

(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 - 527844

(P2003 - 527844A)

(43)公表日 平成15年9月24日(2003.9.24)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		35/76	4 B 0 2 4
	35/76	45/00	4 B 0 6 3
	38/00	45/06	4 B 0 6 4
	45/00	48/00	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全187数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 558238(P2001 - 558238)

(86)(22)出願日 平成12年12月19日(2000.12.19)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月9日(2002.8.9)

(86)国際出願番号 PCT/US00/34756

(87)国際公開番号 W001/059100

(87)国際公開日 平成13年8月16日(2001.8.16)

(31)優先権主張番号 PCT/US00/03565

(32)優先日 平成12年2月11日(2000.2.11)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 PCT/US00/06884

(32)優先日 平成12年3月15日(2000.3.15)

(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
エヌイー・ウェイ・1

(72)発明者 ガーニー, オースティン, エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002,
ベルモント, デビー レーン 1

(72)発明者 キルヒホファー, ダニエル, ケイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94024,
ロス アルトス, スプリングアー ロード, 32
6エス.

(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】 血管形成及び心血管疾患の調節に使用する肝細胞成長因子の新規インヒビター

(57)【要約】

ヒトを含む哺乳類の血管形成及び/又は心臓血管新生を刺激又は阻害することに関して、組成物及び方法を開示する。製薬的組成物は、一つ又はそれ以上の使用について確認されているポリペプチド、又はそれに加えてアンタゴニストに基づく。本願の組成物により診断、予防、又は治療できる疾患には、創傷のような外傷、種々の癌、並びにアテローム性動脈硬化症及び心臓肥大を含む血管の疾患が含まれる。加えて、本発明は、新規のポリペプチド、そしてこれらのポリペプチドをコードする核酸分子に関する。また、ここで提供されているのは、これら核酸配列を含んでなる宿主及びベクター、異種ポリペプチド配列と融合した本発明のポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチド分子、本発明のポリペプチドと結合する抗体、並びに本発明のポリペプチドを生産する方法である。

```

MAPARTMARARLAPAGIPAVALWLLCTLGLQGTQAGPPAPPGLPAGADCLNSFTAGVGFVLDLTNASV
NGATFLESPTVRRGDCVRACTTQNCNLALVELQDRGEDAIAACFLINCLYEQNFVCKFAPREGFINY
LTREVYRSYRQLRTQGGPGSGIFKAWAGIDLKVPQPEPLVKDVENTDWRLLRGDTRVVRERKDPNQVEL
WGLKEGTVLFQLTVTSSDHPEDTANVTVTVLSTKQTEEDYCLASNKVGRGRSFPFRWYDPTQICKSIFY
GGCLGNKNNYLREBECILACRGVQGGPLRSGSQAQATFPQGF SMERRHPVCSGTCQPTQFCRCSNGCCIDS
FLECDTTPNCPDASDEAAACEKYSGFDELQRIHFPSPDKGHCVLDPTGLCKESI PRWYYPFSEHCARFT
YGGCYGNKNFEEBQQCLESCRGISKKDVFLRREIPIPTSGSVMEMAVTVFLVICVWVAALGYCFEKN
QRKDFHGHHPPTPASSTVSTEDTEHLVYHNTTRFL

```

シグナル配列: アミノ酸 1-35

膜貫通ドメイン: アミノ酸 466-483

N-グリコシル化部位: アミノ酸 66-70;235-239;523-527

N-ミリスチル化: アミノ酸 29-35;43-49;161-167;
212-218;281-287;282-288;
285-291;310-316;313-319;
422-428;423-429;426-432

細胞接着部位: アミノ酸 193-199

糖鎖トリアシンインヒビター (クニッツ)ファミリーシグネチャ:
アミノ酸 278-298;419-438

【特許請求の範囲】

【請求項1】 製薬的に許容可能な担体との混合物である、PRO256ポリペプチド、或いはそのアゴニスト又はアンタゴニストを含んでなる組成物。

【請求項2】 (1) 製薬的に許容可能な担体との混合物である、(a) PRO256ポリペプチド、(b) PRO256ポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PRO256ポリペプチドのアンタゴニストを含んでなる組成物；

(2) 前記組成物を含有する容器；及び

(3) 心臓血管、内皮、及び血管形成疾患の治療における、前記組成物の使用について言及する前記容器に添付した標識、又は前記容器に包含されている包装挿入物を含んでなる製造品。

【請求項3】 (a) 通常はPRO256ポリペプチドによって誘導される細胞応答の誘発に適した条件の下で、細胞とスクリーニングされる被験化合物を接触させること；並びに(b) 前記細胞応答の誘導が、前記被験化合物が効果的なアゴニストであることを示している、被験化合物が効果的なアゴニストであるか否かを決定するために前記細胞応答の誘導を測定することを含んでなる、PRO256ポリペプチドのアゴニストを同定する方法。

【請求項4】 通常は前記ポリペプチドによって誘導される細胞応答が細胞増殖の阻害である、請求項3の方法。

【請求項5】 被験化合物とポリペプチドを接触させ、前記ポリペプチドの活性が阻害されるか否かを決定することを可能にならしめるのに十分な時間及び条件の下で、被験化合物とPRO256ポリペプチドを接触させることを含んでなる、PRO256ポリペプチドの活性を阻害する化合物を同定する方法。

【請求項6】 (a) 通常は前記ポリペプチドによって誘導される細胞応答の誘発に適した条件の下で、細胞とスクリーニングされる被験化合物を接触させること；並びに(b) 被験化合物が効果的なアンタゴニストであるか否かを決定するために前記細胞応答の誘導を測定する段階を含んでなる、PRO256ポリペプチドの活性を阻害する化合物を同定する方法。

【請求項7】 通常は前記ポリペプチドによって誘導される細胞応答が細胞増殖の阻害である、請求項6の方法。

【請求項8】 ポリペプチドを通常は発現する細胞でのPRO256ポリペプチドの発現を阻害する化合物を同定する方法であって、前記ポリペプチドの発現を可能にする適切な条件の下で細胞と被験化合物を接触させ、そして前記ポリペプチドが阻害されるかどうかを決定することを含む方法。

【請求項9】 PRO256ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞における、前記ポリペプチドの発現を阻害する化合物。

【請求項10】 前記化合物がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項9の化合物。

【請求項11】 PRO256ポリペプチドと特異的に結合する単離された抗体。

【請求項12】 前記抗体が、他の任意のポリペプチド又はポリペプチドエピトープと実質的に結合せずに、前記ポリペプチド又は前記ポリペプチド上のエピトープと特異的に結合する、請求項11の単離された抗体。

【請求項13】 モノクローナル抗体、抗体断片、一本鎖抗体、又はヒト化抗体である、請求項12の抗体。

【請求項14】 PRO256ポリペプチドコード化核酸配列中の変異の存否が、PRO256ポリペプチドコード化核酸配列中の変異に関連する疾患の存在、又は前記疾患に対する感受性を示す、前記ポリペプチドコード化核酸配列での前記変異の存否を確定することを含んでなる、前記ポリペプチドコード化配列中の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。

【請求項15】 コントロール試料と比較して、被験試料での高い又は低い発現レベルが、哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す、(a)前記哺乳動物から得られた組織細胞の被験試料、(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PRO256ポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを分析することを含む、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。

【請求項16】 被験試料中のPRO256ポリペプチドの存否が、哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す、前記哺乳動物から得た組織細胞の被験試料でのPRO256ポリペプチドの存否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。

【請求項17】 抗-PRO256抗体とPRO256ポリペプチドとの複合体の形成が、哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を示す、(a) 抗-PRO256抗体と哺乳動物から得られた組織細胞の被験試料を接触させ、そして(b) 被験試料中での前記抗体とPRO256ポリペプチドの間の複合体の形成を検出することを含んでなる、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。

【請求項18】 PRO256ポリペプチドを含有すると思われる試料と抗-256抗体を接触させ、そして前記抗体と前記試料の成分の結合を確定することを含んでなる、PRO256ポリペプチドの存在を測定する方法。

【請求項19】 抗-PRO256抗体及び適切な挿入物の担体を含んでなる、心臓血管、内皮又は血管形成疾患診断キット。

【請求項20】 哺乳動物へPRO256ポリペプチド、或いはそのアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量を投与することを含んでなる、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。

【請求項21】 哺乳動物がヒトである、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 ヒトが心臓肥大、外傷、腫瘍の一型、又は加齢性黄斑変性である、請求項20の方法。

【請求項23】 PRO256ポリペプチドを心臓血管、内皮又は血管形成剤とともに投与する、請求項20の方法。

【請求項24】 PRO256ポリペプチドを、化学療法剤、成長阻害剤又は細胞障害性剤との組み合わせで投与する、請求項23の方法。

【請求項25】 PRO256ポリペプチド、或いはそのアゴニスト又はアンタゴニストをコードする核酸分子を哺乳動物へ投与することを含んでなる、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。

【請求項26】 哺乳動物がヒトである、請求項25の方法。

【請求項27】 核酸分子をエキソビボ遺伝子治療を通して投与する、請求項25の方法。

【請求項28】 レトロウイルスベクターがレトロウイルス構造タンパク質と

関連している、(1)プロモーター、(2)PRO256ポリペプチド、或いはそのアゴニスト又はアンタゴニストをコードする核酸、並びに(3)ポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列で基本的に構成されるレトロウイルスベクターを含んでなる組み換えレトロウイルス粒子。

【請求項29】 エキソビボ生産細胞が、組み換えレトロウイルス粒子を生産するために構造タンパク質と関連するレトロウイルスベクターを詰め込んでおり、レトロウイルス構造タンパク質を発現し、そして(1)プロモーター、(2)PRO256ポリペプチド、或いはそのアゴニスト又はアンタゴニストをコードする核酸、並びに(3)ポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列で基本的に構成されるレトロウイルスベクターをも含む核酸構成成分を含んでなるエキソビボ生産細胞。

【請求項30】 哺乳動物での内皮細胞成長が阻害される、前記哺乳動物へPRO256ポリペプチド又はそのアゴニストの治療的有効量を投与することを含んでなる、哺乳動物での内皮細胞成長を阻害する方法。

【請求項31】 哺乳動物での内皮細胞成長が刺激される、前記哺乳動物へPRO256ポリペプチドのアンタゴニストの治療的有効量を投与することを含んでなる、哺乳動物での内皮細胞成長を刺激する方法。

【請求項32】 血管成長が阻害される、哺乳動物へPRO256ポリペプチド又はそのアゴニストの治療的有効量を投与することを含んでなる、哺乳動物での血管成長を阻害する方法。

【請求項33】 血管成長が刺激される、哺乳動物へPRO256ポリペプチドのアンタゴニストの治療的有効量を投与することを含んでなる、哺乳動物での血管成長を刺激する方法。

【請求項34】 プロテアーゼが阻害される、哺乳動物へPRO256ポリペプチド又はそのアゴニストの治療的有効量を投与することを含んでなる、哺乳動物の肝細胞成長因子のプロテアーゼ活性を阻害する方法。

【請求項35】 前記哺乳動物が心臓血管、内皮又は血管新生疾患を有する、請求項34の方法。

【請求項36】 プロテアーゼが刺激される、哺乳動物へPRO256ポリペ

プチドのアゴニストの治療的有効量を投与することを含んでなる、哺乳動物の肝細胞成長因子アクチベーターのプロテアーゼ活性を刺激する方法。

【請求項37】 前記哺乳動物が心臓血管、内皮又は血管形成疾患を有する、請求項36の方法。

【請求項38】 前記心臓血管、内皮又は血管形成疾患が、末梢血管疾患、肝臓又は腎臓損傷又は再狭窄疾患である、請求項37の方法。

【請求項39】 配列番号：2に示したアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に対して、少なくとも80%の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項40】 配列番号：1に示したヌクレオチド配列に対して、少なくとも80%の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項41】 ATCC寄託番号209379で寄託したDNAの完全長コード化配列に対して、少なくとも80%の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項42】 請求項39の核酸を含んでなるベクター。

【請求項43】 ベクターで形質転換した宿主細胞によって認識されるコントロール配列と作用可能に連結した請求項42のベクター。

【請求項44】 請求項42のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項45】 前記細胞がCHO細胞、大腸菌、酵母細胞又はバキュロウィルス感染昆虫細胞である、請求項44の宿主細胞。

【請求項46】 PRO256ポリペプチドの発現に適切な条件の下で請求項44の宿主細胞を培養し、細胞培養から前記ポリペプチドを回収することを含んでなる、PRO256ポリペプチドを生産する方法。

【請求項47】 配列番号：2に示したようなアミノ酸配列に対して、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

【請求項48】 ATCC寄託番号2093379で寄託したDNAの完全長コード化配列によってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

【請求項49】 異種アミノ酸配列と融合した請求項47のポリペプチドを含んでなるキメラ分子。

【請求項50】 前記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列である、請求項49のキメラ分子。

【請求項51】 前記異種アミノ酸配列がイムノグロブリンのFc領域である、請求項49のキメラ分子。

【請求項52】 請求項47のポリペプチドと特異的に結合する抗体。

【請求項53】 (a) その結合するシグナルペプチドを欠く、配列番号：2に示したポリヌクレオチドをコードするヌクレオチド配列；(b) その結合するシグナルペプチドを有する、配列番号：2に示したポリペプチドの細胞外ドメインをコードするヌクレオチド配列；或いは(c) その結合するシグナルペプチドを欠く、配列番号：2に示したポリペプチドの細胞外ドメインをコードするヌクレオチド配列に対して、少なくとも80%の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項54】 (a) その結合シグナルペプチドを欠く、配列番号：2に示したポリペプチド；(b) その結合シグナルペプチドを有する配列番号：2に示したポリペプチドの細胞外ドメイン；或いは(c) その結合シグナルペプチドを欠く、配列番号：2に示したポリペプチドの細胞外ドメインに対して、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

【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/又は心臓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、心臓血管障害並びに発癌性疾患の診断及び治療を含む。

【0002】

(背景の記載)

A. 心臓疾患と因子

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、慢性の心不全が発症した患者数を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から872,000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、運動耐性(exercise tolerance)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、心臓が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が不可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種の主要な代償機構が、心不全の場合に心拍出量の上昇のために活性化される。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、心臓に直接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臓肥大、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】

肥大は一般に、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定義されている。心臓肥大は、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。心臓肥大は、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)。心臓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等, FASEB J., 5: 3037-3046(1991); Chien等, Annu. Rev. Physiol., 55: 75-95(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等, Cardiovasc. Res., 11: 554-558(1977); Schwarz等, Am. J. Cardiol., 42: 895-903(1978); Hess等, Circulation, 63: 360-371(1981); Pearlman等, 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、心臓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。Metcalfe, Growth Factors, 7: 169-173(1992); Kurzrock等, Endocrine Reviews, 12: 208-217(1991); Inoue等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2863-2867(1989); Yanagisawa及び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)。心臓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等, 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、心臓肥大の治療法は、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、 β -アドレナリン様レセプターブロッカー(β -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 β -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等, Br. Heart J., 44: 488-98(1980); Harrison等, 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等, 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等, Circulation, 65: 499-507(1982); Betocchi等, 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等, 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臓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)インヒビター、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 (methylchlorthiazide)、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回帰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回帰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陽性変力剤は、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. Opin. in Cardiology*, 12:209-217(1997)；Reddy等, *Curr. Opin. Cardiol.*, 12:233-241(1997)。近年、 β -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5,935,924号；同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、及び他の病気に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(ACE)インヒビター、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、CHF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、ACEインヒビター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、ACEインヒビターは末期心不全への進行を遅延させるようであり、ACEインヒビターを用いた患者のかなりの数が機能クラスIII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インヒビターにより、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】

また、ACEインヒビターの代替物は特定のAT1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/AngII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」モデルを、個々の成分の経路を試験するために作製した。このような一つのモデルにおいては、AngIIに対する主要な心臓レセプター、ATsub1Aが遺伝学的に欠失されており；これらのマウスは、AngIIが実験的に付与された場合に肥大を発現しない(AngII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インヒビター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

クチペータ(t-P A)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、KHRR(296-299)AAAA 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】

B. 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及び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EP471,754B。

【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、対照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形成が、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、眼新血管形成症候群、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)、新血管形成緑内障、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, 編, 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)。新血管形成により、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。We

idner等, N. Engl. J. Med. 324 : 1-6(1991) ; Horak等, Lancet, 340 : 1120-1124(1992) ; Macchiarini.等, Lancet, 340 : 145-146(1992)。

【 0 0 2 2 】

血管形成の正の調節因子の探索により、a F G F、b F G F、T G F-₁、T G F-₂、肝細胞成長因子(H G F)、T N F- α 、アンジオゲニン、I L - 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))、アンギオスタチン(angiotatin)(O'Reilly等, Cell, 79 : 315-328(1994))及びエンドスタチン(endostat in)が含まれる。O'Reilly等, Cell, 88 : 277-285(1996)。

【 0 0 2 3 】

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V E G F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V E G F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、V E G Fは腫瘍及び眼内疾患に関連した新血管形成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。V E G F m R N A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)。

【 0 0 2 4 】

また、眼の流体中のV E G F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、A M Dの影響を受けている患者の脈絡膜新生血管膜にV E G F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作用に対する他のインヒビターは、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EP817,648及び1998年10月15日に公開されたW098/45331及びW098/45332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マイトジェンが存在する。Lau及びNathans. *Molecular Aspects of Cellular Regulation*, 6 : 165-202(1991)。前初期遺伝子又は初期応答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、成長因子又はマイトジェンと接触後数分間で転写的に活性化される。これらの中間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。

付加的なマイトジェンとして、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)との複合体において、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、成長因子媒介性マイトジェン活性におけるI G F B Pの阻害効果が示されている。

【0029】

その他の重要なマイトジェンである肝細胞成長因子(H G F)は、ヒト及びげっ歯動物において、初代培養で肝細胞の完全なマイトジェンとして機能し、肝臓再生で生理学的な役割を担うことが報告されている(概説として、Michalopoulos, G., FASEB, 4: 176-187(1990)を参照のこと)。ごく最近、肝細胞成長因子(H G F)がメラニン細胞、腎尿細管細胞、角化細胞、特定の内皮細胞及び上皮起源の細胞を含む種々の細胞型のマイトジェンであることが示されている(Igawaら., Biochem. Biophys. Res. Commun., 174:831-838(1991); Kanら., Biochem. Biophys. Res. Commun., 174: 331-337(1991); Matsumoto ら., Biochem. Biop

hys. Res. Commun., 176: 45-51(1991); Rubinら., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A., 88: 415-419(1991)。肝細胞成長因子(HGF)は、インビトロで上皮細胞と血管内皮細胞の分離を促進する活性、「散乱因子(scatter factor)」としても作用する(Strokerら., Nature 327:239-242(1987); Weidnerら., J. Cell Biol., 111: 2097-2108(1990); Naldiniら., EMBO J., 10: 2867-2878(1991a))。さらには、肝細胞成長因子(HGF)は、上皮性モルフォゲンとして記載されている(Montesanoら., Cell, 67: 901-908(1991))。従って、HGFは、腫瘍の浸潤及び胚発生において重要であるとみなされている。HGFは、生産細胞から不活性な一本鎖前駆体として分泌される、間葉から誘導されたヘパリン結合糖タンパク質であり、通常はこの形態で存在し、おそらくは生産細胞の細胞外マトリックスと結合している。肝臓及び腎傷害のような組織傷害への応答では、もっぱら損傷組織において、この不活性一本鎖形態は、単一の部位における限定タンパク質分解によって、活性化ヘテロ二量体分子へ変換される。Miyazawaら., J. Biol. Chem., 269: 8966-8970(1994)。HGFが、肝細胞及び腎尿細管上皮細胞のような種々の細胞の潜在的なマイトジェンであるために、タンパク質加水分解的に活性化HGFは、損傷組織の再生に関与し得る。Gohdaら., J. Clin. Invest., 81: 414-419(1988); Igawaら., Biochem. Biophys. Res. Commun. 174: 831-838(1991)、及びRubinら., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 415-419(1991)。HGFアクチベーターの活性化ポテンシャルは、HAI又はHGFアクチベーターのインヒビターとして知られている組織誘導インヒビターの活性によって中和され得る。損傷組織のHAIのキャラクタリゼーションは、HGFの活性化を制御するメカニズムを理解するために必要である。Shimomuraら., J. Biol. Chem., 272: 6370-6376(1997)。加えて、HGFアクチベーターインヒビター(HAI)のアゴニストは、血管形成を阻害する役割を担い得るし、ヒト腫瘍成長を抑制することで固形腫瘍を治療するために有用である。更には、HGFアクチベーターインヒビター(HAI)に対するアンタゴニストは、血管形成又は組織修復を促進する役割を担い得るし、よって、末梢血管疾患、肝臓又は腎臓損傷、又は再狭窄徴候の何れかの治療的再血管形成にとって重要である得る。

C. 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。

【0031】

(発明の概要)

A. 実施態様

従って、本発明は、哺乳類における血管形成及び/又は心臓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。本発明は、ある種の生物学的活性の促進又は阻害を試験する種々の心臓血管アッセイにおいて陽性を試験するタンパク質の同定に基づく。従って、血管形成の促進又は阻害、血管内皮細胞成長の阻害又は刺激、血管内皮細胞の成長又は増殖の刺激、腫瘍成長の阻害、血管形成依存性組織成長の阻害、血管形成依存性組織成長の刺激の治療等の効果が望まれているところでは、当該タンパク質インヒビター及びアゴニスト又はアンタゴニストは、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。

【0032】

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たPRO256ポリペプチドを含んでなる組成物を提供する。一側面では、組成物は治療的有效量のポリペプチドを含有する。他の側面では、組成物はさらなる活性成分、すなわち、心臓血管、内皮又はアンギオスタチック(angiostatic)薬、好ましくは血管形成又はアンギオスタチック(angiostatic)薬を含有する。好ましくは組成物は無菌である。PRO256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PRO256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。

【0033】

さらなる実施態様において、本発明は、製薬的に許容される担体と、治療的有効量のPRO256ポリペプチドとの混合物を含有する、心臓血管、内皮又は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。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は腫瘍である。

他の実施態様において、本発明は、製薬的に許容される担体と混合された、PRO256ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを含有する組成物を提供する。好ましくは、PRO256ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストは、抗-PRO256抗体である。一側面では、組成物はアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量を含有する。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、内皮又は血管形成薬又はアンギオスタチック薬、好ましくは血管形成又はアンギオスタチック薬を含有する。好ましくは組成物は無菌である。PRO256ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストは、液状の製薬調製物の形態で投与してもよく、貯蔵時の安定性の延長が達成されるように保存されてよい。保存された液状の製薬調製物は複数投与量のPRO256ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト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。

さらなる実施態様において、本発明は、製薬的に許容される担体と、PRO256ポリペプチド、或いはそのアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量の混合物を含有する、心臓血管、内皮又は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。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は腫瘍である。

【0034】

また他の実施態様において、本発明は、製薬的に許容される担体と混合物された、抗-PRO256抗体を含有する組成物に関する。一側面において、組成物は治療的有効量の抗体を含有する。その他の側面において、組成物はさらなる活

性成分、すなわち、心臓血管、内皮又は血管形成薬又はアンギオスタチック薬、好ましくは血管形成又はアンギオスタチック薬を含有する。好ましくは組成物は無菌である。組成物は、液状の製薬調製物の形態で投与してもよく、貯蔵時の安定性の延長が達成されるように保存されてもよい。保存された液状の製薬調製物は複数投与量の抗-PRO256抗体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。好ましい実施態様において、抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、ヒト化抗体又は一本鎖抗体である。

さらなる実施態様において、本発明は製薬的に許容される担体と、治療的有效量の抗-PRO256抗体との混合物を含有する、心臓血管、内皮又は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。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は腫瘍である。

【0035】

またさらなる態様において、本発明は：

- (a) PRO256ポリペプチド又はそのアゴニスト或いはアンタゴニストを含む物質の組成物；
- (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PRO256ポリペプチドの使用を記した、該容器に添付される標識又は当該容器に収納される包装挿入物を具備する製造品を提供し、前記アゴニスト又はアンタゴニストはPRO256ポリペプチドに結合する抗体であってよい。当該組成物は、治療的有效量のPRO256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んでいてよい。

【0036】

他の実施態様において、本発明は、PRO256ポリペプチドのアゴニストを同定する方法を提供し、それは：

- (a) 細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、PRO256ポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ；そして
- (b) 前記細胞性反応の誘発を測定して、試験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んでなり、前記細胞性反応の誘発が前記試験化合物

が有効なアゴニストであることを示す。

他の実施態様において、本発明は、PRO256ポリペプチドのアゴニストを同定する方法を提供し、それは：

(a) 細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、PRO256ポリペプチドによる細胞増殖の刺激に適した条件下で接触させ；そして

(b) 前記細胞の増殖を測定して、試験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んでなり、当該細胞増殖の阻害が前記試験化合物が有効なアゴニストであることを示す。

【0037】

他の実施態様では、本発明はPRO256ポリペプチドの活性を阻害する化合物の同定方法を提供し、それは、試験化合物をPRO256ポリペプチドと、試験化合物とポリペプチドとが相互作用するのに十分な条件及び時間で接触させ、PRO256ポリペプチドの活性が阻害されるか否かを測定することを含む。特に好ましい態様では、試験化合物又はPRO256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、非固定化成分は検出可能な標識を担持する。好ましい態様では、この方法は：

(a) 細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、PRO256ポリペプチドの存在下で、PRO256ポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ；そして

(b) 前記細胞性反応の誘発を測定して、試験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。

他の好ましい態様においては、この方法は：

(a) 細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、PRO256ポリペプチドの存在下で、PRO256ポリペプチドによる細胞増殖の刺激に適した条件下で接触させ；そして

(b) 前記細胞の増殖を測定して、試験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み、細胞増殖の刺激が試験化合物が有効なアンタゴニストであることを示す。

【0038】

他の実施態様では、本発明は、通常は、ポリペプチドを発現する細胞における P R O 2 5 6 ポリペプチドの発現を阻害する化合物の同定方法を提供し、当該方法は、細胞と試験化合物とを接触させ、P R O 2 5 6 ポリペプチドの発現が阻害されるか否かを測定することを含む。好ましい側面では、この方法は：

(a)細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを P R O 2 5 6 ポリペプチドを発現させるのに適した条件下で接触させ；そして

(b)前記ポリペプチドの発現の阻害を測定する工程を含む。

またさらなる実施態様では、本発明は、前掲の方法により同定された化合物等の、P R O 2 5 6 ポリペプチドの発現を阻害する化合物を提供する。

【0039】

本発明の他の態様は、前掲の方法により同定されてもよい P R O 2 5 6 ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストに向けられる。

P R O 2 5 6 ポリペプチドの一又は複数の機能又は活性を阻害する P R O 2 5 6 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 P R O 2 5 6 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(C D R)残基及びヒトフレームワーク領域(F R)残基を有する。抗体は標識されていても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、又はヒト化抗体である。好ましくは、抗体はポリペプチドに特異的に結合する。

【0040】

よりさらなる側面では、本発明は、P R O 2 5 6 ポリペプチド-コード化核酸配列の変異に関連する疾患又はこれに対する感受性を診断する方法を提供し、これには P R O 2 5 6 ポリペプチド核酸配列における前記変異の存在の有無を確かめることが含まれており、前記変異の存在の有無が、前記疾患の存在、或いは前記疾患に対する感受性を示す。

またさらなる側面において、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診断する方法を提供し、それは、(a)前記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対照試料にお

けるPRO256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、対照試料に比較した場合の試験試料中の発現レベルの高低が、前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す。PRO256ポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、場合によっては、対照試料と比較した際の試験試料中のmRNA又はポリペプチドのレベルの測定によってなされてもよい。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は腫瘍である。

またさらなる態様において、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診断する方法を提供し、それは、前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料におけるPRO256ポリペプチドの存在の有無を検出することを含んでなり、前記試験試料における前記PRO256ポリペプチドの有無が前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は腫瘍である。

【0041】

またさらなる態様では、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診断する方法を提供し、それは、(a)哺乳動物から得た組織細胞の試験試料を抗-PRO256抗体と接触させ、そして(b)試験試料中での抗体とPRO256ポリペプチドとの複合体の形成を検出することを含んでなり、前記複合体の形成が前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す。検出は、定性的でも定量的でもよく、同じ細胞型の公知の正常組織細胞の対照試料における複合体形成のモニタリングと比較して実施してもよい。試験試料で形成された複合体の量の多少が、試験組織細胞を得た哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成不全の存在を示す。抗体は、好ましくは検出可能な標識を担持している。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、又はこの分野で知られた他の技術によって監視できる。試験試料は通常、心臓血管、内皮又は血管形成疾患を持つと推定される個体から得る。

他の実施態様では、本発明は、試料中のPRO256ポリペプチドの存在を測定する方法を提供し、それは、PRO256ポリペプチドを含有すると推測される試料を抗-PRO256抗体と曝露させ、前記抗体の前記試料の成分への結合を測定することを含んでなる。特別な態様では、試料はPRO256ポリペプチ

ドを含むと推定される細胞を含み、抗体は細胞に結合する。抗体は、好ましくは検出可能に標識され及び/又は固体支持体に固定化される。

【0042】

さらなる態様において、本発明は、抗-PRO256抗体と担体とを適切な包装内に具備してなる心臓血管、内皮又は血管形成疾患の診断キットを提供する。好ましくは、そのようなキットは、前記抗体をPRO256ポリペプチドの存在の検出に使用するための指示書をさらに具備する。好ましくは、担体は例えばバッファーである。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は腫瘍である。

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を提供し、それは、PRO256ポリペプチドの有効量を哺乳動物に投与することを含んでなる。好ましくは、疾患は腫瘍である。さらなる側面では、心臓血管、内皮又は血管形成疾患が腫瘍である場合、さらに化学療法剤のような内皮又は血管形成疾患を治療する薬剤に哺乳動物を曝露する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

その他の好ましい実施態様では、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は腫瘍であり、PRO256ポリペプチドは、化学療法剤、成長阻害剤又は細胞障害性剤との組み合わせで投与される。

【0043】

さらなる実施態様において、本発明は、哺乳動物の心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療方法に関し、それは、PRO256ポリペプチドのアゴニストの有効量を哺乳動物に投与することを含んでなる。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は、腫瘍である。また、好ましくは哺乳動物はヒトであり、有効量の血管形成又はアンギオスタチック薬はアゴニストと共に投与される。

さらなる実施態様において、本発明は、哺乳動物の心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療方法に関し、それは、PRO256ポリペプチドの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んでなる。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は、末梢血管疾患、肝臓又は腎臓損傷、或いは再狭窄徴候である。また、好ましくは哺乳動物はヒトであり、有効量の血管形成又はアンギオスタチック薬はアンタゴニストと共に投与される。

さらなる実施態様において、本発明は、哺乳動物の心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療方法に関し、それは、抗-PRO256抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含んでなる。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は、アゴニスト抗-PRO256抗体を投与する場合は腫瘍であり、或いはアンタゴニスト抗-PRO256抗体を投与する場合は末梢血管疾患、肝臓又は腎臓損傷、或いは再狭窄徴候である。また、好ましいのは、哺乳動物がヒト、そして有効量の血管形成又はアンギオスタチック薬がアゴニスト又はアンタゴニスト抗体と共に投与される場合である。

【0044】

さらなる実施態様において、本発明は、心臓血管、内皮又は血管形成疾患を患っている哺乳動物における、その疾患の治療方法を提供し、それは、(a)PRO256ポリペプチド、(b)PRO256ポリペプチドのアゴニスト、又は(c)PRO256ポリペプチドのアンタゴニストのいずれかをコードする核酸分子を哺乳動物に投与することを含んでなり、ここで前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-PRO256抗体であってよい。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。

さらなる他の態様において、本発明は、プロモータ、(a)PRO256ポリペプチド、(b)PRO256ポリペプチドのアゴニストポリペプチド、又は(c)PRO256ポリペプチドのアンタゴニストポリペプチドをコードする核酸分子、並びに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で構成されるレトロウイルスベクターを含んでなる組換えレトロウイルス粒子を提供し、ここでレトロウイルスベクターはレトロウイルス構造タンパク質と関連している。好ましくは、シグナル配列は哺乳動物、例えば天然PRO256ポリペプチドからのものである。

また、さらなる実施態様において、本発明は、レトロウイルス構造タンパク質を発現する核酸構造体を含む、プロモータ、(a)PRO256ポリペプチド、

(b) PRO256ポリペプチドのアゴニストポリペプチド、又は(c) PRO256ポリペプチドのアンタゴニスト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イルスベクターをさらに含有するエキソビボ産生細胞(producer cell)を提供し、ここで前記産生細胞は、組換えレトロウイルス粒子を生産する構造タンパク質と関連するレトロウイルスベクターを包含する。

【0045】

また他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の内皮細胞の成長を阻害する方法を提供し、それは(a) PRO256ポリペプチド、(b) PRO256ポリペプチドのアゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなり、当該哺乳動物の内皮細胞の成長は阻害され、前記アゴニストは抗-PRO256抗体であってよい。好ましくは、哺乳動物はヒトであり、内皮細胞の成長は腫瘍又は網膜疾患に関連している。

また他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の内皮細胞の成長を刺激する方法を提供し、それはPRO256ポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物へ投与することを含んでなり、前記哺乳動物の内皮細胞の成長が刺激され、前記アンタゴニストは抗-PRO256抗体であってよい。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

また他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の血管形成を阻害する方法を提供し、それは(a) PRO256ポリペプチド、又は(b) PRO256ポリペプチドのアゴニスト、の治療的有効量を哺乳動物に投与することを含んでなり、前記哺乳動物の血管形成が阻害される。好ましくは、哺乳動物はヒトであり、そしてより好ましくは、哺乳動物は腫瘍又は網膜疾患を有する。

【0046】

さらにその他の実施態様では、本発明は、哺乳動物の血管形成を刺激する方法を提供し、それはPRO256ポリペプチドのアンタゴニストの治療的有効量を哺乳動物へ投与することを含んでなり、前記哺乳動物の血管形成は刺激される。好ましくは、哺乳動物はヒトであり、より好ましくは、血管形成は組織再生、外傷治癒を促進し、或いは末梢血管疾患、肝臓又は腎臓損傷、又は再狭窄徴候の治

療的再血管形成において有用である。

また他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の肝細胞成長因子アクチベーターのプロテアーゼ活性を阻害する方法を提供し、それは哺乳動物に(a)PRO256ポリペプチド、又は(b)PRO256ポリペプチドのアゴニストを投与することを含んでなり、前記プロテアーゼ活性が阻害され、そして前記アゴニストは抗-PRO256抗体であってよい。好ましくは、哺乳動物はヒトであり、より好ましくは、哺乳動物は腫瘍又は網膜疾患を有する。

さらにその他の実施態様では、本発明は、哺乳動物における肝細胞成長因子アクチベーターのプロテアーゼ活性を刺激する方法を提供し、それはPRO256ポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物へ投与することを含んでなり、前記プロテアーゼ活性は刺激され、そして前記アンタゴニストは抗-PRO256抗体であってよい。好ましくは、哺乳動物はヒト、そしてより好ましくは、哺乳動物は末梢血管疾患、肝臓又は腎臓損傷又は再狭窄徴候を有する。

【0047】

B. さらになる実施態様

本発明の他の態様において、本発明はPRO256ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。

一側面では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示した完全長アミノ酸配列、ここに開示したシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示したシグナルペプチドを有する又は有しない膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、ここに開示したシグナルペプチドを有する又は有しない膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示した完全長アミノ酸配列の任意の他の具体的に特定された断片を有するPRO256ポリペプチドをコードするDNA分子、或いは(b)(a)のDNA分子の補体に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは

少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そしてあるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0048】

一側面では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示した完全長PRO256ポリペプチドcDNAのコード化配列、ここに開示したシグナルペプチドを欠くPRO256ポリペプチドのコード化配列、ここに開示したシグナルペプチドを有する又は有しない膜貫通PRO256ポリペプチドの細胞外ドメインのコード化配列、又はここに開示した完全長アミノ酸配列の任意の他の具体的に特定された断片のコード化配列を含んでなるDNA分子、或いは(b)(a)のDNA分子の補体に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そしてあるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0049】

さらなる側面では、本発明は、(a)ここに開示のATCCに寄託したヒトタンパク質cDNAにコードされるのと同じ成熟ポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の補体に対して少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子に関する。

【0050】

本発明のその他の態様は、膜貫通ドメインが欠失しているか又は膜貫通ドメインが不活性化されているかのいずれかであるPRO256ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、又はそのようなコード化ヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供し、そのようなポリペプチドの膜貫通ドメインはここに開示される。従って、ここに記載されるPRO256ポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考慮される。

【0051】

他の実施態様はPRO256ポリペプチドコード化配列の断片、又はその補体に向けられ、それらは、例えば、場合によっては抗-PRO256抗体に対する結合部位を含むポリペプチドをコードするPRO256ポリペプチドのコード化断片のハイブリッド形成プローブとして、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとしての用途が見いだされる。このような核酸断片は、通常は少なくとも

も約20ヌクレオチド長、あるいは約30ヌクレオチド長、あるいは約40ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約50ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約60ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約70ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約80ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約90ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約100ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約110ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約120ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約130ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約140ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約150ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約160ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約170ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約180ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約190ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約200ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約250ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約300ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約350ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約400ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約450ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約500ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約600ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約700ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約800ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約900ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約1000ヌクレオチド長であり、ここで「約」という語の内容は参照する長さのプラス又はマイナス10%の参照するヌクレオチド配列長を意味する。PRO256ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、多くの良く知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを用いてPRO256ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列と他の公知のヌクレオチド配列とを整列させ、いずれのPRO256ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することにより、日常的な手法で同定してもよい。このようなPRO256ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列は全てここで考慮される。また、これらのヌクレオチド分子断片、好ましくは抗-PRO256抗体に対する結合部位を含むPRO256ポリペプチド断片によってコードされるPRO256ポリペプチド断片も考慮される。

【0052】

他の実施態様では、本発明は、上記で同定された単離された核酸配列の任意の

ものにコードされる単離されたPRO256ポリペプチドを提供する。

ある側面では、本発明は、ここに開示した完全長アミノ酸配列、ここに開示したシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示したシグナルペプチドを有するか又は有しない膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、或いはここに開示した完全長アミノ酸配列の任意の他の具体的に特定された断片を有するPRO256ポリペプチドに対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたPRO256ポリペプチドに関する。

【0053】

さらなる態様では、本発明は、ここに開示のATCCに寄託したヒトタンパク質cDNAによってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の

アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する含んでなる単離されたPRO256ポリペプチドに関する。

【0054】

特別な実施態様では、本発明は、N-末端シグナル配列及び/又は開始メチオンを持たず、上記したようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされる単離されたPRO256ポリペプチドを提供する。それらを製造する方法もここに記載され、それらの方法は、適当なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞をPRO256ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、培養培地からPRO256ポリペプチドを回収することを含む。

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインの欠失した又は膜貫通ドメインが不活性化したかいずれかの単離されたPRO256ポリペプチドを提供する。それらを製造する方法もここに記載され、それらの方法は、適当なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞をPRO256ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、培養培地からPRO256ポリペプチドを回収することを含む。

さらに他の実施態様では、本発明は、ここで定義される天然PRO256ポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストに関する。特別な実施態様では、アゴニスト又はアンタゴニストは抗-PRO256抗体又は小分子である。

さらなる実施態様では、本発明は、PRO256ポリペプチドに対するアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法に関し、それは、PRO256ポリペプチドを候補分子と接触させ、前記PRO256ポリペプチドによって媒介される生物学的活性を監視することを含む。好ましくは、PRO256ポリペプチドは天然PRO256ポリペプチドである。

【0055】

またさらなる実施態様では、本発明は、担体との組み合わせであるPRO256ポリペプチド、又はここに記載したPRO256ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-PRO256抗体を含んでなる物質の組成物に関する。場合によっては、担体は製薬的に許容される担体である。

本発明の他の実施態様は、PRO256ポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-PRO256抗体に対して応答性のある症状の治療に有用な薬剤の調製のための、PRO256ポリペプチド、又は上記したそのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-PRO256抗体に関する。

本発明のさらなる実施態様では、本発明は、ここに記載した任意のポリペプチドをコードするDNAを含んでなるベクターを提供する。そのような任意のベクターを含む宿主細胞も提供される。例として、宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又はバキュロウイルス感染昆虫細胞であってよい。ここに記載する任意のポリペプチドの製造方法がさらに提供され、それは、宿主細胞を所望のポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培地から所望のポリペプチドを回収することを含む。

【0056】

他の実施態様では、本発明は、異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合した、ここに記載した任意のポリペプチドを含んでなるキメラ分子を提供する。そのようなキメラ分子の例は、エピトープタグ配列又は免疫グロブリンのFc領域に融合したここに記載の任意のポリペプチドを含む。

他の実施態様では、本発明は、上記又は下記の任意のポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片又は一本鎖抗体である。

さらに他の実施態様では、本発明は、ゲノム及びcDNAヌクレオチド配列又はアンチセンスプローブの単離に有用なオリゴヌクレオチドプローブを提供し、それらのプローブは上記又は下記の任意のヌクレオチド配列から誘導してよい。

【0057】

(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」、「心臓血管、内皮及び血管形成機能不全」、「心臓血管、内皮又は血管形成疾患」及び「心臓血管、内皮又は血管形成機能不全」という用語は相互交換可能に使用され、そして血管それ自体の疾患、例えば動脈、毛細管、静脈、及び/又はリンパ管の疾患のみならず、糖尿病のような血管に作用する全身性の疾患の一部を指す。この創傷には、血管形成及び/又は心臓血管新生を刺激する徴候、及び血管形成及び/又は心臓血管新生を阻害する徴候が含まれている。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は腫瘍である。心臓血管、内皮又は血管形成疾患には、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、腫瘍の一型、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、例えば傷、火傷、及び他に損傷を被った組織、移植固定、瘢痕化、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、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。

【0058】

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、ミオフィブリル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ルを置換し、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。それ故に、その用語は、心臓肥大の発達のきっかけになる生理学的病状、例えば血圧の上昇、大動脈狭窄、又は心筋梗塞も含まれる。

【0059】

「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、種々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終末結果である。

【0060】

「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に結果であると一般的にされている。それは、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2つのタイプ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、影響をう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。

【0061】

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て左心室機能の改善は繰り返されるが、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)。

【0062】

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、 β -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)。 -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。

【0063】

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受けるおそれがある。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の病因に関与していることが、1997年7月22日公開の米国特許第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、及び心臓の手術になる。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。

【0064】

「腫瘍」という用語は、炎症性ではない異常な大量の組織を指し、前から存在する組織の細胞から発生する。腫瘍は、良性（生理学的な役割を担っていないが）、前癌性又は癌性であり得る。

用語「癌」、「癌性」及び「悪性」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、メラノーマ、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、メラノーマ、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、メラノーマ、卵巣癌及び上述に記した血管腫瘍に係るものである。

【0065】

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、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 及び ^{186}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、ピンクリスチン、ピノレルピン、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。

【0066】

「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称する。即ち、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期以外の位置で)阻止する薬剤、例えば、G1停止及びM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ピンカス(ピンクリスチン及びピンブラスチン)、タキソール、及びトポIIインヒビター、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期停止にも波及し、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。

【0067】

「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称し、患者は心臓血管、内皮及び血管形成疾患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(cardiotrophic)、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、急性様式とは異なり連続的な様式での薬剤を投与し、初期の治療効果、例えば抗肥大効果を長時間に渡って維持することを称する。

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、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称する。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。

【0068】

「心臓血管、内皮及び血管形成薬」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 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（商品名）及びMOXONODIN（商品名）、インターフェロン-ガンマ（IFN- γ ）；デス-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、KHRR（296-299）AAA 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 β -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、及びカーベジロール；アンギオテンシン転換酵素（ACE）インヒビター、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、ベラパミル及びニカルジピンが含まれる。この種の好ましい一つのカテゴリーは、心臓肥大、又は心臓肥大の進行におけつ生理学的状態、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。

【0069】

「血管形成薬」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血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、肝細胞成長因子(HGF)、上皮細胞成長因子(EGF)、CTGF及びそのファミリーのメンバー、FGF、及びTGF-及びTGF-が含まれる。

「肝細胞成長因子(HGF)」は、柔組織、上皮及び内皮細胞にとって強力なマイトジェン、モトジェン(motogen)及びモルフォゲンである。

「成熟肝細胞成長因子(HGF)」は、ジスルフィド結合によって結合している重鎖(-鎖)及び軽鎖(-鎖)から成るヘテロ二量体タンパク質である。この二つの鎖は、タンパク質分解性プロセッシングによって一本鎖前駆体(scHGF)から生成される。このプロセッシングは、セリンプロテアーゼによって媒介され、HGFが分裂促進性とモルフォゲン効果を発揮するために必要とする。

「肝細胞成長因子(HGF)アクチベーター」は、肝臓で生成されて分泌され、不活性化チモーゲンとして血液を循環するセリンプロテアーゼを指す。活性化HGFアクチベーターは、損傷組織において、HGFの不活性一本鎖前駆体を生物学的に活性化ヘテロ二量体へ変換する。

「アンギオスタチック薬」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。例としては、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、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。

【0070】

本発明における薬理学的意味で、活性剤、例えばPRO256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、又は抗-PRO256抗体の「治療の有効量」とは、哺乳動物の心臓血管、内皮及び血管形成疾患の治療に有効な量を称するものであり、経験的に決定することができる。

ここで使用される場合、活性剤、例えばPRO256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、又は抗-PRO256抗体の「有効量」とは記載した目的の実行に有効な量を称するものであり、このような量は、所望する効果に応じて経験的に決定することができる。

ここで用いられる用語「PROポリペプチド」及び「PRO」は、直後に数値符号がある場合に種々のポリペプチドを指し、完全な符号（例えば、PRO/数字）は、ここに記載する特定のポリペプチド配列を意味する。ここで使用される「PRO/数字ポリペプチド」及び「PRO/数字」であって、「数字」がここで使用される実際の数値符号として与えられる用語は、天然配列ポリペプチド及び変異体（ここで更に詳細に定義する）を含む。ここに記載されるPRO256ポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、組換え又は合成方法によって調製してもよい。

【0071】

「天然配列PRO256ポリペプチド」は、天然由来の対応するPRO256ポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでいる。このような天然配列PRO256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。「天然配列PRO256ポリペプチド」という用語には、特に、特定のPRO256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)及びその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。本発明の種々の実施態様において、ここに開示される天然配列PRO256ポリペプチドは、添付の図面に示される完全長アミノ酸配列を含む成熟又は完全長天然配列ポリペプチドである。開始及び停止コドンは、図において太字及び下線で示した。しかし、添付の図面に開示したPR

PRO256ポリペプチドは、図面におけるアミノ酸1としてここに命名されるメチオニン残基で始まるように示されているが、図面におけるアミノ酸位置1の上流又は下流に位置する他のメチオニン残基をPRO256ポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いることも考えられるし可能でもある。

【0072】

PRO256ポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ECD」は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しないPRO256ポリペプチドの形態を意味する。通常、PRO256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。本発明のPRO256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。場合によっては、従って、PRO256ポリペプチド細胞外ドメインは、実施例又は明細書で同定されるように膜貫通ドメイン及び/又は細胞外ドメインの境界のいずれかの側から約5を越えないアミノ酸を含んでもよく、シグナルペプチドを伴う又は伴わない、それらのポリペプチド及びそれらをコードする核酸は、本発明で考慮される。

【0073】

ここに開示する種々のPRO256ポリペプチドの「シグナルペプチド」の適切な位置は、添付の図面に示す。しかし、注記するように、シグナルペプチドのC-末端境界は変化しうるが、ここで最初に定義したようにシグナルペプチドC-末端境界のいずれかの側で約5アミノ酸未満である可能性が最も高く、シグナルペプチドのC-末端境界は、そのような型のアミノ酸配列成分を同定するのに日常的に使用される基準に従って同定しうる(例えば、Nielsen等, Prot. Eng. 10: 1-6 (1997)及びvon Heinje等, Nucl. Acids. Res. 14: 4683-4690 (1986))。さらに、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナルペプチドの切断は完全に均一ではなく、一つ以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここに定義されるシグナルペプチドのC-末端境界の何れかの側の約

5 アミノ酸未満内で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

【0074】

「PRO256ポリペプチド変異体」とは、上記又は下記に定義されるように、ここに開示される完全長天然配列PRO256ポリペプチド、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く完全長天然配列PRO256ポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示されたPRO256の細胞外ドメイン、又はここに開示された完全長PRO256ポリペプチドの任意の他の断片に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する活性PRO256ポリペプチドを意味する。このようなPRO256ポリペプチド変異体には、例えば、完全長天然アミノ酸配列のN-又はC-末端において一つ又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたPRO256ポリペプチドが含まれる。通常、PRO256ポリペプチド変異体は、ここに開示される完全長天然配列PRO256ポリペプチド、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く完全長天然配列PRO256ポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示されたPRO256ポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示された完全長PRO256ポリペプチドの任意の他の断片に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、好ましくは少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約9

8%のアミノ酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有している。通常は、PRO256変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、あるいは少なくとも約20アミノ酸長、あるいは少なくとも約30アミノ酸長、あるいは少なくとも約40アミノ酸長、あるいは少なくとも約50アミノ酸長、あるいは少なくとも約60アミノ酸長、あるいは少なくとも約70アミノ酸長、あるいは少なくとも約80アミノ酸長、あるいは少なくとも約90アミノ酸長、あるいは少なくとも約100アミノ酸長、あるいは少なくとも約150アミノ酸長、あるいは少なくとも約200アミノ酸長、あるいは少なくとも約300アミノ酸長、又はそれ以上である。

【0075】

ここに定義されるPRO256ポリペプチドに対してここで同定されている「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、PRO256ポリペプチド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、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegaalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完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、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供されている配列比較プログラムALIGN-2を使用することによって得られる。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、下記の表1に示したソースコードは米国著作権事務所、ワシントン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、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから好適に入手可能であり、下記の表1に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは

、UNIX（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0076】

ここでの目的のためには、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性（あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる）は次のように計算される：

分率 X/Y の100倍

ここで、 X は配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、 Y はBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さ異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた%アミノ酸配列同一性の計算の例としては、表2-3が、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「PRO256」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸配列同一性の計算方法を示す。

【0077】

特に断らない限りは、ここでの全ての%アミノ酸配列同一性値は、上記のようにALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2 (Altschulら, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードでき、又は別な方法で米国国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランドから得ることができる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパス e-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62を含む。

【0078】

アミノ酸配列比較にNCBI-BLAST2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される:

分率 X/Y の100倍

ここで、 X は配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のA及びBのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、 Y はBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

【0079】

さらに、%アミノ酸配列同一性値も、WU-BLAST-2コンピュータプログラム(AITSCHULら, Methods in Enzymology 266: 460-480(1996))を用いて決定してもよい。さらに、殆どのWU-BLAST-2検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する: オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値(T) = 11、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62。ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、(a) WU-BLAST-2によって決定した、天然PROポリペプチドから誘導された配列を有する対象であるPROポリペプチドのアミノ酸配列と対象である比較アミノ酸配列(即ち、PROポリペプチド変異体であってもよい、対象であるPROポリペプチドが比較される配列)の間で一致する同一アミノ酸残基の数を、(b) 対象であるPROポリペプチドの残基の総数で除した商によって決定される。例えば、「アミノ酸配列Bに対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する又は有しているアミノ酸配列Aを含んでなるポリペプチド」という記載では、アミノ酸配列Aが対象である比較アミノ酸配列であり、アミノ酸配列Bが対象であるPROポリペプチドのアミノ酸配列である。

【0080】

「PRO256変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO256変異体核酸配列」とは、下記に定義されるような活性PRO256ポリペプチドをコードする核酸分子、並びにここで開示する完全長天然配列PRO256ポリペプチド配列、ここで開示するシグナルペプチドを欠く完全長天然配列PRO256ポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここで開示するPRO256ポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここで開示する完全長PRO256ポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する核酸分子ことを意味する。通常、PRO256変異体ポリヌクレオチドは、ここで開示する完全長天然配列PRO256ポリペプチド、ここで開示するシグナルペプチドを欠く完全長天然配列PRO256ポリペプチド、シグナルペプチドを有する又は有しないここで開示するPRO256ポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここで開示する完全長PRO256ポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有する。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。

【0081】

通常、PRO256変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約30ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約60ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約90ヌ

クレオチド長、あるいは少なくとも約120ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約150ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約180ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約210ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約240ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約270ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約300ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約450ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約600ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約900ヌクレオチド長、又はそれ以上である。

【0082】

ここで同定されるPRO256ポリペプチドコード化核酸配列に関する「パーセント(%)核酸配列同一性」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、PRO256ポリペプチドコード化核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核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、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供されている配列比較プログラムのALIGN-2を使用することによって得られる。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、下記の表1に示したソースコードは米国著作権事務所、ワシントン 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、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから好適に入手可能であり、下記の表1に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0083】

ここでの目的のために、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Dと

、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cとすることもできる)は次のように計算される:

分率 W/Z の100倍

ここで、 W は配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアの核酸残基の数であり、 Z はDの全核酸残基数である。核酸配列Cの長さがアミノ酸配列Dの長さ異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。%核酸配列同一性の計算の例としては、表4及び5が「比較DNA」と称される核酸配列の「PRO-DNA」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法を示す。

【0084】

特に断らない限りは、ここでの全ての%アミノ酸配列同一性値は上記のようにALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschulら, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードでき、又は別な方法で米国国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランドから得ることができる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパスe-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62を含む。

【0085】

核酸配列比較にNCBI-BLAST2が用いられる状況では、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性(あるいは、与えられた核酸配列Dと、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cとすることもできる)は次のように計算される:

分率 W/Z の100倍

ここで、 W は配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のC及びDのアライン

メントによって同一であると一致したスコアの核酸残基の数であり、ZはDの全核酸残基数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さ異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

【0086】

さらに、%核酸配列同一性値も、WU-BLAST-2コンピュータプログラム(Altschulら, Methods in Enzymology 266: 460-480(1996))を用いて決定してもよい。さらに、殆どのWU-BLAST-2検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する: オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値(T) = 11、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62。ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、(a) WU-BLAST-2によって決定した、天然PROポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有する対象であるPROポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列と対象である比較核酸配列(即ち、PROポリペプチド変異体であってもよい、対象であるPROポリペプチドコード化核酸分子が比較される配列)の間で一致する同一アミノ酸残基の数を、(b) 対象であるPROポリペプチドコード化核酸のヌクレオチドの総数で除した商によって決定される。例えば、「核酸配列Bに対して少なくとも80%の核酸配列同一性を有する又は有している核酸配列Aを含んでなるポリペプチド」という記載では、核酸配列Aが対象である比較核酸配列であり、核酸配列Bが対象であるPROポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

【0087】

他の実施態様では、PRO256変異体ポリヌクレオチドは、活性PRO256ポリペプチドをコードし、好ましくは緊縮性ハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、ここに開示する完全長PRO256ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションする核酸分子である。PRO256変異体ポリペプチドは、PRO256変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

【0088】

「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による均一性まで精製される。単離されたポリペプチドには、PRO256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タンパク質が含まれる。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。

【0089】

「単離された」PRO256ポリペプチドコード化核酸、又は抗-PRO256抗体をコードする「単離された」核酸分子は、同定され、PRO256ポリペプチドをコードする核酸の天然源に通常は結合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。好ましくは、この単離された核酸は、天然においてそれに結合しているすべての構成成分を有しないものである。単離されたPRO256ポリペプチドコード化核酸分子、又は単離された抗-PRO256コード化核酸分子は、天然で見出される形態あるいは設定以外のものである。単離された核酸分子は、それ故に、PRO256ポリペプチドコード化核酸分子、又は天然の細胞中に存在するPRO256ポリペプチドコード化核酸分子とは区別される。しかしながら、PRO256ポリペプチドをコードする単離された核酸分子、又は抗-PRO256抗体をコードする単離された核酸分子は、通常はPRO256ポリペプチド又は抗-PRO256抗体を発現する細胞に含まれていて、例えば、その核酸分子は天然細胞とは異なる染色体位置にある。

【0090】

「コントロール配列」という表現は、特定の宿主生物において、作用可能に結

合したコード配列の発現にとって必要なDNA配列を意味する。原核生物に適したなコントロール配列は、例えば、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。真核生物の細胞が、プロモーター、ポリアダニル化シグナル及びエンハンサーを利用することは知られている。

【0091】

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ば、PRO256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。

【0092】

ハイブリダイゼーション反応の「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に必要な温度が高くなり、プローブが短くなるとそれに必要な温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補鎖がその融点より低い環境に存在する場合に、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ダイゼーション配列の間で所望される相同性の程度が高くなればなるほど、用いることが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事になり、低い温度は緊縮性を低下させることになる。ハイブリダイゼーション反応の緊縮性の更なる詳細及び説明については、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology (Wiley Interscience Publishers, 1995) を参照のこと。

【0093】

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 °Cにおいて0.015 Mの塩化ナトリウム/0.0015 M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) ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42 °C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/50 mMのpH 6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750 mMの塩化ナトリウム、75 mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；又は(3) 42 °Cにおける50%ホルムアミド、5×SSC (0.75 MのNaCl、0.075 Mのクエン酸ナトリウム)、50 mMのリン酸ナトリウム (pH 6.8)、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 (50 µg/ml)、0.1% SDS、及び10%のデキストラン硫酸と、42 °C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 °Cでの50%ホルムアミド、次いで55 °C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。

【0094】

「中程度の緊縮性条件」は、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor 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ダイゼーション条件 (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は、20%ホルムアミド、5×SSC (150 mMのNaCl、15 mMのクエン酸三ナトリウム)、50 mMリン酸ナトリウム (pH 7.6)、5×デンハード液、10%デキストラン硫酸、及び20 mg/mLの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の37 °Cでの終夜インキュベーション、次いで1×SSC中37-50 °Cでのフィルターの洗浄といった条件である。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。

【0095】

「エピトープタグ」なる修飾語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したPRO256ポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチドを意味する。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、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～約50のアミノ酸残基(好ましくは、約10～約20の残基)を有する。

【0096】

PRO256変異体の文脈中での「活性な」又は「活性」とは、天然又は天然に生じるPRO256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PRO256ポリペプチドの形態を指す。

ここに開示されるスクリーニングアッセイによって同定できるPRO256タンパク質をアンタゴナイズする分子(例えば、有機又は無機小分子、ペプチド等)の文脈における「生物学的活性」とは、それらの分子がここに同定されるPRO256ペプチドと結合又は複合体形成する能力、さもなければPRO256ポリペプチドと他の細胞性タンパク質との相互作用を妨害する能力、さもなければPRO256ポリペプチドの転写又は翻訳を妨害する能力を指す。特に好ましい生物学的活性には、動脈、毛細血管、静脈、及び/又はリンパ性の疾患、及び癌と同様に、例えば糖尿病のような血管に影響する全身性の疾患に作用する活性、心肥大が含まれる。

【0097】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、そしてここに開示した天然PRO256ポリペプチドの一つ又はそれ以上の生物学的活性を部分的にブロック、阻害、又は中和する任意の分子、例えばHGFアクチベーターポリペプチドの活性化を阻害することによって、HGFの活性化に起因する分裂促進又は血管形成活性を促進する分子が含まれる。PRO256ポリペプチドのアンタゴニストは、PRO256ポリペプチドと、その標的であるチモーゲン肝細胞成長因子の活性型への変換を担うHGFアクチベータータンパク質との結合を阻害

することによって作用し、これにより活性化HGFの分裂促進、血管新生、又はその他の生物活性が促進する。PRO256ポリペプチドのアンタゴニストは、血管新生又は組織修復の促進の役割を担い、それ故に末梢血管疾患、肝臓又は腎臓損傷、又は再狭窄徴候の治療的再血管新生にとって重要であり得る。

【0098】

同じように「アゴニスト」という用語は広い意味で用いられ、ここで開示された天然PRO256ポリペプチドの生物活性を模倣する任意の分子を含む。そのようなアゴニストは、例の腫瘍による、そして特に固形悪性腫瘍、リュウマチ様関節炎、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性及び他の網膜症、水晶体後線維増殖症、加齢性黄斑変性、血管新生緑内障、血管種、甲状腺過形成（グレーブス病を含む）、角膜及び他の組織移植、及び慢性炎症を含む、望ましくない過度の新血管新生によって特徴付けられる疾患又は障害の治療にとって有用である。アゴニストは、例えば脳腫瘍に関連する水腫、悪性腫瘍に関連する腹水、メージ症候群、肺炎症、ネフローゼ症候群、心外膜液（例えば、心膜炎に関連した）、及び胸水のような望ましくない過度の血管透過性によって特徴付けられる疾患又は障害の治療にも有用である。適切なアゴニスト又はアンタゴニストには、特にアゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、断片、又は天然PRO256ポリペプチドのアミノ酸配列変異体、ペプチド、小有機分子等が含まれる。

【0099】

「小分子」は、ここで約500ダルトン未満の分子量を有すると定義される。

ここで使用される場合の「PRO256ポリペプチドレセプター」なる用語は、PRO256ポリペプチドの細胞性レセプター、通常は血管内皮細胞に見出される細胞表面レセプター、並びにPRO256ポリペプチドに結合する能力を保持しているそれらの変異体を指す。

「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。

【0100】

「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150,000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。

【0101】

「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称する。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。

【0102】

「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、F a b、F a b'、F (a b')₂及びF v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「F a b」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「F c」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 (a b')₂断片が得られる。

「F v」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_H-V_L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F v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。

【0103】

またF a b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。F a b'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F a b断片とは異なる。F a b'-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F a b'に対するここでの命名である。F (a b')₂抗体断片は、間にヒンジシステインを有するF a b'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：I g A、I g D、I g E、I g G及びI g M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I g G 1、I g G 2、I g G 3及びI g G 4、I g A及びI g A 2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、 γ 、 δ 、 ϵ 及び μ 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。

【0104】

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等, 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])。

【0105】

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_v、F_ab、F_ab'、F(a_b')₂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_vFRク領域残基は、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(F_c)、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んでなる。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、関心の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プリマタイズした(PRIMATIZED(商品名))抗体を含む。

【0106】

「一本鎖F_v」又は「sF_v」抗体断片は、抗体のV_H及びV_L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単鎖に存在する。好ましくは、F_vポリペプチドは、sF_v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_HとV_Lドメインの間に更に含んでいる。sF_v

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意味するもので、断片は軽鎖可変ドメイン(V_L)に結合した重鎖可変ドメイン(V_H)を同じポリペプチド鎖(V_H-V_L)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。

【0107】

「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)ローリ法(Lowry method)で測定した場合95%を越える抗体、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による均一性まで精製される。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。

【0108】

「特異的に結合する」抗体、又は特定のポリペプチド、或いは特定のポリペプチド上のエピトープへ特異的な抗体とは、他のポリペプチド、又はポリペプチドエピトープとは実質的には結合せずに、特定のポリペプチド、或いは特定のポリペプチド上のエピトープへ結合するものである。

「標識」という語は、ここで用いられる場合、「標識化」抗体を作製するために、抗体に直接的又は間接的に結合させる検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自身によって検出可能でもよく（例えば、放射性同位体標識又は蛍光標識）、あるいは、酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的変換を触媒してもよい。検出可能な標識を提供しうる放射性ヌクレオチドは、例えば、I-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、Re-186、At-211、Cu-67、Bi-212、及びPd-109を含む。標識は、毒素のような非検出性の物質でもよい。

「固相」とは、本発明の抗体が接着できる非水性マトリクスを意味する。ここに包含される固相の例は、部分的又は全体的にガラス（例えば、径の調整されたガラス）、ポリサッカリド（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で形成されたものを含む。或る実施態様では、前後関係に応じて、固相はアッセイ用プレートのウェル；その他では精製用カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィカラム）を含むことができる。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々の粒子の不連続な固相も含む。

【0109】

「リポソーム」は、哺乳動物への薬物（例えばPRO256ポリペプチド又はそれらに対する抗体、場合によっては化学治療薬）輸送に有用な、脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は細胞膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。

ここで用いる「イムノアドヘシン」という用語は、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能を持つ異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性を付与した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは抗体の抗原認識及び結合部位以外の所望の結合特異性を持つアミノ酸配列（即ち「異種」）と免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物である。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近接アミノ酸配列を含む。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、IgG-1、IgG-2、IgG-3、又はIgG-4サブタイプ、IgA（Ig

A-1及びIgA-2を含む)、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

【0110】

下記に示すように、表1はALIGN-2配列比較コンピュータプログラムの安全なソースコードを提供する。このソースコードは、UNIXオペレーティングシステムでの使用のために日常的にコンパイルされ、ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを与える。

さらに、表2-5は、ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いた%アミノ酸配列同一性(表2-3)、並びに%核酸配列同一性(表4-5)を決定するために下記の方法を使用した仮説的例示であり、「PRO」は対象とする仮説的PROポリペプチドのアミノ酸配列を示し、「比較タンパク質」とは、対象とする「PRO」ポリペプチドが比較されるポリペプチドのアミノ酸配列を示し、「PRO-DNA」は対象とする仮説的PROコード化核酸配列を示し、「比較DNA」は対象とする「PRO-DNA」核酸分子が比較される核酸分子のヌクレオチド配列を示し、「X」、「Y」及び「Z」は各々異なる仮説的アミノ酸残基を示し、「N」、「L」及び「V」は各々異なる仮説的ヌクレオチドを示す。

【0111】

表1

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of BQ
 /* B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int  _day[26][26] = {
/*   A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */  { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */  { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */  {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */  { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */  { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */  {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */  { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */  {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */  {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */  {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */  {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */  {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */  { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */  { _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */  { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */  { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */  {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */  { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */  { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */  { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */  {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */  {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */  { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

【 0 1 1 2 】

表1(続き)

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max jmps in a path */
#define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */
#define DINSO 8 /* penalty for a gap */
#define DINS1 1 /* penalty per base */
#define PINSO 8 /* penalty for a gap */
#define PINS1 4 /* penalty per residue */

struct jmp {
    short n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int score; /* score at last jmp */
    long offset; /* offset of prev block */
    short jmp; /* current jmp index */
    struct jmp jp; /* list of jmps */
};

struct path {
    int spc; /* number of leading spaces */
    short n[JMPS]; /* size of jmp (gap) */
    int x[JMPS]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char *ofile; /* output file name */
char *namex[2]; /* seq names: getseqs() */
char *prog; /* prog name for err msgs */
char *seqx[2]; /* seqs: getseqs() */
int dmax; /* best diag: nw() */
int dmax0; /* final diag */
int dna; /* set if dna: main() */
int endgaps; /* set if penalizing end gaps */
int gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
int len0, len1; /* seq lens */
int ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int smax; /* max score: nw() */
int *xbm; /* bitmap for matching */
long offset; /* current offset in jmp file */
struct diag *dx; /* holds diagonals */
struct path pp[2]; /* holds path for seqs */

char *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char *getseq(), *g_calloc();

```

【 0 1 1 3 】

表1(続き)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static  _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static  _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
    int ac;
    char *av[ ];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0; /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out"; /* output file */

    nw(); /* fill in the matrix, get the possible jumps */
    readjumps(); /* get the actual jumps */
    print(); /* print stats, alignment */

    cleanup(); /* unlink any tmp files */
}

```

【 0 1 1 4 】

表1(続き)

```

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/
nw()
{
    char          *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int           *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int           ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int           *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int           mis;               /* score for each type */
    int           ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register      id;                /* diagonal index */
    register      ij;                /* jmp index */
    register      *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
    register      xx, yy;            /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_malloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_malloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_malloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_malloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_malloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

【 0 1 1 5 】

表1(続き)

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
  mis = col0[yy-1];
  if (dna)
    mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
  else
    mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

  /* update penalty for del in x seq;
   * favor new del over ongong del
   * ignore MAXGAP if weighting endgaps
   */
  if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else {
      dely[yy] -= ins1;
      ndely[yy]++;
    }
  } else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else
      ndely[yy]++;
  }

  /* update penalty for del in y seq;
   * favor new del over ongong del
   */
  if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else {
      delx -= ins1;
      ndelx++;
    }
  } else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else
      ndelx++;
  }

  /* pick the maximum score; we're favoring
   * mis over any del and delx over dely
   */
}

```

【 0 1 1 6 】

表1(続き)

...nw

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    coll[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    coll[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (ldna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejms(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
else {
    coll[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (ldna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejms(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    .*/
    if (endgaps)
        coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

【 0 1 1 7 】

表1(続き)

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE  256 /* maximum output line */
#define P_SPC   3   /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print()
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "< first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "< second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

print

【 0 1 1 8 】

表1(続き)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int lx, ly;                                                /* "core" (minus endgaps) */
    int firstgap, lastgap;                                       /* leading trailing overlap */
{
    int      mm, i0, i1, siz0, siz1;
    char      outx[32];
    double    pct;
    register  n0, n1;
    register  char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    mm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbrn[*p0-'A']&xbrn[*p1-'A'])
                mm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*(double)mm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "< %d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        mm, (mm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

【 0 1 1 9 】

表1(続き)

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINSO, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINSO, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line */
static      ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];      /* ptr to current element */
static char *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char out2[P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[ ]
 */
static
pr_align()
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

pr_align

【 0 1 2 0 】

表1(続き)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
                */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register    i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

dumpblock

【 0 1 2 1 】

表1(続き)

```

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                nums
{
    int ix;          /* index in out[] holding seq line */
    char            nline[P_LINE];
    register        i, j;
    register char   *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)                                putline
    int ix;                                {

```

【 0 1 2 2 】

表1(続き)

```

int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != '!'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

...putline

stars

【 0 1 2 3 】

表1(続き)

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}
```

stripname

【 0 1 2 4 】

表1(続き)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_alloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

int cleanup();                             /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                  cleanup
    int i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)                           getseq
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

```

【 0 1 2 5 】

表1(続き)

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_alloc(msg, nx, sz)
char *msg; /* program, calling routine */
int nx, sz; /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (f) {
        (void) fclose(f);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)

```

【 0 1 2 6 】

表1(続き)

...readjumps

```

    if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

【 0 1 2 7 】

表1(続き)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix)
    int ix;
{
    char      *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

writejumps

【 0 1 2 8 】

表 2

PRO	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(長さ = 15 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXXXYYYYYYY	(長さ = 12 アミノ酸)

% アミノ酸配列=

(ALIGN-2 によって決定された、二つのポリペプチド配列の間で一致したアミノ酸残基の数) ÷ (PRO
ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) =

5 ÷ 15 = 33.3%

【 0 1 2 9 】

表 3

PRO	XXXXXXXXXX	(長さ= 10 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXYYYYZZYZ	(長さ = 15 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって決定された、二つのポリペプチド配列の間で一致したアミノ酸残基の数) ÷ (PRO
ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) =

$$5 \div 10 = 50\%$$

【 0 1 3 0 】

表 4

PRO - DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(長さ = 14 ヌクレオチド)
比較 DNA	NNNNNNLLLLLLLL	(長さ = 16 ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって決定された、二つの核酸配列の間で一致したヌクレオチドの数) ÷ (PRO - DNA
核酸配列のヌクレオチドの総数) =

$$6 \div 14 = 42.9\%$$

【 0 1 3 1 】

表 5

PRO - DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ = 12 ヌクレオチド)
比較 DNA	NNNNLLLVV	(長さ = 9 ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって決定された、二つの核酸配列の間で一致したヌクレオチドの数) ÷ (PRO - DNA
核酸配列のヌクレオチドの総数) =

$$4 \div 12 = 33.3\%$$

【0132】

II. 本発明の組成物及び方法

A. PRO256変異体

ここに記載した完全長天然配列PRO256ポリペプチドに加えて、PRO256変異体も調製できると考えられる。PRO256変異体は、PRO256ポリペプチドDNAに適当なヌクレオチド変化を導入することにより、及び/又は所望のPRO256ポリペプチドを合成することにより調製できる。当業者は、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PRO256ポリペプチドの翻訳後プロセスを変える可能性があることを理解するであろう。

【0133】

ここに記載した、天然完全長配列PRO256ポリペプチド、或いはPRO256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関する任意の技術及び指針を用いて作成することができる。変異は、天然配列PRO256と比べるとPRO256ポリペプチドのアミノ酸配列に変化を結果として引き起こす、PRO256ポリペプチドをコードする一つ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、この変異は、PRO256ポリペプチドの一つ又は複数のドメインにおいて、少なくとも1つのアミノ酸を任意の他のアミノ酸によって置換することである。どのアミノ酸残基が所望の活性へ逆の作用を与えることなく挿入、置換又は欠失されるのかを決定する指針は、PRO256ポリペプチドの配列を相同性のある既知タンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内で生じるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一つのアミノ酸を類似の構造及び/又は化学特性を有する他のアミノ酸で置換すること、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、配列のアミノ酸に挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、この結果として生じた変異体を完全長又は成熟天然配列によって表示される活性に関して試験することによって決定し得る。

【0134】

特別の実施態様では、対象とする保存的置換を表6にて、好ましい置換の見出しの下に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表6で例示的置換と名前を付けた、或いは更に下記にアミノ酸分類に関連して記載しているような、より置換的な変化が導入されて生成物がスクリーニングされる。

【0135】

表6

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala(A)	val; leu; ile	val
Arg(R)	lys; gln; asn	lys
Asn(N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp(D)	glu	glu
Cys(C)	ser	ser
Gln(Q)	asn	asn
Glu(E)	asp	asp
Gly(G)	pro; ala	ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; ルロイソ	leu
Leu(L)	ルロイソ; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe

Val(V) ile; leu; met; phe;
 ala; ルイシ leu

【0136】

ポリペプチドの機能及び免疫学的同一性の置換的修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b)標的部位の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の高を維持しながら、それらの効果において実質的に異なる置換基を選択することにより達成される。天然発生残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

- (1) 疎水性：ルイシ, met, ala, val, leu, ile;
- (2) 中性の親水性：cys, ser, thr;
- (3) 酸性：asp, glu;
- (4) 塩基性：asn, gln, his, lys, arg;
- (5) 鎖配向に影響する残基：gly, pro; 及び
- (6) 芳香族：trp, tyr, phe。

【0137】

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、好ましくは残された(非保存)部位に導入されうる。

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[Carterら, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zollerら, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発[Wellsら, Gene, 34: 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発[Wellsら, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)]等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができ、又は他の知られた技術をクローニングしたDNAに実施してPRO256変異体DNAを作成することもできる。

【0138】

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ャンニングアミノ酸である [Cunningham及びWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。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。

【0139】

B. PRO256ポリペプチドの修飾

PRO256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つの型は、PRO256ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、PRO256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である。二官能性試薬での誘導体化が、例えばPRO256ポリペプチドを水不溶性支持体マトリクスあるいは抗-PRO256ポリペプチド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 ϵ -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。

【0140】

本発明の範囲内に含まれるPRO256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、ここで意図されるのは、天然配列PRO256ポリペプチドに見られる1又は複数の炭水化物部分の欠失（化学的及び/又は酵素的手段によって、内在するグリコシル化部位を取り除くことによって、或いはグリコシル化を除去することによってのいずれか）、及び/又は天然配列PRO256ポリペプチドに存在しない1又は複数のグリコシル化部位の付加及び/又はグリコシル化部位に結合した糖残基の比率及び/又は組成の変更を意味する。加えて、この言い回しには、存在する種々の炭水化物部分の性質及び比率の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化の定量的変化が含まれている。

PRO256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によって完遂し得る。この変更は、例えば、1又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列PRO256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。PRO256ポリペプチドアミノ酸配列は、場合によっては、DNAレベルでの変化、特に、PRO256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成させることを通して変更されてもよい。

【0141】

PRO256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日に発行された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。

PRO256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、あるいはグリ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。

本発明のPRO256ポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、PRO256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。

また、本発明のPRO256ポリペプチドは、その他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列と融合したPRO256ポリペプチドを含んでなるキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。

【0142】

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PRO256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PRO256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PRO256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PRO256ポリペプチドを容易に精製できるようにする。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)]

; K T 3 エピトープペプチド [Martin等, Science, 255:192-194 (1992)] ; -
チューブリンエピトープペプチド [Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-151
66 (1991)] ; 及び T 7 遺伝子 1 0 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。

【 0 1 4 3 】

これに代わる実施態様では、キメラ分子は P R O 2 5 6 と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んでもよい。キメラ分子の二価形態（
「イムノアドヘシン」とも呼ばれる）については、そのような融合体は I g G 分
子の F c 領域であり得る。I g 融合体は、好ましくは I g 分子内の少なくとも 1
つの可変領域に代えて P R O 2 5 6 ポリペプチドの可溶化（膜貫通ドメイン欠失
又は不活性化）形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体
は、I g G 1 分子のヒンジ、C H 2 及び C H 3、又はヒンジ、C H 1、C H 2 及
び C H 3 領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日
発行の米国特許第5,428,130号を参照のこと。

【 0 1 4 4 】

C . P R O 2 5 6 ポリペプチドの調製

本発明は、本出願において P R O 2 5 6 と称される、新規に同定及び単離され
たポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を提供するものである。特に、P
R O 2 5 6 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細に
開示するようにして、同定され単離された。別々の発現ラウンドで産生されるタ
ンパク質は異なる P R O 番号が付与されるが、U N Q 番号は任意の与えられた D
N A 及びコード化タンパク質に独特であり変わることはない。しかしながら、簡
単にする目的で、本明細書においては、P R O D N A にコードされるタンパク
質、並びにさらなる天然相同体、及び P R O 2 5 6 の先の定義に含まれる変異体
は、由来又は調製方法とは無関係に、各々「P R O 2 5 6」と称される。

以下の説明は、主として、P R O 2 5 6 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 2 5 6
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 2 5 6 を調製することができると考えられる。例

例えば、PRO256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。PRO256ポリペプチドの種々の部分は、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PRO256ポリペプチドを生産してもよい。

【0145】

i. PRO256ポリペプチドをコードするDNAの単離

PRO256ポリペプチドをコードするDNAは、PRO256ポリペプチドをコードする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ライブラリから得ることができる。従って、ヒトPRO256ポリペプチドをコードする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ライブラリから簡便に得ることができる。またPRO256ポリペプチドをコードする遺伝子は、ゲノムライブラリから又はオリゴヌクレオチド合成により得ることもできる。

ライブラリは、対象となる遺伝子あるいはそれ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(PRO256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のスクリーニングは、例えばSambrook等, 上掲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。所望のPRO256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)。

【0146】

下記の実施例には、cDNAライブラリ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、疑陽性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、³²Pで標識された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完全長配列に渡っての(アミノ酸又は核酸レベルのいずれかでの)配列同一性は、相同性を測定する種々のアルゴリズムを使用する、コンピュータソフトウェアプログラム、例えばALIGN、DNASTAR及びINHERITにより決定することができる。

タンパク質コード化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張法を使用し、選択されたcDNA又はゲノムライブラリをスクリーニングすることにより得られる。

【0147】

i i . 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したPRO256ポリペプチド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。

【0148】

形質移入の方法、例えば、 $CaPO_4$ 処理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は、原核生物又は実質的な細胞壁障壁を含む他の細胞に対して一般に用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)による感染が、Shaw等, *Gene*, 23: 315 (1983)及び1989年6月29日公開の国際特許出願第WO89/05859号に記載されたように、あ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が用いられる。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ができる。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。

【0149】

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を含む。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。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、*E. coli*、エンテロバクター、エルビニア(*Erwinia*)、クレブシエラ(*Klebsiella*)、プロテウ

ス(*Proteus*)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス(*Serratia marcescans*)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバチルス・サブチリス(*B. subtilis*)及びバチルス・リチェニフォルミス(*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行のDD 266,710に記載されたバチルス・リチェニフォルミス41P)、シュードモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生産発行のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110は、宿主に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異をするように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型 *tonA* を有する大腸菌W3110株1A2；完全な遺伝子型 *tonA ptr3* を有する大腸菌W3110株9E4；完全な遺伝子型 *tonA prt3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r* を有する大腸菌W3110株27C7 (ATCC 55,244)；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (algF-lac)169 degP ompT rbs7ilvGkan^r* を有する大腸菌W3110株37D6；非カナマイシン耐性 *degP* 欠失変異を持つ37D6株である大腸菌W3110株40B4；及び1990年8月7日発行の米国特許第4,946,783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【0150】

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、PRO256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。他に、シゾサッカロミセスプロンプ(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日発行のEP 139,383)；クルベロミセス宿主(*Kluveromyces hosts*) (米国特許第4,943,529号；Fleer等, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991))、例えばケー・ラクチス(*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574；Lourencourt等, *J. Bacteriol.* 737 [1983])、ケー・フラギリリス(*K. f*

ragilis) (ATCC 12,424)、ケー・ブルガリクス(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、ケー・ウイケラミイ(*K. wickeramii*) (ATCC 24,178)、ケー・ワルチイ(*K. waltii*) (ATCC 56,500)、ケー・ドロソフィラルム(*K. drosophilum*) (ATCC 36,906; Van den Berg等, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990))、ケー・テモトレランス(*K. themotolerans*)及びケー・マルキシアナス(*K. marxianus*); ヤロウィア(*yarrowia*) (EP 402,226); ピッチャ・パストリス(*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sheekrishna等, *J. Basic Microbiol*, 28: 265-278 [1988]); カンジダ; トリコデルマレーシア(*reesia*) (EP 244,234); アカパンカビ (Case等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979]); シュワニオマイセス(*schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス(*occidentalis*) (1990年10月31日発行のEP 394,538); 及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(*Tolyocladium*) (1991年1月10日発行のWO 91/00357); 及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス (Ballance等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburn等, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) 及びアスペルギルス・ニガー (Kelly及びHynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985]) が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(*methylotropic*)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(*Hansenula*)、カンジダ、クロエケラ(*Kloeckera*)、ピチア(*Pichia*)、サッカロミセス、トルロプシス(*Torulopsis*)、及びロドトルラ(*Rhodotorula*)からなる属から選択されるメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982)に記載されている。

【0151】

グリコシル化PRO256ポリペプチドをコードする核酸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。より詳細な例は、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 / - D H F R (CHO, Urlaub及びChasin, Proc . Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980));マウスのセルトリ細胞 (TM4, Mathe r, 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, ATTC C CL51)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。

【0152】

i i i . 複製可能なベクターの選択及び使用

PRO256ポリペプチドをコードする核酸(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、配列が分泌されるならば、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ー遺伝子、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。

【0153】

PRO256ポリペプチドは組換え手法によって直接的に産生されるだけでなく、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か、ベクターに挿入されるPRO256ポリペプチドをコードするDNA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、Ipp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、例えば酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及び

クлуй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)、又は酸ホスホターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(*C. albicans*)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行のEP362179)、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。

【0154】

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、選択可能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、メトトレキセ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)例えばバチルス[®]の遺伝子コード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択可能マーカーの例は、DHFRあるいはチミジンキナーゼのように、PRO256ポリペプチド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(19

80)。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)。

【0155】

発現及びクローニングベクターは、通常、PRO256ポリペプチドを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好適な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); EP 36,776]、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーター [deBoer等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]を含む。細菌系で使用するプロモーターもまたPRO256ポリペプチドをコードする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-ホスホグリセレートキナーゼ [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(1987)]、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。

【0156】

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はEP 73,657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PRO256核酸の転写は、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)、アデノウィルス(例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びサルウィルス40(SV40)のようなウィ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。

より高等の真核生物による所望のPRO256ポリペプチドをコードする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、 α -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、真核細胞ウィ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)、サイトメガロウィ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ィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、PRO256ポリペプチドをコードする配列の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。

【0157】

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、真核生物又はウィルスの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、PRO256ポリペプチドをコードする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PRO256ポリペプチド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); EP 117,060; 及びEP 117,058 に記載されている。

【0158】

i v . 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PRO256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PRO256ポリペプチドをコードする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。

【0159】

v . PRO256ポリペプチドの精製

PRO256ポリペプチドの形態は、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(商品名)100)又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。PRO256ポリペプチド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。PRO256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PRO256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PRO256の性質に依存する。

【0160】

D. PRO256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、下記の実施例に記載されるもの含む。

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-1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SD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。

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。

【0161】

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PRO256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、成長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、これら成長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インヒビターによる、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。

【0162】

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(PGF₂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PRO256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PGF₂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PRO256ポリペプチドの効力は、PRO256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。

【0163】

また他のインビボアッセイにおいて、心臓肥大、続いて実験的に誘発された心筋梗塞(MI)における効果を測定する。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対照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。Lai等, 上掲。心臓肥大の候補ブロッカー、例えばPRO256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。

【0164】

癌において、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PRO256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、腎嚢下移植、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、The Nude Mouse in Oncology Research, E. Boven及びB. Winograd. eds.(CRC Press, Inc., 1991)を参照されたい。

【0165】

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); 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。

【0166】

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(商品名)」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。

【0167】

例えば、Meth A、CMS-4、CMS5、CMS21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、 10×10^6 から 10×10^7 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 μ 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。

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。

【0168】

移植腫瘍を有する動物モデルにおける試験化合物の効力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；よって通常は数学的公式を使用し、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を入手することができる。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当初には腫瘍サイズの増加の結果となり得ることに留意されるべきである。よって、形態計測とフローサイトメトリー分析を組み合わせ、これらの変化を注意深く監視する必要がある。

【0169】

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PRO256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加工することができる。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、当該技術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, 56:313-321(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。

本発明の目的に関して、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、又は鎖状体で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)の技術に続いて可能である。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ゥ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のためにさらに試験される。

【0170】

また、動物の胚性細胞に導入されたPRO256ポリペプチドをコードする変更ゲノムDNAと、PRO256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PRO256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PRO256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PRO256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、期間をおいて「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、PRO256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。

【0171】

ここで同定されたPRO256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、自発的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。現在では、この腫瘍に対する効果的な治療はない。この研究に入る前に、各々のネコを完全な臨床実験用のバイオプシーとし、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腫瘍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、対照グループに対し、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。

【0172】

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率により制限される。

また、当該技術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。

【0173】

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PRO256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PRO256DNA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、及びインサイツ-ハイブリッド形成のための特定のプロトコルは以下に提供する。

【0174】

i i i . 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PRO256ポリペプチドの効果を阻害する抗-PRO256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

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pitep、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4,376,110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あるか凍結されていてもよく、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。

【0175】

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発見を立証し、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、PRO256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B104-1-1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技術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。

【0176】

v. 遺伝子治療

ここで、PRO256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、それらのペプチドをインビトロでの発現により本発明に従って用いてもよく、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PRO256ポリペプチドが必要とされている部位、すなわちPRO256ポリペプチドの合成部位、もし知られているならばPRO256ポリペプチドの生物学的活性が必要とされる部位(例えば傷)に、患者に直接注入される。エキソビボ処理では、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ビ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。遺伝子のエキソビ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。

【0177】

現在インビ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、PRO256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PRO256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PRO256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、ポリアデニル化並びに一又は複数の制限部位を指向するシグナル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。

【0178】

幾つかの状況では、核酸供給源を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に特異的な抗体又は標的細胞、標的細胞上のレセプターのリガンドなどとともに提供するのが望ましい。リポソームが用いられる場合、エンドサイトーシスを伴って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標識化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。

【0179】

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PRO256ポリペプチドをコードする遺伝子の用途に関する。PRO256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PRO256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PRO256ポリペプチドをコードする遺伝子に変異体を担持する個人は、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、PRO256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、PRO256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。点変異は、PRO256ポリペプチドをコードする放射能標識されたRNA、又はPRO256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。

【0180】

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プロテクションアッセイ、例えばRNアーゼ及びS1プロテクション、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アーゼプロテクション、化学的切断、直接DNA配列化、又は制限酵素、例えば制限断片長のポリモルフィズム(RFLP)の使用、及びゲノムDNAのサザンプロット等の方法に

より達成することができる。

【0181】

v i i . P R O 2 5 6 ポリペプチドレベル検出のための用途

より便宜的なゲル電気泳動及びDNA配列化に加えて、変異はインサイツ分析で検出することもできる。

P R O 2 5 6 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、又は新血管新生に連動している。P R O 2 5 6 ポリペプチドがシグナル配列を有している場合は、m R N A 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P R O 2 5 6 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P R O 2 5 6 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-P R O 2 5 6 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。

P R O 2 5 6 ポリペプチドに特異的な抗体を固体支持体上に取り付け、標識されたP R O 2 5 6 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に通過させる競合アッセイを使用することもでき、固体支持体に取り付けた検出されるレベルの量はサンプル中のP R O 2 5 6 ポリペプチドの量と相関関係がある。

【0182】

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おいて重要である。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ために、現在必要である。実際の配列データ(反復多形性)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のために入手可能である。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を有する配列を相関させるために、重要な第1段階である。

簡単に言えば、配列はc D N A からP C R 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遺伝子を含む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む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急速な手順である。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、インサイトハイブリッド形成、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。

【0183】

中期染色体展開へのcDNAクローンの蛍光インサイトハイブリッド形成(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、PRO256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可能である。このようなデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Library)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

と病気の関係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)。

【0184】

i x . 候補薬のスクリーニングアッセイ

本発明は、PRO256ポリペプチドを模倣する(アゴニスト)又はPRO256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PRO256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、化学的ライブラリ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PRO256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。

【0185】

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PRO256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PRO256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PRO256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によって検出できる。

【0186】

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PRO256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、Fields及び共同研究者等 [Fields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ールドメインからなり、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、 β -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つの特定の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(商品名))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。

【0187】

ここで同定されたPRO256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対照を提供してもよい。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対照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。

【0188】

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PRO256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PRO256ポリペプチドの作用を競合的に阻害するPRO256ポリペプチドの変異形態であってもよい。

【0189】

他の潜在的なPRO256ポリペプチドアンタゴニストは、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PRO256ポリペプチドをコードするポリペプチド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PRO256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PRO256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、PRO256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。

【0190】

アンチセンスRNA又はDNA分子は、一般的に少なくとも約5塩基長、約10塩基長、約15塩基長、約20塩基長、約25塩基長、約30塩基長、約35塩基長、約40塩基長、約45塩基長、約50塩基長、約55塩基長、約60塩基長、約65塩基長、約70塩基長、約75塩基長、約80塩基長、約85塩基長、約90塩基長、約95塩基長、約100塩基長、又はそれ以上である。

潜在的アンタゴニストは、PRO256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PRO256ポ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。

【0191】

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公報、番号WO 97/33551 (1997年9月18日発行)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公報、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。

【0192】

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PRO256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、PRO256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、内皮細胞の移動を刺激又は阻害するために使用することができる。PRO256ポリペプチドのアンタゴニストにより媒介される血管形成の増加は、虚血性組織、冠動脈狭窄に続く心臓の側枝冠動脈の発達に有益である。PRO256ポリペプチド又はそのアゴニストは、血管形成の阻害、例えば傷の治癒又は胚線維症の間の過度の結合組織の生成を制限するために使用される。

【0193】

分子のアンタゴニストに対抗する場合、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、分子が新血管新生、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、PRO256ポリペプチド又はそのアゴニストは、肝細胞成長因子の活性化を阻害し、それ故に血管形成の促進をも阻害する。従って、血管形成を制限又は防止が所望されている場合、それは疾患の治療に有用である。PRO256ポリペプチド又はそれに加えてアゴニストは、血管腫瘍に関連した疾患の治療に直接的に有用であり、その疾患には例えば、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、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、気球血管形成が続く再狭窄、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。

【0194】

他方、PRO256ポリペプチドのアンタゴニストは、血管形成の促進が所望される症状、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（特に肝臓及び腎臓組織）、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、及び骨粗鬆症等にとって有用であることが期待されている。

特定の型の病気は以下に記載され、ここでのPRO256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放出剤に有用なものとして機能し得る。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。

【0195】

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。

血管炎には、巨大細胞動脈炎、タカヤス動脈炎、多発性動脈nodosa(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 prupura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。

レーノー病は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によるもので、続いて血管形成を生じる。

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。

【0196】

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リンパ球(Lymphocyst)は結合組織に囲まれている。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)。

【0197】

早々に示したように、PRO256ポリペプチド又はそのアゴニストは、腫瘍が成長及び/又は転移することが可能となる腫瘍の血管新生が関与するプロセスである、腫瘍の血管形成の予防にとって有用である。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、テコーマ、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、メラノーマ、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、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)は年輩者層にとって、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、PRO256ポリペプチド又はそれらのアンタゴニストは、重度のAMDを低減させるのに有用であることが予期される。

【0198】

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PRO256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PRO256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。PRO256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、PRO256ポリペプチドのアンタゴニストは、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り得る。

【0199】

また、PRO256ポリペプチドアンタゴニストは、他の組織、例えば器官(例えば、膵臓、肝臓、腸、腎臓、配列又は内皮を含む)、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、線維性瘢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。

PRO256ポリペプチドアンタゴニストは、全身的サイトカインダメージに起因する病状、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も有用である。また、PRO256ポリペプチド、又はそれに加えてアゴニスト又はアンタゴニストは、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、PRO256ポリペプチド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。また、PRO256ポリペプチドアンタゴニストは、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。

【0200】

ここでPRO256ポリペプチド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癒に適用される。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PRO256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、又はエキソビ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、当該技術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。

【0201】

PRO256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。より具体的には、PRO256ポリペプチドアンタゴニストは、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、ハンティングドン病、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、PRO256ポリペプチド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-再灌流傷害が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。

【0202】

PRO256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への対応とっても有用である。

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、心膜滲出(例えば心膜炎に關連するもの)、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PRO256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。

【0203】

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。

PRO256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可能な担体、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。許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤は、好ましく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/又はTWEEN（商品名）、PLURONICS（商品名）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。

【0204】

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である。局所用の担体又は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、及び除放性製剤を含む。PRO256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。

【0205】

他の調製物は、形成された製品中に、PRO256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。

インピボ投与に用いられるPRO256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。PRO256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、PRO256ポリペプチド又は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。PRO256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指示に主として依存し、

- a) PRO256ポリペプチド、又はそに加えて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。

【0206】

使用される洗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(商品名)(TWEEN(商品名))20、80等)、ポロキサマー(例えば、POLOXAMER(商品名)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、例えば静脈投与、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、EP257,956を参照されたい)。

等張剤は、PRO256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。また、塩化ナトリウム又は他の適切な塩を、溶液を等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。本発明の液状調製物の一種類のpHは、約4から8、好ましくはほぼ生理学的pHの範囲に緩衝される。

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。

【0207】

治療用PRO256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、好ましくは静脈内(i.v.)、皮下(s.c.)、又は筋肉内(i.m.)の繰り返し注射として、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EP 257,956参照)。

PRO256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、EP 58,481)、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(商品名)(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(EP 133,988)を含む。

【0208】

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生の変化のおそれがある。かかる機構によって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れば、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保証することができる。

PRO256ポリペプチドの持続放出組成物は、リポソーム的に包括されたPRO256ポリペプチドを含む。PRO256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)、EP 52,322、EP 36,676、EP 88,046、EP 143,949、EP 142,641、特願昭58-118008、米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号、及びEP 102,324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。

【0209】

PRO256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。PRO256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PRO256ポリペプチド、より好ましくは天然配列ヒトPRO256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、PRO256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。この治療及び進行状況は、エコーカルジオグラフィー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PRO256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

・ 1 mg / kg の範囲内である。

【0210】

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 1 kg 当たり約 0.01 から 50 mg、好ましくは約 0.05 から 20 mg、最も好ましくは 1 から 20 mg の PRO256 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、PRO256 ポリペプチドをベースとする分子を、好ましくは体重 1 kg 当たり約 5 mg から 1 g、好ましくは約 10 から 100 mg、1 日に 1 から 3 回投与する。内毒素汚染物質、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 PRO256 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(例えば骨)の重量、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。

【0211】

PRO256 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 PRO256 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予期されている。

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可能な塩類の例には、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。

【0212】

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、有用な治療用組成物は、発熱物質を含有しない生理学的に許容可能形態である。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。

【0213】

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、粒子サイズ及び生物分解性能を変更するためのプロセスが施されていてもよい。

【0214】

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800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。

【0215】

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PRO256ポリペプチド、アミン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、PRO256ポリペプチド治療は、周知の心筋ミオサイト肥大因子のインヒビター、例えばフェニレフリン等の α -アドレナリンアゴニストのインヒビター；エンドセリン-Iインヒビター、例えばBOSENTAN（商品名）及びMOXONODIN（商品名）；CT-1に対するインヒビター（米国特許第5,679,545号）；LIFに対するインヒビター；ACEインヒビター；デスク-アスパラタート-アンギオテンシンIインヒビター（米国特許第5,773,415号）及びアンギオテンシンIIインヒビターの投与を組合せることができる。

【0216】

高血圧に関連した心臓肥大の治療のためには、PRO256ポリペプチドを、 α -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、又はカーベジルロール；ACEインヒビター、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の遺伝子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版を参照されたい。

【0217】

心臓肥大の治療における組合せ治療用の好ましい候補薬は、 α -アドレナリン様レセプターブロック剤（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、又はカーベジルロール）、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、ベラパミル及び

ニカルジピン； α -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インヒビター、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、PRO256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- β 又はTGF- α 、IGF、FGF、及びCTGFが含まれる。

【0218】

加えて、癌の治療に使用されるPRO256ポリペプチド又はそれらのアンタゴニストは、上述にて同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、PRO256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。

PRO256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、理想的にはジウレティクス又はデジタルの使用、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PRO256ポリペプチドと共に投与しない場合と同じ用量である。

【0219】

x i i i . 製造品

上述した疾患の診断又は治療に有用なPRO256ポリペプチド又はその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つの容器及び標識を具備する。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内バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の活性剤はPRO256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標識には、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、製薬的に許容可能なバッファー、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。

【0220】

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、PRO256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インヒビターが含まれる。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。

【0221】

i i . モノクローナル抗体

あるいは、抗-PRO256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 (1975)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、典型的には対象とするPRO256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、ハイブリドーマの培地は、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。

【0222】

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

ージニア州マナッサスのアメリカン・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 Applications, (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、PRO256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)によるスキッチャード分析法によって測定することができる。

【0223】

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。

【0224】

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、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。

【0225】

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。

【0226】

iii. ヒト及びヒト化抗体

抗-PRO256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')₂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F_v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んでなる。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)。

【0227】

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*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, *Science*, 239:1534-1536 (1988)] の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。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。

【0228】

また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリを含むこの分野で知られた種々の方法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は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。

【0229】

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PRO256ポリペプチドに対してであり、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.*, 10:3655-3659 (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

プ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、C H 2 及び C H 3 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(C H 1)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。

【0230】

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; EP 03089)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。

【0231】

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, *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Fc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC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。

【0232】

v i i . 免疫複合体

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複合体にも関する。

このような免疫複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(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(*momordica charantia*)インヒビター、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*)インヒビター、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}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及び ^{186}Re を含む。

【0233】

抗体及び細胞毒性薬の複合体は、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(SPPDP)、イミノチオラン(IT)、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HCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベラート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(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(MX-DTPA)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-レセプター複合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合複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。

【0234】

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(ドキソルビシン等)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。

【0235】

i x . 抗体の製薬組成物

ここで同定されるPRO256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。

PRO256ポリペプチドが細胞内であり、全抗体がインヒビター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。

【0236】

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、例えば細胞毒性薬、サイトカイン、化学療法剤、又は成長阻害剤等の製剤の機能を高める薬剤を含んでもよい。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、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルジ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, 上記に開示されている。

インビ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。

【0237】

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-D-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(商品名)（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身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。

【0238】

x. 抗体を使用する治療方法

PRO256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、ボ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EVIIST(商品名)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(EP 616812参照)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。

【0239】

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ErbB2、EGFR、ErbB3、ErbB4、又はVEGF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。ときどきは、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。

【0240】

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-PRO256ポリペプチド抗体及び他の抗体(例えば抗-VEGF)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、TNFを、そのみ、又は補助剤、例えばアルファ-、ベータ-又はガンマ-インターフェロン、抗-HER2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 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、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C4b結合プロテイン(1991年2月21日公開のW091/01753)、或いは加熱又は放射線との組み合わせで投与してよい。

補助剤はその有効性に依りて変わるので、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-PRO256ポリペプチド抗体及びTNF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-PRO256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中和抗体は、抗-PRO256ポリペプチド抗体と共に患者に投与される。抗-PRO256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。

【0241】

心臓血管、内皮及び血管形成疾患の予防又は治療のために、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依りて、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日の用量は、上記の要因に依りて、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、状態に依りて、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、従来の技術

及びアッセイ、例えばX線腫瘍イメージングによって容易に監視される。

【0242】

x i . 製造品

また、抗体を収容する容器と標識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-PRO256抗体である。

【0243】

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、PRO256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、PRO256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、PRO256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。

【0244】

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。

【0245】

(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寄託番号により以下の実施例及び明細書全体を通して特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、バージニアである。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。

【0246】

実施例1： ヒトPRO256をコードするcDNAクローンの単離

Swiss-Protデータベースにある約950の公知の分泌タンパク質の細胞外ドメイン(ECD)配列(あるとすれば分泌シグナル配列を含む)をESTデータベースの検索に使用した。ESTデータベースには、公的なESTデータベース(例えばDayhoff, GenBank)及び個人的なESTデータベース(LIFESEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)が含まれた。検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2[Altschul等, Methods in Enzymology, 266: 460-480(1996)]を用い、EST配列の6フレーム翻訳に対するECDタンパク質配列の比較として実施した。公知のタンパク質をコードせず、BLASTスコアが70(90の場合もある)又はそれ以上となる比較物を、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, WA)でコンセンサスDNA配列に集団化して構築した。

【0247】

この細胞外ドメイン相同性スクリーンを使用して、phrapを用いてコンセンサスDNA配列を他のEST配列に対して構築した。さらに、コンセンサス配列を

上記で討議したE S T配列の供給源を用いて可能な限り伸長させるために、この得られたコンセンサスD N A配列を、BLAST又はBLAST-2及びphrapの繰り返しサイクルを用いて頻繁に（常にではないが）伸長させた。

上記に示したpharpを使用して、コンセンサスD N A配列を他のE S T配列に関連して構築した。この構築したコンセンサス配列を、ここでD N A 2 8 7 2 5と命名する。D N A 2 8 7 2 5コンセンサス配列に基づいて、1) P C Rによって対象とする配列を含んだc D N Aライブラリを同定するため、そして2) P R O 2 5 6の完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。

【0248】

P C Rプライマーの対（正方向及び逆方向）を合成した：

正方向P C Rプライマー：

5'-TGTCCACCAAGCAGACAGAAG-3' (配列番号：3)

逆方向P C Rプライマー：

5'-ACTGGATGGCGCCTTTCCATG-3' (配列番号：4)

さらに、次のヌクレオチド配列を持つ合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブをコンセンサスD N A 2 8 7 2 5配列から構築した：

ハイブリッド形成プローブ：

5'-CTGACAGTGACTAGCTCAGACCACCCAGAGGACACGGCCAACGTCACAGT -3'

(配列番号：5)

5'-GGGCTCTTTCCACGCTGGTACTATGACCCACGGAGCAGATCTG-3'

(配列番号：6)

完全長クローンのソースのための幾つかのライブラリをスクリーニングするために、上記で同定したP C Rプライマー対によるP C R増幅によってD N Aをライブラリからスクリーニングした。一つのプローブオリゴヌクレオチド及び一つのP C Rプライマーを使用してP R O 2 5 6遺伝子をコードするクローンを単離するために、次いでポジティブライブラリを使用した。

【0249】

c D N Aライブラリーの構築のためのR N Aをヒト胎盤組織から単離した。c

DNAクローンを単離するために用いたcDNAライブラリーは、例えばInvitrogen, San Diego, CA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、Not I部位を含むオリゴdTでプライムし、Sal Iヘミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、Not Iで切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分割をし、決められた方向で適当なクローニングベクター(pRKB又はpRKD等; pRK5Bは、Sfi I部位を持たないpRK5Dの前駆体である; Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991))に独特のXho I及びNot I部位においてクローン化した。

上記のように単離されたクローンのDNA配列決定によって、ここでDNA 32286-1160と命名された[Fig 1、配列番号: 1]完全長PRO256の完全長DNA配列、並びにPRO256の誘導タンパク質配列を示された。

【0250】

DNA 32286-1160の全ヌクレオチド配列はFig 1 (配列番号: 1)に示されている。クローンDNA 32286-1160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188-190に見かけの翻訳開始部位及びヌクレオチド位置1775-1777の停止コドンを持っていた。予測されるポリペプチド前駆体は529アミノ酸長である(Fig 2)。Fig 2 (配列番号: 2)に示した完全長PRO256の分析は、種々の重要なポリペプチドドメインの存在を明らかにしており、これら重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記そのものである。Fig 2に示したPRO256ポリペプチドの分析によって、以下のことが明らかにされている: 約アミノ酸1から約35のシグナルペプチド; 約アミノ酸466から約483の膜貫通ドメイン; 約アミノ酸66から約70、約アミノ酸235から約239、並びに約アミノ酸523から約527のN-グリコシル化部位、約アミノ酸29から約35、約アミノ酸43から約49、約アミノ酸161から約167、約アミノ酸212から約218、約アミノ酸281から約287、約アミノ酸282から約288、約アミノ酸285から約291、約アミノ酸310から約316、約アミノ酸313から約319、約アミノ酸422から約428、約アミノ酸423から約4

29、及び約アミノ酸426から約432のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸193から約199の細胞接着部位；並びに約アミノ酸278から約298、及び約アミノ酸419から約438の膵臓トリプシンインヒビター（クニッツ）ファミリーシグネチャー。クローンDNA35880-1160は、1997年10月16日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209379が付与されている。

完全長PRO256ポリペプチドのアミノ酸配列の分析は、その一部がヒトビクニンと有意な相同性を有し、従ってPRO256が新規なプロテアーゼインヒビターである得ることが示す。

【0251】

実施例2： PRO256による肝細胞成長因子活性化の阻害

PRO256による¹²⁵I-一本鎖肝細胞成長因子（scHGF）のその二本鎖成熟HGF型への変換の阻害に関するタイムコースの研究をおこなった。加えて、カリクレインによる一本鎖肝細胞成長因子（scHGF）のタンパク質分解性切断、並びにPRO256による阻害を研究した。

肝細胞成長因子アクチベーターの触媒ドメインは、血液凝固因子XIIa（47%）及び血漿カリクレイン（37%）を含む他のセリンプロテアーゼとかなりのアミノ酸配列類似性を共有する（Shimomuraら., Eur. J. Biochem, 299: 257-261(1995)）。加えて、因子XIIは、血漿カリクレイン切断によって活性化されることが示されている（Dunnら., J. Biol. Chem., 257: 1779-1784(1982)）。

。

【0252】

一本鎖肝細胞成長因子（scHGF）の発現及び精製

血清HGFアクチベーターによる一本鎖HGFの活性化を避けるために、発現系及び精製プロトコールを無血清培地でおこなった。血清は、肝細胞成長因子アクチベーター酵素の主要なソースであると思われる（Nakaら., J. Biol. Chem., 267: 20114-20119(1992)）。

【0253】

一本鎖肝細胞成長因子（scHGF）の¹²⁵I-標識化

250 μ l のヨードジェン (Iodogen) (1,3,4,6-テトラクロロ-3,6-ジフェニル グライコーウリル) (1,3,4,6-tetrachloro-3,6,-diphenyl glycoluril) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) の (0.5 mg/ml) クロロホルム溶液を、5 ml のホウケイ酸塩ガラス管へ配した。窒素ガスの安定した流れの下で、溶媒を室温で蒸発させ、先々の使用まで乾燥した材料をデシケーターに貯蔵した。HGF (700 μ g) の 20 mM HEPES、pH 7.2, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ (HBSバッファー) 溶液を乾燥ヨードジェン (Iodogen) 材料に添加した。¹²⁵I-ナトリウム溶液 (NEN Life Sciences Inc., Boston, MA) を添加し (5 μ Ci/ μ g タンパク質) を添加し、この反応混合液を氷上にて5分間、穏やかに回旋しながらインキュベートした。次いで、この材料を20カラム容量のHBSバッファーで平衡化したPD-10カラム (Pharmacia, Upsala, Sweden) へ充てた。¹²⁵Iで標識されたscHGFを含む分画を収集してプールした。その比活性は、0.4 μ Ci/ μ g scHGFであった。還元及び非還元条件の下でのSDS-PAGEによる分析は、HGFの10%より低い一本鎖型がその二本鎖型へ変換されていることを示した。

アクチベーターとして因子XIIa (20 nM; Haematologic Technologies) を使用する活性化アッセイにおいて、ヨードジェン (Iodogen) scHGFを、非標識のscHGFと比較した。二本鎖型へのscHGF変換のタイムコースを、クーマシー染色 (非標識HGF) の後、SDS-PAGE、続いてオートラジオグラフィ (¹²⁵I-HGF) で分析した。標識及び非標識のHGFの双方が同じように変換されており、このことは、scHGFのヨウ素化が、例えば因子XIIaのようなscHGFのアクチベーターによるプロセッシングを害しなかったことを示唆している。

【0254】

ヒト血清による¹²⁵I標識一本鎖HGFの活性化

ヒト血清 (ICN Pharmaceuticals) を異なる濃度のPRO256と15分間、37℃でインキュベートした。この反応を開始するために、¹²⁵I-scHGFのHBSバッファーを添加した。この反応混合液の¹²⁵I-scHGF及び血清の濃度は、それぞれ50 μ g/ml及び10%であった。異なるタイムポイ

ントでアリコートを取り出し、還元剤であるジチオスレイトール (Bio-Rad) を含む試料バッファー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)へ添加した。短い加熱の後、試料 (およそ 10^5 cpm / lane) を 4 - 20% グラジエントのポリアクリルアミドゲル (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) へ負荷した。電気泳動の後、乾燥ゲルを 12 - 24 時間にわたって x-線フィルム (X-OMATAR, Eastman Kodak Company, Rochester, NY) 上に曝露した。フィルムを現像 (Kodak M35A X-OMAT Processor) し、スキャン (Umax S-12, Umax Data System, Inc., Fremont, CA) し、さらに Adobe V 5.5 Photoshop software (Adobe System Inc., San Jose, CA) で加工した。

Fig 3 a - 3 b は、二本鎖型への 125 I-s c HGF のヒト血清媒介変換、及び PRO 256 によるこの変換の阻害を示している。

【0255】

Fig 3 a は、二本鎖型への 125 I-s c HGF のヒト血清媒介変換に対する PRO 256 による阻害のタイムコースの研究を示している。 125 I-s c HGF をヒト血清 (10%) と 37 でインキュベートし、異なった時間に採取したアリコートを還元条件下で SDS-PAGE によって分析した。ゲルの上端から下端までのバンドは、s c HGF、HGF 重鎖 (-鎖)、そして HGF 軽鎖 (二重線; -鎖) である。左のレーン (+) は、PRO 256 (1 μ M) が存在し、右のレーン (-) は、PRO 256 が無い。インヒビター PRO 256 の存在の下 (0, 0.5 時間, 1 時間, 2 時間, 及び 4 時間の時間間隔) では、ゲル上の上端の太いバンドによって示されているように、 125 I-s c HGF はその二本鎖型へ変換されていない。対照的に、インヒビター PRO 256 が存在しない場合には、二本鎖型への 125 I-s c HGF の血清媒介変換は、4 時間のインキュベーション内で起こる。

Fig 3 b は、4 時間のインキュベーション後の血清媒介 125 I-s c HGF 活性化の PRO 256 濃度依存阻害を示す。レーン C は、阻害されていない 125 I-s c HGF 変換に該当する; レーン 0 は、タイムポイントが 0 分である; レーン 1 - 7 は、インヒビター PRO 256 の減少する濃度 (1.27 μ M, 0.42 μ M, 0.14 μ M, 0.047 μ M, 0.016 μ M, 0.005 μ M)

イクロ μ M, 及び0.0017 μ M)の存在下での4時間のインキュベーション後に採取したアリコートに該当する。

【0256】

カリクレインによるscHGFのタンパク質分解性切断、及びPRO256による阻害

血清に代わってカリクレイン (Haematologic Technologies, Essex Junction, VT) を使用したことを除くと、ヒト血清による 125 I-scHGF活性化に関して記載されているようにしてアッセイを実行した。インヒビターPRO256のHBSバッファーを、 125 I-scHGFを添加する前に、カリクレインで15分間、37℃でインキュベートした。HBSバッファー中のカリクレイン、 125 I-scHGF及びインヒビターPRO256の濃度は、それぞれ40nM, 50 μ g/mlそして1 μ Mである。ヒト因子XIIのタンパク質分解性活性は、HGFアクチベーターインヒビターによって阻害されることが示されなかった。従って、PRO256の特異性のためのコントロールとしては、ヒト因子XIIa (F.XIIa; Haematologic Technologies) を使用した。実験は、カリクレインに関して記載した内容でおこなった。

【0257】

PRO256によるカリクレイン酵素活性の阻害

ヒトカリクレインを、0.5mg/ml BSAを含むPRO256のHBSバッファーで20分間にわたって室温でインキュベートした。発色体基質であるS2305 (Diapharma Group Inc., Columbus, OH) を添加し、495nmでの吸光度の変化をカインティック マイクロプレート プレート リーダー (Molecular Devices, Menlo Park, CA) で測定した。この反応混合物中のカリクレインとS2305の最終濃度は、それぞれ1.25nM及び1.8mMであった。

別の実験では、このアッセイでのS2305の K_M 値を168 μ Mと測定した。発色体基質S2305に関してPRO256の競合阻害モードを仮定すると、見かけの K_i (K_i^*) を、式 $K_i^* = IC_{50} / (1 + (S / K_M))$ (Chengら., Biochem. Pharmacol., 22:3099-3109(1973)) に従って計算し、この式のSはS2305の使用濃度である (Fig 5を参照)。

Fig 4 (a) から 4 (b) は、ヒトカリクレイン及びヒト因子X I I aによる¹²⁵I-s c H G Fのタンパク質分解性切断に関するP R O 2 5 6の阻害研究を示す。

【 0 2 5 8 】

Fig 4 aは、ヒトカリクレインによる¹²⁵I-s c H G F (5 0 μ g / m l)の切断、並びにP R O 2 5 6 (1 μ M)による阻害を示す。¹²⁵I-s c H G Fを添加する前に、カリクレインを15分間で37℃にわたって、P R O 2 5 6とインキュベートした。反応は、37℃でおこなった。(+)と表記されたレーンはP R O 2 5 6の存在を示し、(-)はP R O 2 5 6が無いことを示す(= コントロール)。P R O 2 5 6の存在の下では、二本鎖型への¹²⁵I-s c H G Fのカリクレイン変換は、コントロールと比較して、4時間のインキュベーションにわたって阻害される。

Fig 4 bは、ヒト因子X I I a (4 0 n M)による¹²⁵I-s c H G Fの変換、並びにP R O 2 5 6によるその阻害が欠如していることを示す。¹²⁵I-s c H G Fを添加する前に、因子X I I aをP R O 2 5 6で15分間にわたって37℃でプレインキュベートした。反応は、37℃でおこなった。(+)と表記されたレーンはP R O 2 5 6の存在を示し、(-)はP R O 2 5 6が無いことを示す(= コントロール)。P R O 2 5 6の存在又は存在しない下では、X I I aは¹²⁵I-s c H G Fをその二本鎖型へ変換し、それによってP R O 2 5 6による阻害が無いことが示されている。

【 0 2 5 9 】

実施例3： ハイブリダイゼーションプローブとしてのP R O 2 5 6の使用

以下の方法は、P R O 2 5 6をコードするヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションプローブとしての利用を示す。

完全長又は成熟P R O 2 5 6をコード化配列、又はその断片を含むDNA (添付した図面に示されている) は、ヒト組織c D N Aライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリの相動的なDNA (P R O 2 5 6の天然発生変異体をコードするもの等) のスクリーニングのためのプローブとして用いられ得る。

ハイブリダイゼーション、そしていずれかのライブラリDNAを含むフィルタ

一の洗浄を、次の高緊縮性条件の下で実施する。PRO256ポリペプチドをコードする遺伝子から誘導される放射標識誘導プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションを、50%ホルムアミド、5×SSC、0.1%SDS、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、2×デンハート液、及び10%デキストラン硫酸の溶液中で42℃で20時間にわたって実施する。フィルターの洗浄は、0.1×SSC及び0.1%SDS水溶液中において42℃で実施する。

次いで、全長天然配列をコードするDNAと所望の配列同一性を有するDNAは、この分野で知られている標準的技術を用いて同定することができる。

【0260】

実施例4：大腸菌でのPRO256の発現

この実施例は、大腸菌中における組み換え発現によるPRO256の非グリコシル化型の調製を例証する。

PRO256をコードするDNA配列は、選択したPCRプライマーを利用して最初に増幅される。このプライマーは、選択された発現ベクター上の制限酵素部位に対応する制限酵素部位を含まなければならない。様々な発現ベクターを使用することができる。適したベクターの例としては、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性に対する遺伝子を含むpBR322(大腸菌由来; Bolivarら, Gene, 2:95 (1997)を参照のこと)がある。ベクターは制限酵素によって消化され、脱リン酸化される。次いで、PCR増幅配列をベクターにライゲーションする。ベクターは好ましくは抗生物質耐性遺伝子、trpプロモーター、ポリHisリーダー(最初の6つのSTIIコドン、ポリHisリーダー、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む)、PRO256コード領域、ラムダ転写集結因子及びargU遺伝子をコードする配列を含む。

【0261】

次いで、Sambrookら、上記に記載されている方法を用いて選択された大腸菌株を形質転換するために、このライゲーション混合物を利用した。形質転換体をLB部プレート上でのその成長能力によって同定し、次いで抗生物質耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを単離し、それを制限分析及びDNA配列決定によ

って確認することができる。

選択されたクローンを、抗生物質が補填されたLBプロスのような液体培地で一晩かけて成長させることができる。この一晩の培養を、次により大きなスケールでの培養を播種するために使用してもよい。そして、細胞を所望の光学密度になるまで成長させ、その間に発現プロモーターが作用し始める。

更に数時間、細胞を培養した後に、遠心分離によって細胞を収集することが可能である。遠心分離によって得られた細胞ペレットは、当該分野で公知の様々な薬剤を使用して可溶化でき、次いで、この溶解したPRO256タンパク質を、タンパク質の堅固な結合を可能にする条件下において金属キレート化カラムを用いて精製すること可能である。

【0262】

以下の手法を用いて、ポリ-Hisタグ形態でPRO256を大腸菌で発現させてもよい。PRO256をコードするDNAを、選択したPCRプライマーを用いて最初に増幅する。このプライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いで、PCR増幅されたポリ-Hisタグ配列を発現ベクターへ結合させ、これを株52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)) に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用する。形質転換体を、最初に50 mg/mlのカルベニシリンを含有するLB中で、30℃で振盪しながら3-5のOD₆₀₀に達するまで成長させる。次いで、培養液をCRAP培地(3.57gの(NH₄)₂SO₄、0.71gのクエン酸ナトリウム・2H₂O、1.07gのKCl、5.36gのDifco酵母抽出物、500mL水中の5.36gのSheffield hycase SF、並びに110mMのMPO₅、pH7.3、0.55%(w/v)のグルコース及び7mMのMgSO₄の混合で調製)中にて50-100倍希釈し、30℃で振盪によって約20-30時間成長させる。SDS-PAGEにより発現を確認するために試料を取り出し、細胞がペレットとなるようにバルク培地を遠心分離する。精製及びリフォールディング(再折りたたみ)まで、細胞ペレットを凍結する。

【0263】

0.5から1Lの発酵(6-10gペレット)からの大腸菌ペーストを、7Mのグアニジン、20mMのトリス、pH8バッファー中で10容量(w/v)で再懸濁させる。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々0.1M及び0.02Mとし、溶液を4で終夜攪拌する。この工程により、すべてのシステイン残基が亜硫酸によりブロックされた変性タンパク質が生じる。溶液をBeckman Ultracentrifuge中で40,000rpmで30分間遠心分離する。上清を金属キレートカラムバッファー(6Mのグアニジン、20mMのトリス、pH7.4)の3-5容量で希釈し、透明にするために0.22ミクロンフィルターを通して濾過する。透明抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた5mlのQiagen Ni-NTA金属キレートカラムに負荷する。カラムを50mMのイミダゾール(Calbiochem, Ultrapure grade)を含む添加バッファー、pH7.4で洗浄する。タンパク質を250mMのイミダゾールを含有するバッファーで溶離する。所望のタンパク質を含有する画分をプールし、4で保存した。タンパク質濃度は、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて280nmにおけるその吸収から見積もる。

【0264】

試料を20mMのトリス、pH8.6、0.3MのNaCl、2.5Mの尿素、5mMのシステイン、20mMのグリシン及び1mMのEDTAからなる新たに調製した再生バッファー中で徐々に希釈することによって、タンパク質を再生させる。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が50~100マイクログラム/mlとなるように選択する。リフォールディング溶液を4で12-36時間ゆっくり攪拌する。リフォールディング反応を、TFAを採取濃度0.4%(約3のpH)で添加することにより停止する。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を0.22ミクロンフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度2-10%で添加する。再生したタンパク質を、Poros R1/H逆相カラムで、0.1%TFAの移動バッファーと10~80%のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかける。A₂₈₀吸収を持つ画分のアリコートにSDSポリアクリルアミドゲルで分析し、相同な再生タンパク質を含有す

る画分をプールする。一般的に、殆どの正確に再生したタンパク質種は、これらの種が最もコンパクトであり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。誤って再生したタンパク質を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。

所望の再生したPRO256ポリペプチドを含有する画分をプールし、溶液に向けた窒素の弱い気流を用いてアセトニトリルを除去する。タンパク質を、透析又は調製バッファーで平衡化したG25 Superfine (Pharmacia) 樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、0.14 Mの塩化ナトリウム及び4%のマンニトールを含む20 mMのHepes、pH 6.8に調製する。

【0265】

実施例5：哺乳動物細胞におけるPRO256の発現

この実施例は、哺乳動物細胞における組み換え発現による潜在的にグリコシル化した形態のPRO256の調製を例証する。

発現ベクターとしてベクターpRK5 (1989年3月15日公開のEP307,247参照)を用いた。場合によっては、PRO256 DNAを選択した制限酵素を持つpRK5に結合させ、上記のSambrook等に記載されたようなライゲーション方法を用いてPRO256 DNAを挿入させる。得られたベクターは、pRK5-PRO256と呼ばれる。

【0266】

一実施態様では、選択された宿主細胞は293細胞とすることができる。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)を、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び/又は抗生物質を添加したDMEMなどの培地中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化する。約10 µgのpRK5-PRO256 DNAを、約1 µgのVA RNA遺伝子コード化DNA [Thimmappayaら, Cell, 31:543 (1982)]と混合し、500 µlの1 mM トリス-HCl、0.1 mM EDTA、0.227 M CaCl₂に溶解する。この混合物に、滴状の500 µlの50 mM HEPES (pH 7.35)、280 mM NaCl、1.5 mM NaPO₄を添加し、25 で10分間析出物を形成させる。析出物を懸濁し、293細胞に加

えて37で約4時間定着させる。培地を吸引し、2mlのPBS中20%グリセロールを30秒間添加する。293細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートする。

【0267】

形質移入の約24時間後、培地を除去し、培地(のみ)又は200 μ Ci/ml³⁵S-システイン及び200 μ Ci/ml³⁵S-メチオニンを含む培地で置換する。12時間のインキュベーションの後、培養上清を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15%SDSゲルに添加する。処理したゲルを乾燥させ、PRO256ポリペプチドの存在を現す選択した時間の間フィルムに曝露する。形質転換した細胞を含む培地に、更なるインキュベーションを施し(無血清培地で)、培地を選択したバイオアッセイで試験する。

【0268】

これに換わる技術では、PRO256を、Sompanyacら、PRO256c. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて293細胞へ一過的に導入する。293細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700 μ gのpRK5-PRO256DNAを添加する。細胞を、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄する。DNA-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートする。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培地で洗浄し、5 μ g/mlウシインシュリン及び0.1 μ g/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入する。約4日後に、培養上清を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去する。次いで発現されたPRO256を含む試料を濃縮し、透析及び/又はカラムクロマトグラフィー等の任意の選択した方法によって精製する。

【0269】

他の実施態様では、PRO256をCHO細胞で発現させることができる。pRK5-PRO256は、CaPO₄又はDEAE-デキストランなどの公知の試薬を用いてCHO細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地(のみ)、又は³⁵S-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。PRO256ポリペプチドの存

在を同定した後、培地を無血清培地で置換してもよい。好ましくは、培地を約6日間インキュベートし、次いで培養上清を収集する。次いで、発現したPRO256を含む培地を濃縮し、任意の選択した方法によって精製することができる。

また、エピトープタグPRO256は、宿主CHO細胞で発現させてもよい。PRO256は、pRK5ベクターからサブクローニングしてもよい。サブクローン挿入物は、PCRを施してバキュロウイルス発現ベクター中のポリ-hisタグ等の選択したエピトープタグを持つ枠に融合できる。ポリ-hisタグPRO256挿入物は、次いで、安定なクローンの選択のためのDHFR等の選択マーカーを含むSV40誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、CHO細胞をSV40誘導ベクターで(上記のように)形質移入する。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-hisタグPRO256を含む培地は、次いで濃縮し、Ni²⁺-キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製できる。

【0270】

また、PRO256は、一過性発現法によってCHO及び/又はCOS細胞で、或いは他の安定な発現方法によってCHO細胞で発現させてもよい。

CHO細胞における安定な発現を、以下の方法を用いて実施する。タンパク質は、それぞれのタンパク質の可溶化形態のコード配列(例えば、細胞外ドメイン)がIgG1のヒンジ、CH2及びCH2ドメインを含む定常領域配列に融合したIgG作成物(イムノアドヘシン)、又はポリ-Hisタグ形態として発現される。

PCR増幅に続いて、対応するDNAを、Ausubelら、Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.26, John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いてCHO発現ベクターにサブクローニングした。CHO発現ベクターを、対象とするDNAの5'及び3'に適合する制限部位を有し、cDNAの便利なシャトル化ができるように作成する。CHO細胞での発現に使用したベクターは、Lucasら、Nucl. Acids Res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようなものであり、対象とするcDNA及びジヒドロフォレートレダクターゼ(DHFR)の発現の制御に、SV40初期プロモーター/エンハン

サーを使用している。DHFR発現は、形質移入に続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

所望のプラスミドDNAの12マイクログラムを、市販の形質移入試薬Superfect(登録商標)(Quiagen), Dospoer(登録商標)及びFugene(登録商標)(Boehringer Mannheim)を使用して約1千万のCHO細胞に導入する。この細胞を、上記のLucas等に記載されているように成長させる。下記のような更なる成長及び生産のために、約 3×10^7 細胞をアンプル中で凍結する。

【0271】

プラスミドDNAを含むアンプルを水槽に配して解凍し、ボルテックスによって混合する。内容物を10mLの媒質を含む遠心管にピペットし、1000rpmで5分間遠心分離する。上清を吸引して、細胞を10mLの選択培地(0.2 μ m濾過PS20、5%の0.2 μ m透析濾過ウシ胎児血清を添加)中に懸濁する。次いで、細胞を90mLの選択培地を含む100mLスピナーに分ける。1-2日後、細胞を150mLの選択培地で満たした250mLスピナーに移し、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートする。さらに2-3日後、250mL、500mL及び2000mLのスピナーを 3×10^5 細胞/mLで播種する。細胞培地を、遠心分離及び生産培地への再懸濁によって新鮮培地に交換する。任意の適切なCHO培地を用いてもよいが、実際には1992年6月16日に発行された米国特許第5,122,469号に記載されている生産培地を使用してもよい。3Lの生産スピナーを 1.2×10^6 細胞/mLで播種する。0日目に、細胞数とpHを測定する。1日目に、スピナーをサンプルし、濾過空気での散布を実施する。2日目に、スピナーをサンプルし、温度を33 $^{\circ}$ Cに変え、30mLの500g/Lのグルコース及び0.6mLの10%消泡剤(例えば35%ポリジメチルシロキサンエマルジョン、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion)を利用する。生産を通して、pHは7.2近傍に調節し維持する。10日後、又は生存率が70%を下回るまで、細胞培地を遠心分離で回収して0.22 μ mフィルターを通して濾過する。その濾過物は、4 $^{\circ}$ Cで貯蔵するか、即座に精製用カラムに充填する。

【0272】

ポリ-Hisタグ作成物については、タンパク質をNi-NTAカラム(Qiagen

)を用いて精製する。精製の前に、イミダゾールを培養上清に5 mMの濃度で添加する。培養上清を、0.3 MのNaCl及び5 mMイミダゾールを含む20 mMのHepes, pH 7.4バッファーで平衡化した6 mlのNi-NTAカラムへ、4-5 ml/分の流速によって4 でポンプ供給する。充填後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25 Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離する。高度に精製されたタンパク質は、続いて10 mMのHepes、0.14 MのNaCl及び4%のマニトール, pH 6.8を含む貯蔵バッファー中で25 mlのG25 Superfine (Pharmacia)を用いて脱塩し、-80 で貯蔵する。

イムノアドヘシン (Fc含有) 作成物を、以下通りに培養上清から精製する。培養上清を、20 mMのリン酸ナトリウムバッファー, pH 6.8で平衡化した5 mlのプロテインAカラム (Pharmacia) へポンプ注入する。充填後、カラムを平衡バッファーで十分に洗浄した後、100 mMのクエン酸, pH 3.5で溶離する。溶離したタンパク質は、1 mlの画分を275 µLの1 Mトリスバッファー, pH 9を含む管に回収することによって即座に中性化する。高度に精製したタンパク質は、続いてポリ-His タグタンパク質に関して上記に記した貯蔵バッファー中で脱塩する。均一性は、SDS ポリアクリルアミドゲルとエドマン (Edman) 分解によるN-末端アミノ酸配列決定によって評価する。

【0273】

実施例6：酵母菌でのPRO256の発現

以下の方法には、酵母菌中でのPRO256の組換え発現を記載する。

最初に、ADH2 / GAPDHプロモーターによるPRO256の細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。PRO256の細胞内発現を導くために、PRO256をコードするDNA及びプロモーターを、選択したプラスミドの適当な制限酵素部位へ挿入する。分泌のために、PRO256をコードするDNAを、ADH2 / GAPDHプロモーターをコードするDNA、天然PRO256シグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌 因子又はインベルターゼ分泌シグナル/リーダー配列、及び(必要ならば) PRO256の発現のためのリンカー配列とともに、選択したプラスミド

ヘクローニングすることができる。

【0274】

酵母菌株 A B 1 1 0 等の酵母菌は、次いで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択さし発酵培地で培養できる。形質転換した酵母菌上清を、10%トリクロロ酢酸での沈降及び SDS - PAGE による分離で分析し、続いてクマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。

続いて、発酵培地から遠心分離によって酵母菌細胞を除去し、次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって、組換え PRO 2 5 6 を単離及び精製できる。PRO 2 5 6 を含む濃縮物は、選択したカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。

ここに開示した PRO 2 5 6 ポリペプチドの多くが、上記のようにして成功裏に発現された。

【0275】

実施例7：バキュロウイルス感染昆虫細胞での PRO 2 5 6 の発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中における組換え発現を記載する。

PRO 2 5 6 コードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させる。このようなエピトープタグは、ポリ-his タグ及び免疫グロブリンタグ (I g G の F c 領域など) を含む。p V L 1 3 9 3 (Navagen) などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。要約すると、PRO 2 5 6 又は PRO 2 5 6 コード配列の所定部分、例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列などが、5' 及び 3' 領域に相補的なプライマーでの PCR により増幅される。5' プライマーは、隣接する (選択された) 制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、次いで、選択した制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及び BaculoGold (商品名) ウイルス DNA (Pharmingen) を、Spodoptera frugiperda (「 S f 9 」) 細胞 (A T

CC CRL 1711)中にリポフェクチン(GIBCO-BRLから市販)を用いて同時形質移入することにより作成される。28で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いる。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilleyら, Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施する。

【0276】

次に、発現されたポリ-hisタグPRO256は、例えばNi²⁺-キレートアフィニティークロマトグラフィーによって、次のように精製される。抽出は、Rupertら, Nature, 362:175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染した組み換えSf9細胞から調製する。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー(25mLのHepes, pH7.9; 12.5mMのMgCl₂; 0.1mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1%のNP-40; 0.4MのKCl)中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理する。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を負荷バッファー(50mMリン酸塩、300mMのNaCl、10%グリセロール、pH7.8)で50倍希釈し、0.45μmフィルターで濾過する。Ni²⁺-NTAアガロースカラム(Qiagenから市販)を5mLの総容積で調製し、25mLの水で洗浄し、25mLの負荷バッファーで平衡化する。濾過した細胞抽出物は、毎分0.5mLでカラムに負荷する。カラムを、分画回収が始まる点であるA₂₈₀のベースラインまで負荷バッファーで洗浄する。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー(50mMリン酸塩; 300mMのNaCl、10%グリセロール、pH6.0)で洗浄する。A₂₈₀のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で0から500mMイミダゾール勾配で展開する。1mLの分画を回収し、SDS-PAGE及び銀染色、又はアルカリホスファターゼ(Qiagen)と複合化したNi²⁺-NTAのウェスタンブロットで分析する。溶離したHis₁₀-タグPRO256を含む画分をプールし、負荷バッファーで透析する。

あるいは、IgGタグ(又はFcタグ)PRO256の精製は、例えば、プロ

テインA又はプロテインGカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

【0277】

実施例8：PRO256に結合する抗体の調製

この実施例は、実質的に他のどんなポリペプチド又はポリペプチドエピトープと結合することなく、PRO256ポリペプチド又はPRO256ポリペプチド上のエピトープと特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

モノクローナル抗体の生産のための技術は、この分野で知られており、例えば、上記のGodingに記載されている。用いられ得る免疫原は、精製PRO256、PRO256を含む融合タンパク質、細胞表面に組換えPRO256を発現する細胞を含む。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなくすることができ。

【0278】

Balb/c等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内へ1-100マイクログラムで注入したPRO256免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をMPL-TDMアジュバント(Ribi Immunochemical Research, ハミルトン, モンタナ)に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで10から12日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗PRO256抗体の検出のためのELISAアッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「ポジティブ(陽性)」な動物に、PRO256静脈内注射の最後の注入をすることができる。3から4日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出した。次いで脾臓細胞を(35%ポリエチレングリコールを用いて)、ACTTから番号CRL1597で入手可能なP3X63AgU.1等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン)培地を含む96ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨

髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

【0279】

ハイブリドーマ細胞は、PRO256に対する反応性に関するELISAによってスクリーニングできる。PRO256に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ(陽性)」ハイブリドーマ細胞の判定は、技術常識の範囲内である。

陽性ハイブリドーマ細胞を同系のBalb/cマウスに腹腔内注入し、抗-PRO256モノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィ - を用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインA又はプロテインGへの親和性に基づくアフィニティクロマトグラフィを用いることもできる。

【0280】

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20110-2209米国(ATCC)に寄託した:

材料	ATCC寄託番号	寄託日
DNA385880-1160	209379	1997年10月16日

【0281】

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条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号886OG638の3

7 C F R 第 1 . 1 4 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。

【 0 2 8 2 】

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。

【 0 2 8 3 】

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 】 配列番号：1がここで「DNA 3 5 8 8 0 - 1 1 6 0」と命名された、天然配列 P R O 2 5 6 c D N A のヌクレオチド配列（配列番号：1）。

【 F i g 2 】 F i g 1 に示した配列番号：1のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：2）。

【 F i g 3 (a) - (b) 】 ¹²⁵I-一本鎖肝細胞成長因子 (s c H G F) の二本鎖形態へのヒト血清媒介による変換、並びに P R O 2 5 6 による阻害のタイムコース。F i g 3 (a) は、阻害のタイムコースを示す。¹²⁵I-H G F を 3 7 ° C でヒト血清 (1 0 %) でインキュベートし、異なった時間にアリコート採取して還元条件下で S D S - P A G E によって分析した。ゲルの上から下

までのバンドは、s c H G F、H G F重鎖（ -鎖）そしてH G F軽鎖（二重線； -鎖）である。左のレーン（+）はP R O 2 5 6（1 μ M）があり、右のレーン（-）はP R O 2 5 6がない。F i g 3（b）は、4時間のインキュベーション後の、血清媒介¹²⁵I-s c H G F活性化のP R O 2 5 6濃度依存性阻害を示す；レーンCは、阻害されていない¹²⁵I-s c H G F変換；レーン0は、タイムポイント0分；レーン1-7は、P R O 2 5 6の減少する濃度（1.27 μ M、0.42 μ M、0.14 μ M、0.047 μ M、0.016 μ M、0.005 μ M、及び0.00017 μ M）の下での4時間のインキュベーション後に採取したアリコートを示す。

【F i g 4（a）-（b）】 ヒトカリクレイン及びヒト因子X I I aによる¹²⁵I-s c H G Fのタンパク質分解性切断。F i g 4（a）は、ヒトカリクレイン（40 nM）による¹²⁵I-s c H G F（50 μ g / m l）の切断、並びにインヒビターP R O 2 5 6（1 μ M）による阻害を示す。¹²⁵I-s c H G Fを添加する前に、カリクレインをインヒビターP R O 2 5 6とともに37で15分間にわたってプレインキュベーションした。反応は37でおこない、（+）はインヒビターP R O 2 5 6の存在を示し、（-）はインヒビターP R O 2 5 6が存在しないことを示す（=コントロール）。F i g 4（b）は、ヒト因子X I I a（40 nM）による¹²⁵I-s c H G Fの変換、そしてインヒビターP R O 2 5 6による阻害がないことを示す。

【F i g 5】 インヒビターP R O 2 5 6による、小合成基質（S 2 3 0 5）に対するヒトカリクレイン酵素活性の阻害を示す。カリクレイン（最終濃度が1.25 nM）及びインヒビターP R O 2 5 6又は特異的因子阻害剤トウモロコシトリプシンインヒビター（C T I）を、室温で20分間にわたってインキュベートした。S 2 3 0 5（最終濃度が1.8 mM）を添加し、吸光度の変化を405 nMで測定した。酵素活性の阻害を二つの実験のコントロール速度（m O D₄₀₅ / m i n）の百分率で表した。インヒビターP R O 2 5 6の測定I C₅₀は104 nMであり、計算されたK_i*は37 nMであった。

【 図 1 】

FIGURE 1

GGGGGAGAAGGCGGCCGAGCCCCAGCTCTCCGAGCACCGGTCGGAAGCCGCGACCCGAGCCGCGCAGGAA
GCTGGGACCGGAACCTCGGCGGACCCGGCCCCACCCAACTCACCTGCGCAGGTCAACAGCACCCCTCGGAAC
CCAGAGGCCCGCGCTCTGAAGGTGACCCCCCTGGGGAGGAAGGCGATGGCCCTGCGAGGACGATGGCCCG
CGCCCGCCTCGCCCCGGCCGGCATCCCTGCCGTGCGCTTGTGGCTTCTGTGCACGCTCGGCCTCCAGGGCA
CCCAGGCCGGGCCACCGCCCCGCGCCCCCTGGGCTGCCCGCGGGAGCCGACTGCCCTGAACAGCTTTACCGCC
GGGGTGCCCTGGCTTTCGTGCTGGACACCAACGCCTCGGTACAGCAACGGAGCTACCTTCTGGAGTCCCCAC
CGTGCGCCGGGGCTGGGACTGCGTGCGCGCCTGCTGCCACCCAGAACTGCAACTTGGCGCTAGTGGAGC
TGCAGCCGACCCGCGGGGAGGACGCCATCGCCGCTGCTTCCATCAACTGCCTTACAGAGCAGAACTTC
GTGTGCAAGTTTCGCGCCAGGGAGGGCTTCATCAACTACCTACGAGGGAAGTGTACCGCTCCTACCGCCA
GCTGCGGACCCAGGGCTTTGGAGGGTCTGGGATCCCCAAGGCCTGGGCAGGCATAGACTTGAAGGTACAAC
CCCAGGAACCCCTGGTGTGAAGGATGTGGAAAACACAGATTGGCGCTACTGCGGGGTGACACGGATGTC
AGGGTAGAGAGGAAAGACCCAAACCAGGTGGAACGTGGGGACTCAAGGAAGGCACCTACCTGTTCAGCT
GACAGTGACTAGCTCAGACCACCCAGAGGACACGGCCAACGTACAGTCACTGTGTGTCCACCAAGCAGA
CAGAAGTACTGCCTCGCATCCAACAAGGTGGGTGCTGCCGGGGCTTTTTCCACGCTGGTACTATGAC
CCCACGGAGCAGATCTGCAAGAGTTTCGTTTTATGGAGGCTGCTTGGGCAACAAGAACAACCTACCTTCGGGA
AGAAGAGTGCAATCTAGCCTGTCCGGGTGTGCAAGGTGGCCCTTTGAGAGGCAGCTCTGGGGCTCAGGCGA
CTTTCCCCCAGGGCCCCCTCCATGGAAAGGCGCCATCCAGTGTGCTCTGGCACCTGTGAGCCACCCAGTTC
CGCTGCAGCAATGGCTGCTGCATCGACAGTTTCCCTGGAGTGTGACGACACCCCACTGCCCCGACGCCTC
CGACGAGGCTGCCTGTGAAAAATACACGAGTGGCTTTGACGAGCTCCAGCGCATCCATTTCCCAGTGACA
AAGGGCACTGCGTGGACCTGCCAGACACAGGACTCTGCAAGGAGAGCATCCCGCGCTGGTACTACAACCCC
TTCAGCGAACTGCGCCCGCTTACCTATGGTGGTTGTTATGGCAACAAGAACAACCTTTGAGGAAGAGCA
GCAGTGCCCTCGAGTCTGTGCGGGCATCTCCAAGAAGGATGTGTTTGGCCTGAGGCGGAAATCCCCATTC
CCAGCACAGGCTCTGTGAGATGGCTGTCAAGTGTTCCTGGTCACTGCAATTGGTGGTGGTGGTAGCCATC
TTGGGTTACTGCTTCTTCAAGAACCAGAGAAAGGACTTCCACGGACACCACCACCACCACCACCACCACC
TGCCAGCTCCACTGTCTCCACTACCGAGGACACGGAGCACCTGGTCTATAACCACACCACCCGGCCCCCTC
GAGCCTGGGTCTCACCGCTCTCACCTGGCCCTGCTTCCCTGCTTGCCAAGGCAGAGGCTGGGCTGGGAAA
AACTTTGGAACCAGACTCTTGCCGTGTTTCCAGGCCACTGTGCCTCAGAGACCAGGGCTCCAGCCCCCTCT
TGGAGAAGTCTCAGCTAAGCTCACGTCTGAGAAAGCTCAAAGGTTTGAAGGAGCAGAAAACCCCTGGGC
CAGAAGTACCAGACTAGATGGACCTGCCTGCATAGGAGTTTGGAGGAAGTTGGAGTTTGTTCCTCTGTT
CAAAGTGCCTGTCCCTACCCATGGTGTAGGAAGAGGAGTGGGGTGGTGTGAGACCCTGGAGGCCCCAA
CCCTGTCTTCCCAGCTCCTCTTCATGCTGTGCGCCAGGGCTGGGAGGAAGGACTTCCCTGTGTAGTTT
GTGCTGTAAGAGTTGCTTTTGTTTAATTAATGCTGTGGCATGGGTGAAGAGGAGGGGAAGAGGCCCTGTT
TGGCTCTCTGTCTCTCTTCCCTTCCCCAAGATTGAGCTCTCTGCCCTTGATCAGCCCCACCCTGGCC
TAGACCAGCAGACAGAGCCAGGAGAGGCTCAGCTGCATTCCGAGCCCCCACCACCAAGGTTCTCCAACAT
CACAGCCAGCCACCCACTGGGTAATAAAAGTGGTTTGTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図2】

FIGURE 2

MAPARTMARARLAPAGIPAVALWLLCTLGLQGTQAGPPPAPPGLPAGADCLNSFTAGVPGFVLDTNASVS
 NGATFLESPTVRRGWDCVRACCTTQNCNLALVELQPDRGEDAIAACFLINCLYEQNFVCKFAPREGFINY
 LTREVYRSYRQLRTQGFGGSGIPKAWAGIDLKVQPQEPLVLKDVENTDWRLLRGDTDVRVERKDPNQVEL
 WGLKEGTYLFQLTVTSSDHPEDTANVTVTVLSTKQTEDYCLASNKVGRCRGSFPRWYDPTTEQICKSFVY
 GGCLGNKNNYLREEECILACRGVQGGPLRGSSGAQATFPQGPSMERRHPVCSGTCQPTQFRCSNGCCIDS
 FLECDTTPNCPDASDEAAACEKYTSGFDELQRIHFPSDKGHCVDLPDTGLCKESI PRWYYPFSEHCARFT
 YGGCYGNKNNFEEEQCLESCRGISKKDVFGLRREIPI PSTGSVEMAVTVFLVICIVVVVAILGYCFFKN
 QRKDFHGHHPPTPASSTVSTTEDTEHLVYNHTTRPL

- シグナル配列: アミノ酸 1-35
- 膜貫通ドメイン: アミノ酸 466-483
- N-グリコシル化部位: アミノ酸 66-70;235-239;523-527
- N-ミリスチル化: アミノ酸 29-35;43-49;161-167;
 212-218;281-287;282-288;
 285-291;310-316;313-319;
 422-428;423-429;426-432
- 細胞接着部位: アミノ酸 193-199
- 膵臓トリプシンインヒビター (クニッツ)ファミリーシグネチャー:
 アミノ酸 278-298;419-438

【図3】

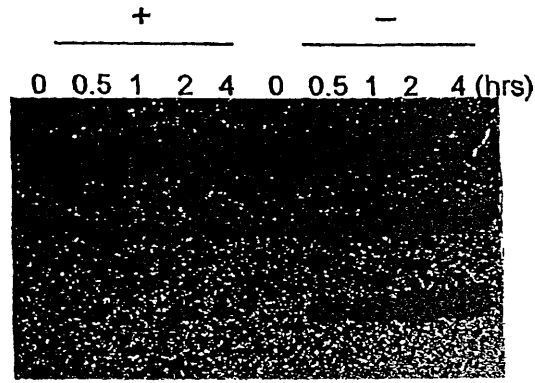


FIG. 3(a)

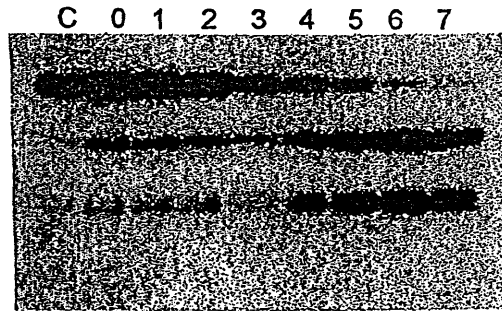


FIG. 3(b)

【図4】

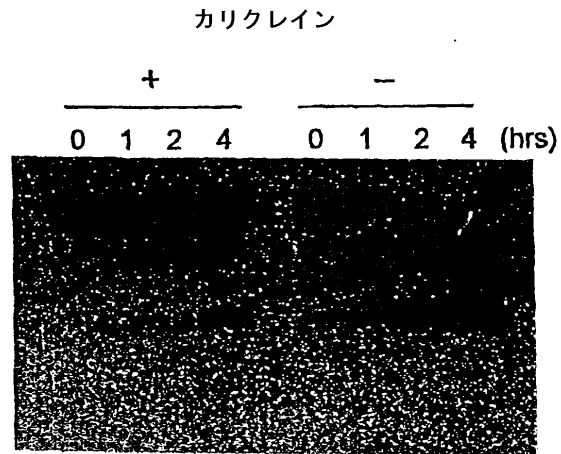


FIG. 4(a)

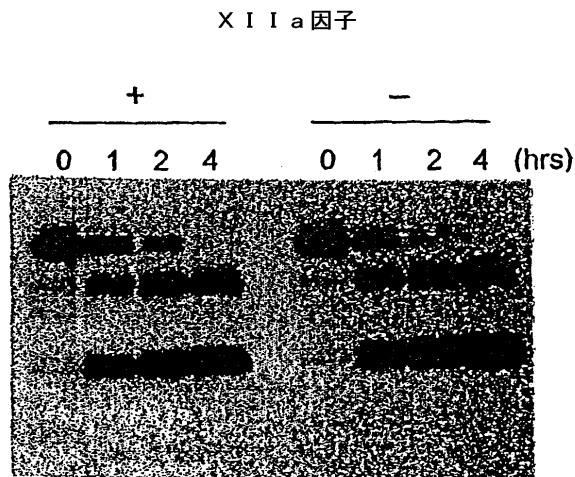


FIG. 4(b)

【図5】

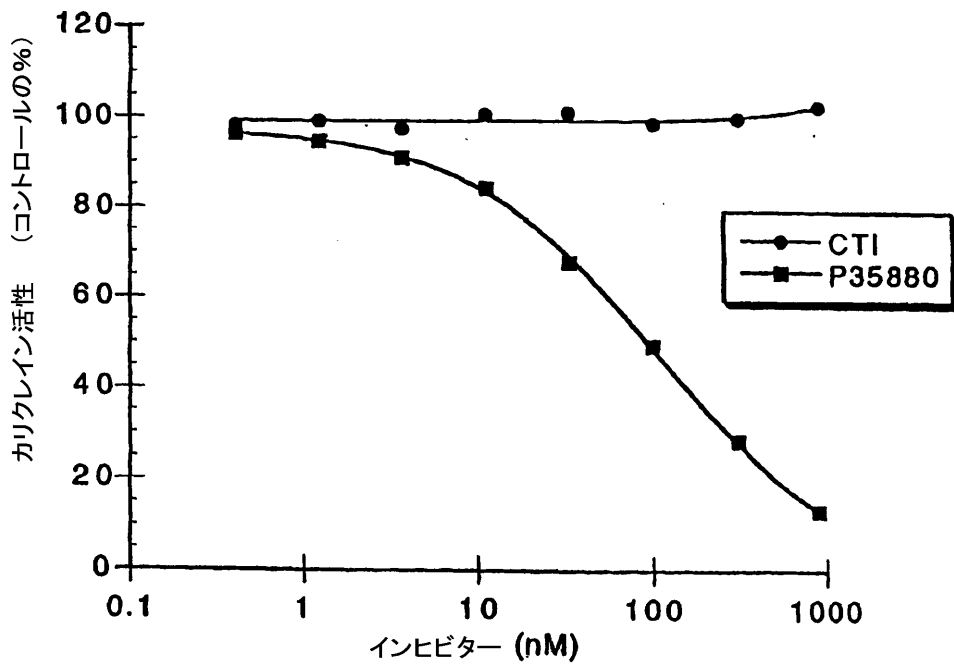


FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/34756

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHIMOMURA T ET AL: "HEPATOCTE GROWTH FACTOR ACTIVATOR INHIBITOR, A NOVEL KUNITZ-TYPE SERINE PROTEASE INHIBITOR*" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 272, no. 10, 7 March 1997 (1997-03-07), pages 6370-6376, XP002039700 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	1, 3-14, 18, 28, 29, 34, 36, 39-54
E, L	WO 01 05972 A (BAKER KEVIN P ; GENENTECH INC (US); ASHKENAZI AVI J (US); FONG SHER) 25 January 2001 (2001-01-25) * see particularly passages relating to PRO256 * L: priority.	1-14, 18, 28, 29, 39-54

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 1,2,9 and 20-38 relate to a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that it acts as an (ant)agonist for the PR0256 protein.

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to antibodies specific for PR0256 and anti-sense molecules, complementary to the nucleic acid encoding PR0256.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 00/34756

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0759467 A	26-02-1997	JP 9095497 A	08-04-1997
		US 6225081 B	01-05-2001
WO 9712629 A	10-04-1997	AU 7254896 A	28-04-1997
		US 6133231 A	17-10-2000
WO 0105972 A	25-01-2001	AU 1748200 A	19-06-2000
		AU 1749800 A	04-10-2000
		AU 1749900 A	12-07-2000
		AU 2390700 A	05-02-2001
		AU 2399300 A	28-09-2000
		AU 2600800 A	28-09-2000
		AU 2883700 A	09-01-2001
		AU 3107000 A	19-06-2000
		AU 3381600 A	28-09-2000
		AU 3514400 A	28-09-2000
		AU 3774300 A	18-12-2000
		AU 4011300 A	05-02-2001
		AU 5441200 A	18-12-2000
		AU 5460100 A	18-12-2000
		AU 5591100 A	18-12-2000
		WO 0053753 A	14-09-2000
		WO 0153486 A	26-07-2001
		WO 0078961 A	28-12-2000
		WO 0053757 A	14-09-2000
		WO 0053758 A	14-09-2000
		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 0032221 A	08-06-2000		
WO 0032778 A	08-06-2000		
WO 0055319 A	21-09-2000		
WO 0037638 A	29-06-2000		
WO 0105836 A	25-01-2001		
WO 0053751 A	14-09-2000		

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
A 6 1 K 45/06		A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 4
48/00		9/04	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/00		9/10	4 C 0 8 7
9/04		9/14	4 H 0 4 5
9/10		13/12	
9/14		17/02	
13/12		25/00	
17/02		27/02	
25/00		29/00	1 0 1
27/02		35/00	
29/00	1 0 1	35/04	
35/00		41/00	
35/04		43/00	1 0 1
41/00			1 0 5
43/00	1 0 1		1 0 7
	1 0 5		1 1 1
	1 0 7		1 2 1
	1 1 1	C 0 7 K 14/47	
	1 2 1	16/18	
C 0 7 K 14/47		19/00	
16/18		C 1 2 N 1/19	
19/00		1/21	
C 1 2 N 1/19		7/00	
1/21		C 1 2 P 21/02	C
5/10		C 1 2 Q 1/02	
7/00		1/68	A
C 1 2 P 21/02		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02		33/50	Z
1/68		33/53	D
G 0 1 N 33/15		C 1 2 P 21/08	
33/50		C 1 2 N 15/00	A
33/53		5/00	B
// C 1 2 P 21/08		A 6 1 K 37/02	

(31)優先権主張番号 6 0 / 2 5 3 , 6 6 5

(32)優先日 平成12年11月28日(2000 . 11 . 28)

(33)優先権主張国 米国 (U S)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, 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 ウッド, ウィリアム アイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010,
ヒルスバラ, サウスダウン コート 35

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03
4B024 AA01 AA11 BA41 BA80 CA04
DA02 DA06 DA12 EA02 EA04
FA02 GA03 GA11 HA12
4B063 QA01 QA05 QA13 QA18 QA19
QQ08 QQ20 QR32 QR55 QR62
QS34
4B064 AG01 AG27 CA02 CA06 CA10
CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA26X AA72X AA90X AA91X
AA91Y AA93Y AA97X AB01
AB05 AC14 BA02 BA08 CA24
CA25 CA44 CA46
4C084 AA07 AA13 AA17 AA19 BA01
BA08 BA22 BA23 CA18 DC50
MA02 NA14 ZA011 ZA361
ZA401 ZA441 ZA451 ZA811
ZA891 ZA971 ZB151 ZB211
ZB212 ZB221 ZB261 ZC201
ZC351 ZC412 ZC751
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01
MA02 MA04 NA14 ZA01 ZA36
ZA40 ZA44 ZA45 ZA81 ZA89
ZA97 ZB15 ZB21 ZB22 ZB26
ZC20 ZC35 ZC41 ZC75
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA02
NA14 ZA01 ZA36 ZA40 ZA44
ZA45 ZA81 ZA89 ZA97 ZB15
ZB21 ZB22 ZB26 ZC20 ZC35
ZC41 ZC75
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
BA41 CA40 DA76 EA23 FA72
FA73 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003527844A5	公开(公告)日	2011-03-31
申请号	JP2001558238	申请日	2000-12-19
[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		
当前申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ガーニーオースティンエル キルヒホファーダニエルケイ ウッドウィリアムアイ		
发明人	ガーニー,オースティン,エル. キルヒホファー,ダニエル,ケイ. ウッド,ウィリアム アイ.		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/7088 A61K35/76 A61K45/00 A61K45/06 A61K48/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/14 A61P13/12 A61P17/02 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P41/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12N5/10 A61K38/00 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/14 A61P13/12 A61P17/02 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P41/00 A61P43/00 C07K14/4705 G01N33/5008 G01N33/5011 G01N33/6893 G01N2800/164 G01N2800/32 G01N2800/325		
FI分类号	C12N15/00.A A61K31/7088 A61K35/76 A61K45/00 A61K45/06 A61K48/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/14 A61P13/12 A61P17/02 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P35/04 A61P41/00 A61P43/00.101 A61P43/00.105 A61P43/00.107 A61P43/00.111 A61P43/00.121 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.B A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ20 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AA97X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/DC50 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA361 4C084/ZA401 4C084/ZA441 4C084/ZA451 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZA971 4C084/ZB151 4C084/ZB211 4C084/ZB212 4C084/ZB221 4C084/ZB261 4C084/ZC201 4C084/ZC351 4C084/ZC412 4C084/ZC751 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA36 4C086/ZA40 4C086/ZA44 4C086/ZA45 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA97 4C086/ZB15 4C086/ZB21 4C086/ZB22 4C086/ZB26 4C086/ZC20 4C086/ZC35 4C086/ZC41 4C086/ZC75 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA02 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZA36 4C087/ZA40 4C087/ZA44 4C087/ZA45 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA97 4C087/ZB15 4C087/ZB21 4C087/ZB22 4C087/ZB26 4C087/ZC20 4C087/ZC35 4C087/ZC41 4C087/ZC75 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA23 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74		
优先权	PCT/US2000/003565 2000-02-11 WO PCT/US2000/006884 2000-03-15 WO		

其他公开文献

JP2003527844A

摘要(译)

公开了用于刺激或抑制包括人在内的哺乳动物的血管生成和/或心血管形成的组合物和方法。药物组合物基于为一种或多种用途而鉴定的多肽，或另外基于拮抗剂。可以通过本申请的组合物诊断，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。另外，本发明涉及新型多肽，以及编码这些多肽的核酸分子。本文还提供了包含这些核酸序列的宿主和载体，包含与异源多肽序列融合并与本发明多肽结合的本发明多肽的嵌合多肽分子。以及生产本发明多肽的方法。