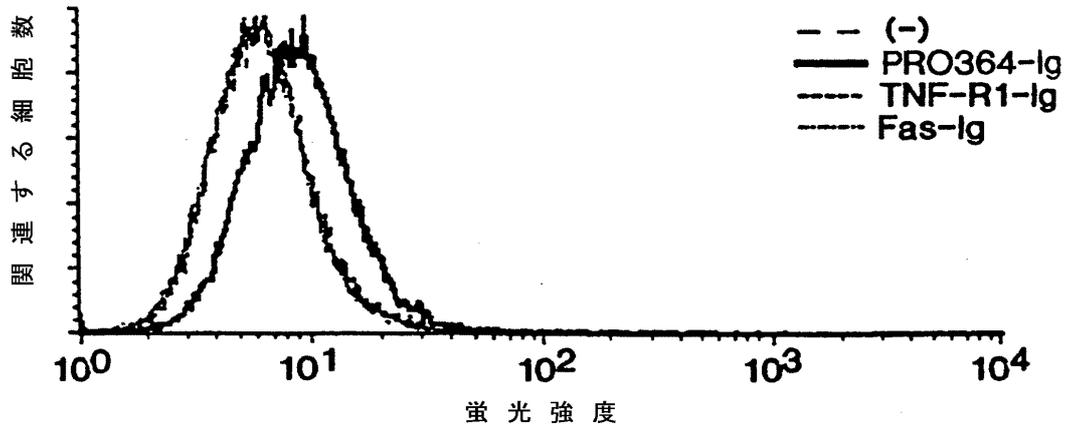
【図10】



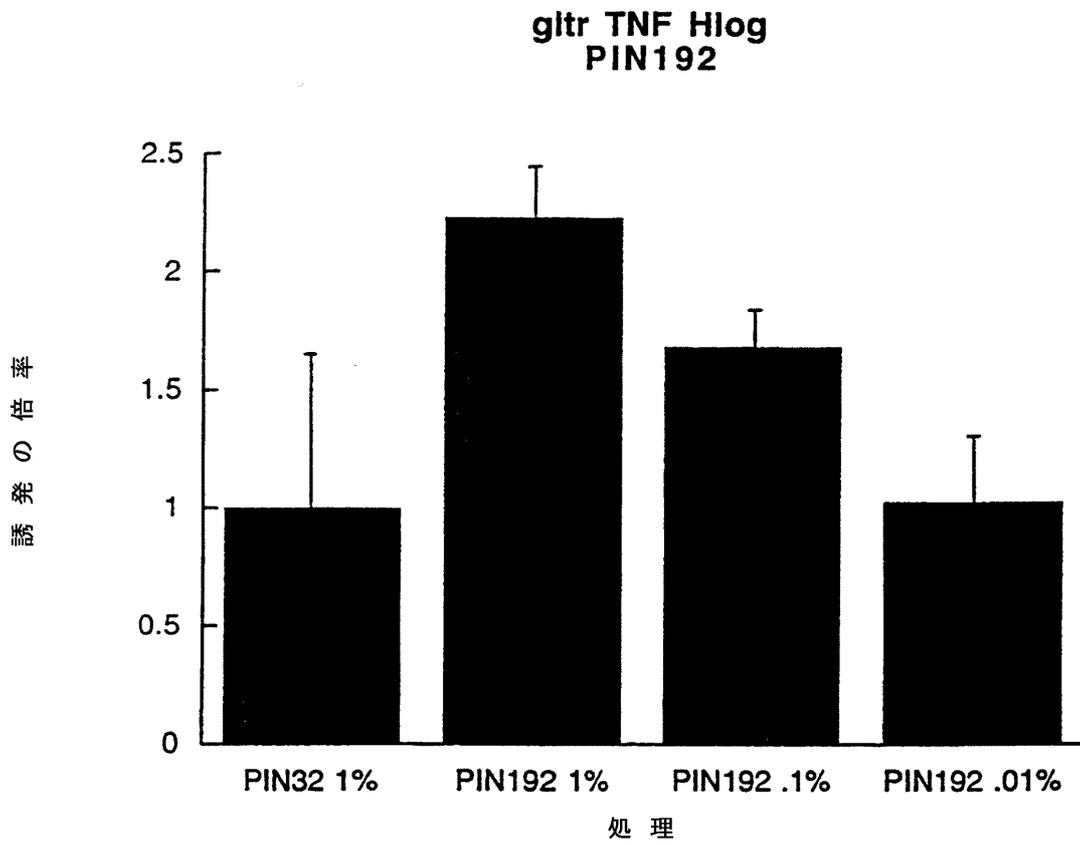
【図11A】



【図11B】



【図12】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 00/18867
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K38/17 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/68 G01N33/574 C07G17/00 A61K39/395 A61P9/00 A61P35/00 A61P27/02 //C07K14/705,C07K14/47,C07K16/28,C12N15/12,(A61K38/17,31:00)		
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 A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, MEDLINE, EMBASE, LIFESCIENCES, STRAND		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GURNEY A L ET AL: "IDENTIFICATION OF A NEW MEMBER OF THE TUMOR NECROSIS FACTOR FAMILY AND ITS RECEPTOR, A HUMAN ORTHOLOG OF MOUSE GITR" CURRENT BIOLOGY,CURRENT SCIENCE,,68, vol. 9, no. 2, 1999, pages 215-218, XP000938588 ISSN: 0960-9822 the whole document	1-37
<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 cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 30 January 2001		Date of mailing of the international search report 06/02/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreau, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/18867
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KWON BYUNGSUK ET AL: "Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, THE AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, INC., US, vol. 274, no. 10, 5 March 1999 (1999-03-05), pages 6056-6061, XP002147323 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-37
P,X	WD 99 40196 A (GENENTECH) 12 August 1999 (1999-08-12)  page 79 -page 83	1, 3, 5-9, 20-25, 30, 31
P,X	WO 00 32221 A (GENENTECH INC) 8 June 2000 (2000-06-08) page 201 -page 217	1, 3, 5-37
E	WO 00 53753 A (GENENTECH INC) 14 September 2000 (2000-09-14) page 199 -page 212	1-37

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 00/18867

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9940196 A	12-08-1999	AU 2591599 A	23-08-1999
		EP 1053321 A	22-11-2000
WO 0032221 A	08-06-2000	AU 1602999 A	16-06-1999
		AU 1748200 A	19-06-2000
		AU 2474700 A	19-06-2000
		AU 3107000 A	19-06-2000
		EP 1037979 A	27-09-2000
		WO 0032776 A	08-06-2000
		WO 0032778 A	08-06-2000
		AU 1749900 A	12-07-2000
		AU 2192800 A	12-07-2000
		AU 2224800 A	28-09-2000
		AU 2399300 A	28-09-2000
		AU 2495200 A	28-09-2000
		AU 2596700 A	28-09-2000
		AU 2600800 A	28-09-2000
		AU 2883600 A	28-09-2000
		AU 3072199 A	27-09-1999
		AU 3107700 A	28-09-2000
		AU 3381600 A	28-09-2000
		AU 3514400 A	28-09-2000
		WO 0053753 A	14-09-2000
		WO 0053754 A	14-09-2000
		WO 0053755 A	14-09-2000
		WO 0053756 A	14-09-2000
		WO 0053757 A	14-09-2000
		WO 0053758 A	14-09-2000
		WO 0053750 A	14-09-2000
		WO 0037638 A	29-06-2000
		WO 0037640 A	29-06-2000
		WO 0053751 A	14-09-2000
		WO 0053752 A	14-09-2000
		AU 1749800 A	04-10-2000
		AU 3737500 A	28-09-2000
		WO 0053760 A	14-09-2000
WO 0055319 A	21-09-2000		
WO 0070050 A	23-11-2000		
AU 1932000 A	03-07-2000		
AU 4328699 A	20-12-1999		
WO 0075327 A	14-12-2000		
WO 0073454 A	07-12-2000		
WO 0073445 A	07-12-2000		
WO 0073348 A	07-12-2000		
WO 0073452 A	07-12-2000		
WO 0036102 A	22-06-2000		
WO 0075316 A	14-12-2000		
WO 0078961 A	28-12-2000		
WO 0105972 A	25-01-2001		
WO 0105836 A	25-01-2001		
WO 0104311 A	18-01-2001		
WO 0077037 A	21-12-2000		
WO 0053753 A	14-09-2000	AU 1748200 A	19-06-2000
		AU 1749900 A	12-07-2000
		AU 2192800 A	12-07-2000
		AU 2224800 A	28-09-2000
		AU 2399300 A	28-09-2000

Form: PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 00/18867

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0053753 A		AU 2495200 A	28-09-2000
		AU 2596700 A	28-09-2000
		AU 2600800 A	28-09-2000
		AU 2883600 A	28-09-2000
		AU 3072199 A	27-09-1999
		AU 3107700 A	28-09-2000
		AU 3381600 A	28-09-2000
		AU 3514400 A	28-09-2000
		WO 0053754 A	14-09-2000
		WO 0053755 A	14-09-2000
		WO 0053756 A	14-09-2000
		WO 0053757 A	14-09-2000
		WO 0053758 A	14-09-2000
		WO 0032221 A	08-06-2000
		WO 0053750 A	14-09-2000
		WO 0037638 A	29-06-2000
		WO 0037640 A	29-06-2000
		WO 0053751 A	14-09-2000
		WO 0053752 A	14-09-2000
		AU 1749800 A	04-10-2000
		AU 3737500 A	28-09-2000
		WO 0053760 A	14-09-2000
		WO 0055319 A	21-09-2000
		WO 0070050 A	23-11-2000
		AU 1932000 A	03-07-2000
		AU 4328699 A	20-12-1999
		WO 0075327 A	14-12-2000
		WO 0073454 A	07-12-2000
		WO 0073445 A	07-12-2000
		WO 0073348 A	07-12-2000
		WO 0073452 A	07-12-2000
		WO 0036102 A	22-06-2000
		WO 0075316 A	14-12-2000
		WO 0078961 A	28-12-2000
		AU 3107000 A	19-06-2000
		WO 0105972 A	25-01-2001
		WO 0032778 A	08-06-2000
		WO 0105836 A	25-01-2001
		WO 0104311 A	18-01-2001
		WO 0077037 A	21-12-2000
	AU 5590899 A	21-03-2000	
	AU 5816799 A	03-04-2000	
	AU 5922999 A	03-04-2000	
	AU 6498499 A	03-04-2000	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	1 0 1
	1 0 1	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/04		3/10	
3/10		7/02	
7/02		7/10	
7/10		9/00	
9/00		9/04	
9/04		9/10	
9/10		9/12	
9/12		9/14	
9/14		11/00	
11/00		13/12	
13/12		15/00	
15/00		17/02	
17/02		17/06	
17/06		19/10	
19/10		21/00	
21/00		25/00	
25/00		25/14	
25/14		25/16	
25/16		25/28	
25/28		27/02	
27/02		27/06	
27/06		29/00	1 0 1
29/00	1 0 1	35/00	
35/00		41/00	
41/00		43/00	1 0 1
43/00	1 0 1		1 0 5
	1 0 5	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		33/50	Z
33/50		33/53	D
33/53			M
		33/566	
		33/574	A
		A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ウィリアムズ, ピー., ミッキー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94019,  
 ハーフ ムーン ベイ, アルト アヴェニ  
 ュー 509

(72)発明者 ゲリッツェン, マリー, イー.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94402,  
 サン マテオ, パロット ドライブ 541

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 CA25 CB01 CB03  
 CB07 DA12 DA13 DA14 DA36  
 DA77 FB02 FB03 FB07 HA06  
 HA11  
 4B024 AA01 BA63 CA04 CA09 CA12  
 DA12 HA14 HA17  
 4B063 QA01 QQ08 QR77 QX01  
 4C084 AA02 AA14 AA17 AA19 BA01  
 BA08 BA22 BA23 BA44 CA18  
 DB52 DB57 MA01 MA02 NA14  
 ZA011 ZA021 ZA161 ZA221  
 ZA331 ZA361 ZA391 ZA441  
 ZA451 ZA591 ZA661 ZA681  
 ZA751 ZA811 ZA831 ZA891  
 ZA941 ZA961 ZA971 ZB151  
 ZB211 ZB212 ZB221 ZB261  
 ZC022 ZC351 ZC521 ZC751  
 ZC752  
 4C085 AA13 AA14 BB01 BB11

专利名称(译)	通过肿瘤坏死因子配体/受体同源物促进和抑制血管生成和心血管化		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003504343A</a>	公开(公告)日	2003-02-04
申请号	JP2001509196	申请日	2000-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ウィリアムズピーミッキー ゲリッツェンマリーイー		
发明人	ウィリアムズ,ピー.,ミッキー ゲリッツェン,マリー,イー.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P7/02 A61P7/10 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/12 A61P9/14 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P29/00 A61P35/00 A61P41/00 A61P43/00 C07K14/47 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	A61K38/177 A61P1/04 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P29/00 C07K14/47 C07K2319/30 C12N2799/026 G01N33/566 G01N2333/525 G01N2333/70575 G01N2333/70578		
FI分类号	A61K39/395.D A61K39/395.E A61K39/395.N A61K39/395.T A61K45/00 A61K45/00.101 A61P1/04 A61P3/10 A61P7/02 A61P7/10 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/12 A61P9/14 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P41/00 A61P43/00.101 A61P43/00.105 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/574.A A61K37/02 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/HA06 2G045/HA11 4B024/AA01 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA12 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QR77 4B063/QX01 4C084/AA02 4C084/AA14 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/DB52 4C084/DB57 4C084/MA01 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084/ZA161 4C084/ZA221 4C084/ZA331 4C084/ZA361 4C084/ZA391 4C084/ZA441 4C084/ZA451 4C084/ZA591 4C084/ZA661 4C084/ZA681 4C084/ZA751 4C084/ZA811 4C084/ZA831 4C084/ZA891 4C084/ZA941 4C084/ZA961 4C084/ZA971 4C084/ZB151 4C084/ZB211 4C084/ZB212 4C084/ZB221 4C084/ZB261 4C084/ZC022 4C084/ZC351 4C084/ZC521 4C084/ZC751 4C084/ZC752 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/BB11		
优先权	60/143304 1999-07-12 US		
其他公开文献	JP2003504343A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

公开了用于促进或抑制包括人在内的哺乳动物的脉管系统和/或心血管形成的组合物和方法。 药物组合物基于在这些用途中鉴定的一种或多种多肽或拮抗剂。 本文中可诊断, 预防或治疗的疾病包括创伤, 例如伤口, 各种癌症和血管疾病, 包括动脉粥样硬化和心脏肥大。

