(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) **公表特許公報**（Ａ）　(11)特許出願公表番号

特表2003－531811

(P2003－531811A)

(43)公表日 平成15年10月28日(2003.10.28)

| (51)Int.Cl[7] | 識別記号 | ＦＩ | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| Ａ６１Ｋ 38/00 | | Ａ６１Ｋ 31/7088 | | ２Ｇ０４５ |
| 31/7088 | | 39/395 | Ｄ | ４Ｂ０２４ |
| 39/395 | | | Ｎ | ４Ｂ０６３ |
| | | 45/00 | | ４Ｂ０６４ |
| 45/00 | | 48/00 | | ４Ｂ０６５ |

審査請求　未請求　予備審査請求（全254数）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000－603378(P2000－603378)

(86)(22)出願日　平成12年2月24日(2000.2.24)
(85)翻訳文提出日　平成13年9月10日(2001.9.10)
(86)国際出願番号　PCT/US00/05004
(87)国際公開番号　WO00/053757
(87)国際公開日　平成12年9月14日(2000.9.14)
(31)優先権主張番号　US9905028
(32)優先日　平成11年3月8日(1999.3.8)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/123,957
(32)優先日　平成11年3月12日(1999.3.12)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　ジェネンテック・インコーポレーテッド
ＧＥＮＥＮＴＥＣＨ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国カリフオルニア・94080－4990・サウス・サン・フランシスコ・ディー エヌエー・ウェイ・1

(72)発明者　アシュケナジ，アヴィ，ジェイ．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94402，サン　マテオ，テリータウン　ストリート　1456

(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】　血管形成及び心臓血管新生の促進又は阻害

(57)【要約】
ヒトを含む哺乳動物における血管新生及び／又は心臓血管形成を刺激又は阻害するための組成物及び方法が開示される。製薬組成物は、これらの用途の一又は複数について同定されたポリペプチド又はそれに対するアンタゴニストに基づく。ここでの組成物により診断、予防又は治療される疾患は、創傷等の外傷、種々の癌、及びアテローム性硬化症及び心臓肥大を含む血管疾患を含む。さらに、本発明は新規なポリペプチド及びこれらのポリペプチドをコードする核酸分子に係る。またここで、これらの核酸配列を含むベクター及び宿主細胞、異種ポリペプチドに融合した本発明のポリペプチドを含むキメラポリペプチド分子、本発明のポリペプチドに結合する抗体、及び本発明のポリペプチドの製造方法も提供される。

MFTIKLLLFIVPLVISSRIDQDNSSFDSLSPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKL
NIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLLEEKILLQQKVKYLEEQLTNLIQ
NQPETPEHPEVTSLKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRT
TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWE
NYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPE
NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKML
IHPTDSESFE

| | | |
|---|---|---|
| シグナルペプチド | アミノ酸 | 1-16 |
| ロイシンジッパーパターン | アミノ酸 | 120-142;127-149 |
| N-グリコシル化部位 | アミノ酸 | 23-27;115-119;296-300; 357-361 |
| フィブリノーゲンβ及びγ鎖C-末端ドメイン | アミノ酸 | 271-310;312-322;331-369; 393-424 |

【特許請求の範囲】

【請求項１】　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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、製薬的に許容される担体と混合して含んでなる組成物。

【請求項２】　前記ポリペプチド、又は前記そのアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量を含む請求項１に記載の組成物。

【請求項３】　アゴニストが、抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７抗体である請求項１に記載の組成物。

【請求項４】　アンタゴニストが、抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７抗体である請求項１に記載の組成物。

【請求項５】　心臓血管、内皮、血管形成又はアンジオスタチック剤をさらに含む請求項１に記載の組成物。

【請求項６】　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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、製薬的に許容される担体と混合することを含んでなる請求項１に記載の組成物の製造方法。

【請求項７】　（１）（ａ）ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、Ｐ

ＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチド、（ｂ）ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドのアゴニスト、又は（ｃ）ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドのアンタゴニストを製薬的に許容される担体と混合して含む組成物；

（２）前記組成物を含む容器；及び

（３）前記組成物の心臓血管、内皮、及び血管形成疾患の治療における使用を表示する、前記容器に貼付されたラベル、又は前記容器に収納された包装挿入物、を含んでなる製造品。

【請求項８】　前記アゴニストが、抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７抗体である請求項７に記載の製造品。

【請求項９】　前記アンタゴニストが、抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７抗体である請求項７に記載の製造品。

【請求項１０】　前記組成物が、前記製薬的に許容される担体と混合された、前記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治療的有効量を含んでなる請求項７に記載の製造品。

【請求項１１】　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２

、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドのアゴニストを同定する方法において：

（ａ）細胞及びスクリーニングすべき試験化合物を、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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の細胞及び試験化合物を接触させ；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方法。

【請求項１２】　前記ポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応が、細胞増殖の刺激である請求項１１に記載の方法。

【請求項１３】　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドの活性を阻害する化合物の同定方法において、試験化合物を前記ポリペプチドと、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、前記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んでなる方法。

【請求項１４】　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドの活性を阻害する化合物の同定方法において：

（ａ）細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、前記ポリペプチドの存在下で、前記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んでなる方法。

【請求項１５】　前記ポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応が、細胞増殖の刺激である請求項１４に記載の方法。

【請求項１６】　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドの、通常当該ポリペプチドを発現する細胞における発現を阻害する化合物の同定方法において、当該方法が、当該細胞と試験化合物とを、前記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、前記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んでなる方法。

【請求項１７】　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドのアゴニスト。

【請求項１８】　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドのアンタゴニスト。

【請求項１９】　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドの、前記ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞における発現を阻害する化合物。

【請求項２０】　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１９に記載の化合物。

【請求項２１】　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２

、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドに結合する単離された抗体。

【請求項２２】　モノクローナル抗体である請求項２１に記載の抗体。

【請求項２３】　抗体断片である請求項２１に記載の抗体。

【請求項２４】　一本鎖抗体である請求項２１に記載の抗体。

【請求項２５】　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチド-コード化核酸配列の突然変異に関連する疾患又は疾患に対する感受性を診断する方法において、前記ポリペプチド-コード化核酸配列における前記突然変異の有無を測定することを含んでなり、前記突然変異の有無が前記疾患又は前記疾患に対する感受性の存在を示す方法。

【請求項２６】　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において、（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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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方法。

【請求項２７】　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において、前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料におけるＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチド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方法。

【請求項２８】　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において、（ａ）前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料を抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７抗体と接触させ、そして（ｂ）試験試料中での前記抗体とＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドとの複合体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方法。

【請求項２９】　試料中のＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドの存在を測定する方法において、前記ポリペプチドを含有すると推測される試料を抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７抗体と接触させ、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方法。

【請求項３０】　抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７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。

【請求項３１】　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

する方法において、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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治療的有効量を当該哺乳動物に投与することを含んでなる方法。

【請求項３２】　哺乳動物がヒトである請求項３１に記載の方法。

【請求項３３】　ヒトが心筋梗塞に罹患している請求項３２に記載の方法。

【請求項３４】　ヒトが心臓肥大、外傷、癌、又は加齢性黄斑変性を有する請求項３２に記載の方法。

【請求項３５】　心臓肥大が$PGF_{2\alpha}$のレベル上昇の存在によって特徴づけられる請求項３４に記載の方法。

【請求項３６】　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドが心臓血管、内皮又は血管形成剤とともに投与される請求項３１に記載の方法。

【請求項３７】　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドが一次血管形成術に続いて投与される請求項３４に記載の方法。

【請求項３８】　心臓血管、内皮又は血管形成疾患が癌である請求項３１に記載の方法。

【請求項３９】　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドが、化学治療剤、成長阻害剤又は細胞毒性剤と組み合わせて投与される請求項３８に記載の方法。

【請求項４０】　前記アゴニストが抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗

-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７抗体である請求項３１に記載の方法。

【請求項４１】　前記アンタゴニストが抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７抗体である請求項３１に記載の方法。

【請求項４２】　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において、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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コードする核酸分子を当該哺乳動物に投与することを含んでなる方法。

【請求項４３】　前記アゴニストが抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７抗体である請求項４２に記載の方法。

【請求項４４】　前記アンタゴニストが抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７抗体である請求項４２に記載の方法。

【請求項４５】　哺乳動物がヒトである請求項４２に記載の方法。

【請求項４６】　核酸分子がエキソビボ遺伝子治療を介して投与される請求項４２に記載の方法。

【請求項４７】　（１）プロモータ、（２）ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、

ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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コードする核酸、及び（３）当該ポリペプチドの細胞性分泌のためのシグナル配列から実質的になるレトロウイルスベクターを含み、当該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を伴う組換えレトロウイルス粒子。

【請求項４８】　レトロウイルス構造タンパク質を発現し、（１）プロモータ、（２）ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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コードする核酸、及び（３）当該ポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列から実質的になるレトロウイルスベクター核酸構造を含むエキソビボ産生細胞であって、前記産生細胞が構造タンパク質を伴うレトロウイルスベクターを包含して組換えレトロウイルス粒子を産生する産生細胞。

【請求項４９】　哺乳動物における内皮細胞成長を阻害する方法において、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２又はＰＲＯ８８５ポリペプチド又はそのアゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における内皮細胞成長が阻害される方法。

【請求項５０】　哺乳動物における内皮細胞成長を刺激する方法において、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ８７８又はＰＲＯ８７９ポリペプチド又はそのアゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における内皮細胞成長が刺激される方法。

【請求項５１】　哺乳動物における内皮細胞成長を阻害する方法において、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ８７８又はＰＲＯ８７９ポリペプチドのアンタゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における内皮細胞成長が阻害される方法。

【請求項５２】　哺乳動物における内皮細胞成長を刺激する方法において、

ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２又はＰＲＯ８８５ポリペプチドのアンタゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における内皮細胞成長が刺激される方法。

【請求項５３】　哺乳動物における心臓肥大を誘発する方法において、当該哺乳動物にＰＲＯ２０５、ＰＲＯ８８２又はＰＲＯ８８７ポリペプチド又はそのアゴニストを投与することを含んでなり、前記哺乳動物における心臓肥大が誘発される方法。

【請求項５４】　哺乳動物における心臓肥大を抑制する方法において、当該哺乳動物にＰＲＯ２３８、ＰＲＯ８７８又はＰＲＯ１７６０ポリペプチド又はそのアゴニストを投与することを含んでなり、前記哺乳動物における心臓肥大が抑制される方法。

【請求項５５】　哺乳動物において心臓肥大を誘発する方法において、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ８７８又はＰＲＯ１７６０ポリペプチド又はそのアゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における前記心臓肥大が抑制される方法。

【請求項５６】　哺乳動物において心臓肥大を抑制する方法において、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ８８２又はＰＲＯ８８７ポリペプチドのアンタゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における心臓肥大が抑制される方法。

【請求項５７】　哺乳動物においてＰＲＯ１７９、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ８７８又はＰＲＯ８７９ポリペプチドによって誘発される血管形成を阻害する方法において、抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ８７８又は抗-ＰＲＯ８７９ポリペプチド抗体を当該哺乳動物に投与することを含み、前記血管形成が阻害される方法。

【請求項５８】　哺乳動物においてＰＲＯ１７９、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ８７８又はＰＲＯ８７９ポリペプチドによって誘発される血管形成を刺激する方法において、前記ポリペプチドの治療的有効量を当該哺乳動物に投与することを含み、それにより前記血管形成が刺

激される方法。

【請求項５９】　Ｆｉｇ２（配列番号：２）、Ｆｉｇ４（配列番号：４）、Ｆｉｇ６（配列番号：６）、Ｆｉｇ８（配列番号：８）、Ｆｉｇ１０（配列番号：１０）、Ｆｉｇ１２（配列番号：１２）、Ｆｉｇ１４（配列番号：１４）、Ｆｉｇ１６（配列番号：１６）、Ｆｉｇ１８（配列番号：１８）、Ｆｉｇ２０（配列番号：２０）、Ｆｉｇ２２（配列番号：２２）、Ｆｉｇ２４（配列番号：２４）、Ｆｉｇ２６（配列番号：２６）、Ｆｉｇ２８（配列番号：２８）、Ｆｉｇ３０（配列番号：３０）、及びＦｉｇ３２（配列番号：３２）に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と少なくとも８０％の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項６０】　Ｆｉｇ１（配列番号：１）、Ｆｉｇ３（配列番号：３）、Ｆｉｇ５（配列番号：５）、Ｆｉｇ７（配列番号：７）、Ｆｉｇ９（配列番号：９）、Ｆｉｇ１１（配列番号：１１）、Ｆｉｇ１３（配列番号：１３）、Ｆｉｇ１５（配列番号：１５）、Ｆｉｇ１７（配列番号：１７）、Ｆｉｇ１９（配列番号：１９）、Ｆｉｇ２１（配列番号：２１）、Ｆｉｇ２３（配列番号：２３）、Ｆｉｇ２５（配列番号：２５）、Ｆｉｇ２７（配列番号：２７）、Ｆｉｇ２９（配列番号：２９）、及びＦｉｇ３１（配列番号：３１）に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項６１】　Ｆｉｇ１（配列番号：１）、Ｆｉｇ３（配列番号：３）、Ｆｉｇ５（配列番号：５）、Ｆｉｇ７（配列番号：７）、Ｆｉｇ９（配列番号：９）、Ｆｉｇ１１（配列番号：１１）、Ｆｉｇ１３（配列番号：１３）、Ｆｉｇ１５（配列番号：１５）、Ｆｉｇ１７（配列番号：１７）、Ｆｉｇ１９（配列番号：１９）、Ｆｉｇ２１（配列番号：２１）、Ｆｉｇ２３（配列番号：２３）、Ｆｉｇ２５（配列番号：２５）、Ｆｉｇ２７（配列番号：２７）、Ｆｉｇ２９（配列番号：２９）、及びＦｉｇ３１（配列番号：３１）に示すヌクレオチド配列の全長コード化配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項６２】　ＡＴＣＣ登録番号２０９７７６、２０９３７０、２０９４

３６、２０９９７６、２０９８４７、２０３４７３、２０９７１９、又は２０９８５８の下で寄託されたＤＮＡの全長コード化配列と少なくとも８０％の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項６３】　請求項５９から６２のいずれか一項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項６４】　当該ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識されるコントロール配列に作用可能に結合した請求項６３に記載のベクター。

【請求項６５】　請求項６３に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項６６】　前記細胞がＣＨＯ細胞である請求項６５に記載の宿主細胞。

【請求項６７】　前記細胞が大腸菌である請求項６５に記載の宿主細胞。

【請求項６８】　前記細胞が酵母菌細胞である請求項６５に記載の宿主細胞。

【請求項６９】　前記細胞がバキュウロウイルス感染昆虫細胞である請求項６５に記載の宿主細胞。

【請求項７０】　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドの製造方法において、請求項６５に記載の宿主細胞を前記ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、そして前記ポリペプチドを培養培地から回収することを含んでなる方法。

【請求項７１】　Ｆｉｇ２（配列番号：２）、Ｆｉｇ４（配列番号：４）、Ｆｉｇ６（配列番号：６）、Ｆｉｇ８（配列番号：８）、Ｆｉｇ１０（配列番号：１０）、Ｆｉｇ１２（配列番号：１２）、Ｆｉｇ１４（配列番号：１４）、Ｆｉｇ１６（配列番号：１６）、Ｆｉｇ１８（配列番号：１８）、Ｆｉｇ２０（配列番号：２０）、Ｆｉｇ２２（配列番号：２２）、Ｆｉｇ２４（配列番号：２４）、Ｆｉｇ２６（配列番号：２６）、Ｆｉｇ２８（配列番号：２８）、Ｆｉｇ３０（配列番号：３０）、及びＦｉｇ３２（配列番号：３２）に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも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７２】　Ｆｉｇ２（配列番号：２）、Ｆｉｇ４（配列番号：４）、Ｆｉｇ６（配列番号：６）、Ｆｉｇ８（配列番号：８）、Ｆｉｇ１０（配列番号：１０）、Ｆｉｇ１２（配列番号：１２）、Ｆｉｇ１４（配列番号：１４）、Ｆｉｇ１６（配列番号：１６）、Ｆｉｇ１８（配列番号：１８）、Ｆｉｇ２０（配列番号：２０）、Ｆｉｇ２２（配列番号：２２）、Ｆｉｇ２４（配列番号：２４）、Ｆｉｇ２６（配列番号：２６）、Ｆｉｇ２８（配列番号：２８）、Ｆｉｇ３０（配列番号：３０）、及びＦｉｇ３２（配列番号：３２）に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較したとき少なくとも８０％ポジティブのスコアとされる単離されたポリペプチド。

【請求項７３】　ＡＴＣＣ登録番号２０９７７６、２０９３７０、２０９４３６、２０９９７６、２０９８４７、２０３４７３、２０９７１９、又は２０９８５８の下で寄託されたＤＮＡの全長コード化配列にコードされるアミノ酸配列と少なくとも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７４】　異種アミノ酸配列に融合した請求項７１から７３のいずれか一項に記載のポリペプチドを含むキメラ分子。

【請求項７５】　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７４に記載のキメラ分子。

【請求項７６】　前記異種アミノ酸配列が免疫グロブリンのＦｃ領域である請求項７４に記載のキメラ分子。

【請求項７７】　請求項７１から７３のいずれか一項に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項７８】　前記抗体がモノクローナル抗体、ヒト化抗体又は一本鎖抗体である請求項７７に記載の抗体。

【請求項７９】　（ａ）Ｆｉｇ２（配列番号：２）、Ｆｉｇ４（配列番号：４）、Ｆｉｇ６（配列番号：６）、Ｆｉｇ８（配列番号：８）、Ｆｉｇ１０（配列番号：１０）、Ｆｉｇ１２（配列番号：１２）、Ｆｉｇ１４（配列番号：１４）、Ｆｉｇ１６（配列番号：１６）、Ｆｉｇ１８（配列番号：１８）、Ｆｉｇ２０（配列番号：２０）、Ｆｉｇ２２（配列番号：２２）、Ｆｉｇ２４（配列番号

：２４）、Ｆｉｇ２６（配列番号：２６）、Ｆｉｇ２８（配列番号：２８）、Ｆｉｇ３０（配列番号：３０）、及びＦｉｇ３２（配列番号：３２）に示すポリペプチドであって、それに関連するシグナル配列を欠くものをコードするヌクレオチド配列；

（ｂ）Ｆｉｇ２（配列番号：２）、Ｆｉｇ４（配列番号：４）、Ｆｉｇ６（配列番号：６）、Ｆｉｇ８（配列番号：８）、Ｆｉｇ１０（配列番号：１０）、Ｆｉｇ１２（配列番号：１２）、Ｆｉｇ１４（配列番号：１４）、Ｆｉｇ１６（配列番号：１６）、Ｆｉｇ１８（配列番号：１８）、Ｆｉｇ２０（配列番号：２０）、Ｆｉｇ２２（配列番号：２２）、Ｆｉｇ２４（配列番号：２４）、Ｆｉｇ２６（配列番号：２６）、Ｆｉｇ２８（配列番号：２８）、Ｆｉｇ３０（配列番号：３０）、及びＦｉｇ３２（配列番号：３２）に示すポリペプチドの細胞外ドメインであって、それに関連するシグナルペプチドを有するものをコードするヌクレオチド配列；又は

（ｃ）Ｆｉｇ２（配列番号：２）、Ｆｉｇ４（配列番号：４）、Ｆｉｇ６（配列番号：６）、Ｆｉｇ８（配列番号：８）、Ｆｉｇ１０（配列番号：１０）、Ｆｉｇ１２（配列番号：１２）、Ｆｉｇ１４（配列番号：１４）、Ｆｉｇ１６（配列番号：１６）、Ｆｉｇ１８（配列番号：１８）、Ｆｉｇ２０（配列番号：２０）、Ｆｉｇ２２（配列番号：２２）、Ｆｉｇ２４（配列番号：２４）、Ｆｉｇ２６（配列番号：２６）、Ｆｉｇ２８（配列番号：２８）、Ｆｉｇ３０（配列番号：３０）、及びＦｉｇ３２（配列番号：３２）に示すポリペプチドの細胞外ドメインであって、それに関連するシグナルペプチドを欠くものをコードするヌクレオチド配列と、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８０】　（ａ）Ｆｉｇ２（配列番号：２）、Ｆｉｇ４（配列番号：４）、Ｆｉｇ６（配列番号：６）、Ｆｉｇ８（配列番号：８）、Ｆｉｇ１０（配列番号：１０）、Ｆｉｇ１２（配列番号：１２）、Ｆｉｇ１４（配列番号：１４）、Ｆｉｇ１６（配列番号：１６）、Ｆｉｇ１８（配列番号：１８）、Ｆｉｇ２０（配列番号：２０）、Ｆｉｇ２２（配列番号：２２）、Ｆｉｇ２４（配列番号：２４）、Ｆｉｇ２６（配列番号：２６）、Ｆｉｇ２８（配列番号：２８）、Ｆｉｇ３０（配列番号：３０）、及びＦｉｇ３２（配列番号：３２）に示すポリペ

プチドであって、それに関連するシグナル配列を欠くもの；

（ｂ）Ｆｉｇ２（配列番号：２）、Ｆｉｇ４（配列番号：４）、Ｆｉｇ６（配列番号：６）、Ｆｉｇ８（配列番号：８）、Ｆｉｇ１０（配列番号：１０）、Ｆｉｇ１２（配列番号：１２）、Ｆｉｇ１４（配列番号：１４）、Ｆｉｇ１６（配列番号：１６）、Ｆｉｇ１８（配列番号：１８）、Ｆｉｇ２０（配列番号：２０）、Ｆｉｇ２２（配列番号：２２）、Ｆｉｇ２４（配列番号：２４）、Ｆｉｇ２６（配列番号：２６）、Ｆｉｇ２８（配列番号：２８）、Ｆｉｇ３０（配列番号：３０）、及びＦｉｇ３２（配列番号：３２）に示すポリペプチドの細胞外ドメインであって、それに関連するシグナルペプチドを有するもの；又は

（ｃ）Ｆｉｇ２（配列番号：２）、Ｆｉｇ４（配列番号：４）、Ｆｉｇ６（配列番号：６）、Ｆｉｇ８（配列番号：８）、Ｆｉｇ１０（配列番号：１０）、Ｆｉｇ１２（配列番号：１２）、Ｆｉｇ１４（配列番号：１４）、Ｆｉｇ１６（配列番号：１６）、Ｆｉｇ１８（配列番号：１８）、Ｆｉｇ２０（配列番号：２０）、Ｆｉｇ２２（配列番号：２２）、Ｆｉｇ２４（配列番号：２４）、Ｆｉｇ２６（配列番号：２６）、Ｆｉｇ２８（配列番号：２８）、Ｆｉｇ３０（配列番号：３０）、及びＦｉｇ３２（配列番号：３２）に示すポリペプチドの細胞外ドメインであって、それに関連するシグナルペプチドを欠くものと、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／又は心臓血管新生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】

（背景の記述）

Ａ．心疾患及び要因

約500万人のアメリカ人が心不全にかかり、毎年約400,000人が心不全の新しい患者となる。アメリカ合衆国における65歳以上の人々の入院の単独で最多の原因である。急性心筋梗塞を含む急性心不全の管理の最近の進歩の結果、慢性の心不全が発症した患者数が拡大している。1979年から1995年まで、鬱血性心不全(CHF)の患者は377,000人から872,000人(130パーセント増)に昇り、CHFによる死亡は116パーセント増えた。

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)。

末梢血管収縮、心拍数の増加、心収縮性の増加、血漿容量の増加を含む、少なくとも４種の主要な補償メカニズムが心不全の場合に活性化される。これらの効果は、交感神経系とレニン-アンジ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)参照。交感神経系からの出力が増えると脈拍、心拍数、、及び収縮性が上昇する。アンジオテンシ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 and Vaughan, Circulation, 97: 1411

-1420(1998)による検討を参照。以下に記載するように、アンジオテンシンIIはまた、ミオサイト壊死(心臓収縮機能の悪化)及び心臓線維症(心臓拡張及び場合によっては収縮機能の悪化)を促進することで直接的に有害な影響を有する。Weber, Circulation, 96: 4065-4082(1998)参照。

【０００３】

鬱血性心不全(CHF)の共通した特徴は心臓肥大であり、心臓の拡大は力学的及びホルモン的刺激の両方により活性化され、心臓が心拍出量の増加の要求に適合できるようにする。Morgan and Baker, Circulation, 83: 13-25 (1991)。この肥大反応は、多くの場合、高血圧、大動脈弁狭窄症、心筋梗塞、心筋症、弁膜逆流、及び心内短絡のような様々な特徴的な病状に関わり、その全てが慢性的な血行動態過負荷となる。

肥大は通常、腫瘍形成を含まない自然的な成長に関しない器官又は構造の大きさの増大として定義される。心臓の肥大は、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)のどちらか又は両方により起こる。胎児心臓の拡大は主にミオサイト数の増加(出生直後まで続く)に依存するが、出生後の心臓ミオサイトは増殖能力を失う。更なる発達は個々の細胞の肥大を通して起こる。

成人のミオサイトの拡大は最初に個々の筋繊維の負担を少なくすること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。しかしながら、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", in: Katz A.M. ed., Physiology of the Heart(New York: Raven Press, 1992)pp. 638-668。心臓肥大は、心不全の臨床経過での死亡率及び罹患率にとって重大な危険因子である。Katz, Trends Cardiovasc. Med.,5: 37-44 (1995)。心臓肥大の原因及び症状の更なる詳細については、例えばHeart Disease, A Textbook of Cardiovascular Medicine, Braunwald, E. ed. (W.B. Saunders Co., 1988),Chapter 14, "Pathophysiology of Heart Failure"。

細胞レベルでは、心臓はミオサイト及び包括的に非ミオサイトと呼ばれる周囲の支持細胞で構成される。非ミオサイトは最初線維芽細胞／間葉細胞であり、ま

たそれらは内皮及び平滑筋細胞を含む。実際、ミオサイトは成人心筋質量の大部分を形成しているが、心臓に存在する全細胞数の約３０％にしか相当しない。ホルモン的、生理的、血行力学的、及び病理学的な刺激に対する反応では、成人心室筋細胞は、肥大化プロセスの活性化を通して負担が増えるのに適合することができる。この反応は、細胞の分裂及び心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)の遺伝子を含む胎児遺伝子の活性化の付随なしに起こる、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: 77-95(1993)。細胞外マトリックス内及び心筋内冠動脈の周りにある間質性コラーゲンの蓄積と関連したミオサイトの大きさの増大の結果として起こる心筋質量の増加は、ヒトにおいて圧負荷に引き続いて起こる左心室肥大において記述されている。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)。

【０００４】

また非ミオサイト支持細胞によって産生されたパラ分泌因子はさらに心臓肥大の発達関わり得ることが示唆され、さらに様々な非ミオサイト由来肥大因子、例えば白血球抑制因子(LIF)及びエンドセリン等が同定されている。Metcalf, Growth Factors, 7: 169-173(1992); Kurzrock等, Endocrinne Reviews, 12: 208-217(1991); Inoue等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2863-2867(1989); Yanagisawa and Masaki, Treds Pharm. Sci., 10: 374-378(1989); 米国特許第5573762(1996年11月12日公開)。心臓肥大の潜在的な介在物質とされる更なる例示的な因子は、カルジオトロフィン-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、アンジオテンシン、及びプロスタグランジン類を含む。

カテコールアミン類、副腎皮質ステロイド類、アンジオテンシン、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(big)エンドセリンを含む)及びCT-1は、肥大の潜在的な介在物質とされる因子にはいる。例えば、β-アドレナリン受容体遮断薬(β-遮断薬、例えばプロプラノロール

、チモロール、タートアルオロール(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、アテノロール、メトプロロール、カルベジロール、等)及びベラパミルは、肥大型心筋症の治療に広く用いられてる。症状(例えば胸痛)及び運動負荷でのβ-遮断薬の有益な効果は、主に心拍数を減らすことに依存し、その結果弛緩期を延長し、受動的に心室充満を増大する。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向上させ、恐らく心筋虚血を減少させるということが記載されている。Bonow 等, Circulation, 72: 853-64(1985)。

またニフェジピン及びジルチアゼムは時に肥大型心筋症の治療に利用される。Lorell等, Circulation, 65:499-507(1982); Betocchi等, Am. J.Cardiol.,78:451-457(1996)。しかしながら、強力な血管拡張特性のために、特に流出障害をもつ患者には、ニフェジピンは害になりうる。ジソピラミドはその負の筋収縮特性によって症状を和らげるのに使用される。Pollic, N. Engl. J. Med., 307: 997-999(1982)。しかしながら、多くの患者において、最初の効果は徐々に減ってくる。Wigle等,Circulation, 92: 1680-1692(1995)。抗高血圧薬治療は、血圧の上昇に関連する心臓肥大に有益な効果を有することが報告されている。抗高血圧治療に使用される、単独で又は組み合わせて使用される薬の例としては、カルシウムアンタゴニスト、例えばニトレンジピン；アドレナリン受容体阻害薬、例えば上に挙げたもの； 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、ホシノプリル、リシノプリルのようなアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬；利尿薬、例えばクロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメチアジド、メチルクロチアジド(methylchlothiazide)、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ネル阻害剤、例えばジルチアゼン、ニフェジピン、ベラパミル、及びニカルジピンがある。

例えば、ジルチアゼン及びカプトリルを用いた高血圧の治療は、左心室筋質量の減少を示すが、心臓拡張機能のドップラー指数は正常にならなかった。Szlachcic等, Am. J. Cardiol.,63: 198-201(1989); Shahi等, Lancet, 336: 458-461(

1990)。これらの発見は、過剰量となった間質性コラーゲンが左心室肥大の退化後に残りうることを表すと解釈される。Rossi等, Am. Heart J., 124: 700-709(1992)。上掲のRossi等は、実験用ラットにおいて、圧負担心臓肥大での間質性線維症及び心筋細胞肥大の抑制及び退化でのカプトプリルの影響を研究した。

【０００５】

心筋収縮能を直接増加する薬剤(変力剤)は、初め、心不全を持つ患者に、短期間において心拍出量を改善するために有用であると思われていた。しかしながら、ジゴキシゲニンを除いた全ての陽性変力剤は、短期的に心臓の性能を改善するにしても、長期的には死亡率を高める。Massie, Curr. Op. in Cardiology, 12: 209-217(1997); Reddy等, Curr. Opin. Cardiol., 12:233-241(1997)。最近、β-アドレナリン受容体阻害剤は心不全での利用が提唱されている。臨床試験から明らかになったことは、心臓機能の改善が死亡率を増加させずに達成されうることが示唆されるが、患者の生存率が向上することは未だ実証されていない。また、CHF治療のカルジオトロピン-１又はそのアンタゴニスト、又は成長ホルモン及び／又はインシュリン様成長因子-Ｉに関する米国特許第5935924号、5624806号；5661122号；及び5610134号及び国際特許出願95/28173号参照。他の治療様式は心臓移植であるが、これはドナー心臓の入手可能性により制限がある。

エンドセリンは２１アミノ酸を含んでなる血管収縮ペプチドであり、ブタ動脈内皮培養上清から単離され、構造的に決定される。Yanagisawa等, Nature, 332: 411-415 (1998)。エンドセリンは後に様々な作用が発見され、エンドセリンアンタゴニストのようなエンドセリン抗体は心筋梗塞、腎不全、及び他の病気の治療に有効であることが証明されている。そのようなエンドセリンは生体内に存在し、血管収縮活性が示され、それは循環系の調節に関する内生要因であることが予想され、さらに高血圧、心筋梗塞のような心疾患、急性腎不全のような腎臓病に関与しうる。エンドセリンアンタゴニストは、例えば米国特許第5773414号；日本特許公開3130299/1991号、欧州特許457195号、欧州特許460679号；及び欧州特許552489号に記載されている。エンドセリン受容体アンタゴニストを同定するための新規のエンドセリンＢ受容体は米国特許番号5773223号に記載されている。

心疾患の現在の治療は主に、カプトプリル、及び利尿薬のようなアンジオテンシン転換酵素(ACE)抑制剤の使用に向けられている。これらの薬剤は、血流力学的側面、及び運動負荷を改善し、CHFを持つ患者の死亡率及び発病率を減少させる。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、左心室機能障害、アテローム硬化性血管疾患、及び糖尿病性ネフロパシーに利用される。上掲のBrown及びVaughan。しかしながら、効果が証明されたにも関わらず、ACE抑制剤の反応は限度がある。例えば、心不全の状況で延命したとき、ACE抑制剤は末期心不全の進行が遅くなるように見え、ACE抑制剤での大多数の患者が機能的クラスIIIの心不全を有する。

さらに、機能的許容能力の改善及び運動時間はほんのわずかで、死亡率は減少しても高くなり続ける。The CONSESUS 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)。従って、ACE抑制剤は60%以上の心不全患者で一貫して症状を緩和し、ほんの約15-20%まで心不全の死亡率を減少することができることが明らかである。さらに副作用については、上掲のBroun及びVaughan参照。

【０００６】

ACE抑制剤の代替物は、特定のAT1受容体アンタゴニストによって表される。臨床研究では、心臓血管及び腎臓の疾患の治療において、これら２つの様態の効果の比較が計画されている。しかしながら、動物モデルのデータはACE/AngII経路が、心臓肥大に明確に関係しているが、唯一のものではないか、この役割での活性な主要経路ではないことを示唆する。マウス遺伝子「ノックアウト」モデルは経路の個々の成分を試験するために作成されている。あるそのようなモデルで、AngIIに対する主要な心臓病受容体II、ATsub1Aが遺伝学的に欠失された；これらのマウスは、AngIIが実験的に与えられたとき 、肥大が発達しなかった(AngIIの

二次的な肥大除去におけるモデルでの基本的な成功を確認)。しかしながら、大動脈がこれらの動物(高血圧心臓ストレスモデル)で収縮されたとき、心臓はなおも肥大性になる。このことは、このレセプター(ATsub1A)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。ACE抑制剤は恐らくこれらの経路を抑制することはできないであろう。Harada等, Circulation, 97: 1952-1959(1998)参照。また、心臓肥大の過程及び機構に関連する謎に関してはHomcy, Circulation, 97: 1890-1892(1998)参照。

毎年約750,000人の患者が急性心筋梗塞(AMI)に懸かり、アメリカ合衆国での全死亡のおよそ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、及び特に組織プラスミノゲン活性剤(t-PA)は、心筋梗塞に罹患した患者の生存率を大きく向上させた。１．５から４時間の連続静脈注射として投与したとき、t-PAは治療を施した患者の69%から90%が90分で冠血管解放を引き起こす。Topol等, Am. J. Cardiol., 61: 723-728(1998); Neuhaus等, J. Am. Coll. Cardiol.,12: 581-587(1988); Neuhaus等, J. Am. Coll. Cardiol., 14: 1566-1569(1989)。最も高い開放率は、高い投与量又は急速な投与療法において報告されている。Topol, J. Am. Coll. Cardiol., 15: 922-924(1990)。またt-PAは一回のボーラスとして投与され得るし、それに関連する短い半減期に依存しているが、注入療法に適している。Tebbe等, Am. J. Cardiol., 64: 448-453(1989)。t-PA変異体は、特に長い半減期及び高いフィブリン特異性を有するように作成されているが、TNKt-PA(aT103N, N117Q, KHRR(296-299)AAAA t-PA変異体、Keyt等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3670-3674(1994))は特にボーラス投与に適している。しかしながら、これら全ての発達にもかかわらず、患者の生存の長期予後は、心臓肥大の監視及び治療を含む患者の注入後の監視及び治療にかなり依存する。

【０００７】

Ｂ．成長因子

報告によると、様々な自然発生ポリペプチドが内皮細胞の増殖を誘導する。これらのポリペプチドは、塩基性の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))、血小板由来内皮細胞増殖

因子(PD-ECGF)(Ishikawa等, Nature, 338: 557(1989))、及び血管内皮成長因子(VEGF)である。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日に特許付与された欧州特許第471754B号。

ヒトVEGF(hVEGF)ｃＤＮＡで核酸移入した細胞による条件培地は毛細血管内皮細胞の増殖を促進するのに対し、コントロールではそうではなかった。Leung等, Science 246: 1306(1989)。いくつかの付加ｃＤＮＡはhVEGFの121-、189-、及び206-アミノ酸アイソフォーム(また集合的にhVEGF関連タンパク質と呼ばれる)をコードするヒトｃＤＮＡライブラリで同定された。121-アミノ酸タンパク質は、hVEGFの残基116及び159の間の44アミノ酸が欠失している特徴によってhVEGFと異なる。189-アミノ酸タンパク質は、hVEGFの残基116で24アミノ酸が挿入している特徴によってhVEGFと異なり、明らかにヒト血管透過性因子(hVPF)と同一である。206-アミノ酸タンパク質は、hVEGFの残基116で41アミノ酸が挿入している特徴によってhVEGFと異なる。Houck等, Mol. Endocrin., 5: 1806(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370989号。

現在、前から存在する内皮からの新しい血管の形成を含む脈管形成は、様々な疾患の病因と関連しているということがかなり証明されている。これらは、固形腫瘍及び転移、アテローム性動脈硬化症、水晶体後線維増殖症、血管腫、慢性炎症、増殖性網膜症(例えば糖尿病性網膜症)のような眼内新生血管症候群、加齢性黄斑変性(AMD)、血管新生緑内障、移植された角膜細胞及び他の細胞の免疫反応、リウマチ様関節炎、及び乾癬を含む。Folkman等, J. Biol. Chem., 267: 10931-10934(1992); Klagsbrun等, Annu. Rev. Physiol., 53: 217-239(1991); 及びGarner A., "Vascular diseases", In: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2nd Edition(Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710。

腫瘍成長の場合には、脈管形成は過形成から腫瘍形成への変化、固形腫瘍の成

長用の滋養物の提供に非常に重要であると思われる。Folkman等，Nature，339:58(1989)。新血管新生は、正常な細胞に比べて腫瘍細胞の成長を有利にし、増殖自立性を与える。従って、腫瘍部分の微細血管密度と乳癌並びにいくつかの他の腫瘍での患者生存率の間には相関関係が見られる。Weidner等，N. Engl. J. Med，324: 1-6(1991); Horak等，Lancet，340: 1120-1124(1992); Macchiarini等，Lancet，340: 145-146(1992)。

脈管形成の正の制御因子を探求することで、aFGF、bFGF、TGF-α、TGF-β、HGF、TNF-α、アンジオテンシン、IL-8、等を含む多くの候補が与えられた。上掲のFolkman等，J. B. C.、及び上掲のKlagsbrun等。これまでに定義された負の制御因子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N-末端断片(Clapp等，Endocrinology，133: 1292-1299(1993))、アンジオスタチン(O'Reilly等，Cell，79: 315-328(1994))、及びエンドスタチン。O'Reilly等，Cell，88: 277-285(1996)。

【０００８】

ここ数年の研究で、血管内皮細胞の増殖を刺激するだけでなく、血管浸透及び脈管形成を誘発することのVEGFの重要な役割が明らかになっている。Ferrara等，Endocr. Rev.，18: 4-25(1997)。一つのVEGF対立遺伝子さえ喪失すると胎児死亡に至るという知見は、血管系の発達と分化におけるこの因子が担っている代替のない役割を示している。さらに、VEGFは腫瘍及び眼内疾患に関連した新血管新生の重要な媒介物であることが示されている。Ferrara等，Endocr. Rev.，上掲。VEGFmRNA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)。

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

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4月3日に出願されたPCT/US98/06724に記載されている。

【０００９】

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

このグループに属する高度に関連したタンパク質には、ｃｅｆ１０(Simmons等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86：1178-1182(1989))、血清-又は血小板誘導成長因子(ＰＤＧＦ)により素早く活性化されるｃｙｒ６１(O'Brien等, Mol. Cell. Biol., 10：3569-3577(1990))、トランスフォーミング成長因子β(ＴＧＦ-β)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、ＰＤＧＦ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ＰＤＧＦと競合するヒト結合組織成長因子(ＣＴＧＦ)(Bradham等, Ｊ. Cell. Biol., 114：1285-1294(1991))、ｆｉｓｐ-１２(Ryseck等, Cell Growth Differ., 2：235-233(1991))、ヒト血管ＩＢＰ-様成長因子(ＶＩＧＦ)(WO96/17931)、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ｎｏｖが含まれる。Joloit等, Mol. Cell. Biol., 12：10-21(1992)。

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

付加的な分裂促進因子として、インシュリン様成長因子結合タンパク質(ＩＧＦＢＰｓ)が、インシュリン様成長因子(ＩＧＦ)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ＩＧＦ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ＩＧＦ作用に対するＩＧＦＢＰの阻害効果は、脂肪細胞によるグルコース輸送の刺激、軟骨細胞によるサルフェートの取り込み、及び線維芽細胞中へのチミジンの取り込みを含む。Zapf等, J. Clin. Invest., 63：1077(1979)。さらに、正常な細胞での、成長因子媒介性分裂促進因子活性におけるＩＧＦＢＰの阻害効果が示されている。

【００１０】

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。

【００１１】

(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／又は心臓血管新生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、心臓肥大の阻害及び心臓肥大の刺激、例えば鬱血性心不全の治療等の効果が望まれているところでは、当該タンパク質は疾患の診断及び／又は治療(予防を含む)に有用な薬剤であると考えられる。

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ＰＲＯポリペプチドを含んでなる組成物を提供する。一態様では、組成物は治療的有効量のポリペプチドを含有する。他の態様では、組成物はさらなる活性成分、すなわち、心臓血管、内皮又は血管形成薬又はアンジオスタチック(angiostatic)薬、好ましくは血管形成又はアンジオスタティック薬を含有する。好ましくは組成物は無菌である。ＰＲＯ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ＰＲＯ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。

【００１２】

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ＰＲＯ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。

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、ＰＲＯ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。一態様では、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ジオスタチック薬、好ましくは血管形成又はアンジ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。ＰＲＯ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ＰＲＯ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、ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト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。

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-ＰＲＯ抗体を含有する組成物に関する。一態様において、組成物は治療的有効量の抗体を含有する。他の態様において、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ジオスタチック薬、好ましくは血管形成又はアンジ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-ＰＲＯ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、治療的有効量の抗-ＰＲＯ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。

【００１３】

またさらなる態様において、本発明は：

(ａ)治療的有効量のＰＲＯポリペプチドを含有する物質の組成物；

(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ＰＲＯポリペプチドの使用を記した、該容器に添付されるラベル又は当該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ＰＲＯ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、治療的有効量のＰＲＯ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。

他の実施態様において、本発明は、ＰＲＯ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、ＰＲＯ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、ＰＲＯ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、ＰＲＯ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、当該細胞増殖の刺激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。

【００１４】

他の実施態様では、本発明はＰＲＯ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ＰＲＯ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、ＰＲＯ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ＰＲＯ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、ＰＲＯポリペプチドの存在下で、ＰＲＯ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、ＰＲＯポリペプチドの存在下で、ＰＲＯ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工程を含む。

他の実施態様では、本発明は、通常はＰＲＯポリペプチドを発現する細胞における当該細胞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、ＰＲＯ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ＰＲＯ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、ＰＲＯポリペプチドの発現を阻害する化合物を提供する。

【００１５】

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ＰＲＯ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。

ＰＲＯポリペプチドの一又は複数の機能又は活性を阻害するＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチドに結合する単離された抗体を提供する。好ましい態様において、抗体はモノクローナル抗体であり、好ましくは非ヒト相補性決定領域(CDR)残基及びヒトフレームワーク領域(ＦＲ)残基を有する。抗体は標識され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。

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、（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ＰＲＯ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。ＰＲＯ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。

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ポリペプチド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。

【００１６】

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）前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料を抗-ＰＲＯ抗体と接触させ、そして（ｂ）試験試料中での前記抗体とＰＲＯポリペプチドとの複合体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監視と比較して実施してもよい。試験試料における複合体形成量の多少が、試験組織細胞を得た当該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ＰＲＯポリペプチドの存在を測定する方法を提供し、それは、ＰＲＯポリペプチドを含有すると推測される試料を抗-ＰＲＯ抗体と接触させ、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、当該試料はＰＲＯ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。

さらなる態様において、本発明は、抗-ＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチド存在検出に使用する

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癌である。

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、ＰＲＯポリペプチドの有効量を当該哺乳動物に投与することを含んでなる。好ましくは、疾患は心臓肥大、創傷又は火傷などの外傷、又は癌の一型である。さらなる態様では、心臓血管、内皮又は血管形成疾患が癌の一型であるならば、哺乳動物は、血管形成術、又は心臓血管、内皮又は血管形成疾患を治療するための薬剤、例えばＡＣＥインヒビター、又は化学治療薬にさらに暴露される。好ましくは哺乳動物はヒト、好ましくは心臓肥大を起こす危険性のあるヒト、より好ましくは心筋梗塞を罹患しているヒトである。

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

【００１７】

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

他の好ましい態様において、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は心臓肥大であり、ＰＲＯポリペプチドは急性心筋梗塞の治療のための一次血管形成術に続いて投与され、ここで好ましくは、当該哺乳動物は血管形成術又は心臓血管、内皮又は血管形成薬にさらに暴露される。

他の好ましい実施態様において、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は癌であり、ＰＲＯポリペプチドは化学治療薬、成長阻害薬又は細胞毒性薬と組合せて投与

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、ＰＲＯポリペプチドのアゴニストの有効量を当該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心臓肥大、外傷、癌、又は加齢性黄斑変性である。また好ましくは哺乳動物はヒトであり、有効量の血管形成又はアンジ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、ＰＲＯ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心臓肥大、外傷、癌、又は加齢性黄斑変性である。また好ましくは哺乳動物はヒトであり、有効量の血管形成又はアンジ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-ＰＲＯ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心臓肥大、外傷、癌、又は加齢性黄斑変性である。また好ましくは哺乳動物はヒトであり、有効量の血管形成又はアンジオスタチック薬は抗体と共に投与される。

【００１８】

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の心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療方法を提供し、それは、(ａ)ＰＲＯポリペプチド、(ｂ)ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト、又は(ｃ)ＰＲＯ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-ＰＲＯ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。

また、他の態様において、本発明は、プロモータ、(ａ)ＰＲＯポリペプチド、(ｂ)ＰＲＯポリペプチドのアゴニストポリペプチド、又は(ｃ)ＰＲＯ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含有す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を付随している。好ましくは、シグナル配列は哺乳動物、例えば天然ＰＲＯ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有し、プロモータ、(ａ)ＰＲＯポリペプチド、(ｂ)ＰＲＯポリペプチドのアゴニストポリペプチド、又は(ｃ)ＰＲＯ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、ここで当該産生細胞は、組換えレトロウイルス粒子を生産させる構造タンパク質を付随するレトロウイルスベクターを包含する。

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阻害する方法を提供し、それは(ａ)ＰＲＯポリペプチド、(ｂ)ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト、又は(ｃ)ＰＲＯポリペプチドのアンタ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、前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-ＰＲＯ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(ａ)ＰＲＯポリペプチド、(ｂ)ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト、又は(ｃ)ＰＲＯポリペプチドのアンタ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が刺激され、前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-ＰＲＯ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、哺乳動物の心臓肥大を阻害する方法を提供し、それは(ａ)ＰＲＯポリペプチド、(ｂ)ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト

、又は(ｃ)ＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなり、前記哺乳動物の心臓肥大が阻害され、前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-ＰＲＯ抗体であってよい。好ましくは、哺乳動物はヒトであり、心臓肥大は心筋梗塞によって誘発されたものである。

【００１９】

また他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の心臓肥大を刺激する方法を提供し、それは(ａ)ＰＲＯポリペプチド、(ｂ)ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト、又は(ｃ)ＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなり、前記哺乳動物の心臓肥大が刺激され、前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-ＰＲＯ抗体であってよい。好ましくは、哺乳動物は鬱血性心不全を罹患したヒトである。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物においてＰＲＯポリペプチドにより誘発される血管形成を阻害する方法を提供し、それは、当該哺乳動物に治療的有効量の抗-ＰＲＯ抗体を投与することを含んでなる。好ましくは、哺乳動物は鬱血性心不全を罹患したヒトである。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物においてＰＲＯポリペプチドにより誘発される血管形成を刺激する方法を提供し、それは、当該哺乳動物に治療的有効量のＰＲＯポリペプチドを投与することを含んでなる。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又は外傷治癒を促進する。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物へのＰＲＯ３３３、ＰＲＯ３６４，ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２又はＰＲＯ８８５ポリペプチド又はそのアゴニストの投与を含んでなる哺乳動物における内皮細胞成長を抑制する方法を提供し、それによってすでに記載した哺乳動物において内皮細胞成長が抑制される。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物へのＰＲＯ１７９、ＰＲＯ３２１，ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ８７８又はＰＲＯ８７９ポリペプチド又はそのアゴニストの投与を含んでなる哺乳動物における内皮細胞成長を刺激する方法を提供し、それによってすでに記載した哺乳動物において内皮細胞成長が刺激される。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物へのＰＲＯ１７９、ＰＲＯ３２１，ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ８７８又はＰＲＯ８７９ポリペプチドのアンタゴニストの投与を含んでなる、哺乳動物における内皮細胞成長を抑制する方法を提供し、それによってすでに記載した哺乳動物において内皮細胞成長が抑制される。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物へのＰＲＯ３３３、ＰＲＯ３６４，ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２又はＰＲＯ８８５ポリペプチドのアンタゴニストの投与の含んでなる、哺乳動物における内皮細胞成長を刺激する方法を提供し、それによってすでに記載した哺乳動物において内皮細胞成長が刺激される。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物へのＰＲＯ２０５、ＰＲＯ８８２またはＰＲＯ８８７ポリペプチドまたはそのアゴニストの投与を含んでなる、哺乳動物における心臓肥大を誘発する方法を提供し、それによって、すでに記載した哺乳動物において心臓肥大が誘発される。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物へのＰＲＯ２３８、ＰＲＯ８７８またはＰＲＯ１７６０ポリペプチドまたはそのアゴニストの投与を含んでなる、哺乳動物における心臓肥大を減退する方法を提供し、それによって、すでに記載した哺乳動物において心臓肥大が減退する。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物へのＰＲＯ２３８、ＰＲＯ８７８またはＰＲＯ１７６０ポリペプチドのアンタゴニストの投与を含んでなる、哺乳動物における心臓肥大を誘発する方法を提供し、それによって、すでに記載した哺乳動物において心臓肥大が誘発される。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物へのＰＲＯ２０５、ＰＲＯ８８２またはＰＲＯ８８７ポリペプチドのアンタゴニストの投与を含んでなる、哺乳動物における心臓肥大を減退する方法を提供し、それによって、すでに記載した哺乳動物において心臓肥大が減退する。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物に抗ＰＲＯ１７９、抗ＰＲＯ３２１，抗ＰＲＯ８４０、抗ＰＲＯ８４４、抗ＰＲＯ８４６、抗ＰＲＯ８７８又は抗ＰＲＯ８７９抗体の治療的有効量を投与することを含んでなる、ＰＲＯ１７９、

ＰＲＯ３２１，ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ８７８又はＰＲＯ８７９ポリペプチドにより誘発された脈管形成を抑制する方法を提供し、それによってすでに記載した脈管形成が刺激される。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物にすでに記載したポリペプチドの治療的有効量を投与することを含んでなる、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ３２１，ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ８７８又はＰＲＯ８７９ポリペプチドにより誘発された脈管形成を刺激する方法を提供し、それによってすでに記載した脈管形成が刺激される。

【００２０】

Ｂ．　さらなる実施態様

本発明の他の態様において、本発明はＰＲＯ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。

一態様では、単離された核酸分子は、（ａ）ここに開示する全長アミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に同定された他の断片を持つＰＲＯ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％の配列同一性、好ましくは少なくとも約８１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８８％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％の配列同一性、そして、より好ましくは

少なくとも約９９％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

他の態様では、単離された核酸分子は、（ａ）ここに開示する全長ＰＲＯポリペプチドｃＤＮＡコード化配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くＰＲＯポリペプチドのコード化配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の膜貫通ＰＲＯポリペプチドの細胞外ドメインのコード化配列、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に同定された他の断片のコード化配列を持つ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％の配列同一性、好ましくは少なくとも約８１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８８％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約９９％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【００２１】

さらなる態様では、本発明は（ａ）ここに開示するＡＴＣＣに寄託されたヒトタンパク質ｃＤＮＡの任意のもの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％の配列同一性、好ましくは少なくとも約８１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％の配列同一性、より好ましくは少なく

とも約８８％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約９９％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。

本発明の他の態様は、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ＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考慮される。

他の実施態様はＰＲＯ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-ＰＲＯ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ＰＲＯ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、通常は少なくとも約２０ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも約３０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約４０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約５０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約６０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約７０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約８０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約９０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１１０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１２０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１３０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１４０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１５０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１６０ヌク

レオチド長、より好ましくは少なくとも約１７０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１８０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１９０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約２００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約２５０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約３００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約３５０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約４００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約４５０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約５００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約６００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約７００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約８００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約９００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約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％のヌクレオチド配列長を指すことを意味する。ＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯ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-ＰＲＯ抗体に対する結合部位を含むＰＲＯポリペプチド断片によってコードされるＰＲＯポリペプチド断片も考慮される。

【００２２】

他の実施態様では、本発明は、上記で特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ＰＲＯポリペプチドを提供する。

ある態様では、本発明は、ここに開示する全長アミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に同定された他の断片を持つＰＲＯポリペプチドに対して少なくとも約８０％の配列同一性、好ましくは少なくとも約８１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％の配列同

一性、より好ましくは少なくとも約８４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８８％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたＰＲＯポリペプチドに関する。

さらなる態様では、本発明は、ここに開示するＡＴＣＣに寄託されたヒトタンパク質ｃＤＮＡの任意のものにコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも約８０％の配列同一性、好ましくは少なくとも約８１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８８％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたＰＲＯポリペプチドに関する。

【００２３】

さらなる態様では、本発明は、ここに開示する全長アミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に同定された他の断片を持つＰＲＯポリペプチドと比較したときに、少なくとも約８０％ポジティブ、好ましくは少なくとも約８１％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８２％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８３％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８４％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８５％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８６％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８７％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８８％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８９％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９０％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９１％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９２％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９３％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９４％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９５％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９６％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９７％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９８％ポジティブ、そして、より好ましくは少なくとも約９９％ポジティブのスコアとされるアミノ酸配列を含む単離されたＰＲＯポリペプチドに関する。

特別な実施態様では、本発明は、Ｎ-末端シグナル配列及び／又は開始メチオニンを持たず、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ＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯ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された、単離されたＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯ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、ここで同定される天然ＰＲＯ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-ＰＲＯ抗体又は小分子である。

さらなる実施態様では、本発明は、ＰＲＯポリペプチドの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、ＰＲＯポリペプチドを候補分子と接触させ、前記ＰＲＯ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、ＰＲＯポリペプチドは天然ＰＲＯポリペプチドである。

【００２４】

またさらなる実施態様では、本発明は、ＰＲＯポリペプチド、又はここに記載するＰＲＯポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-ＰＲＯ抗体を、担体と組み合わせて含有す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、ＰＲＯポリペプチド、又は上記したようなそのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-ＰＲＯ抗体の、ＰＲＯ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-ＰＲＯ抗体に起因する状態の治療において有用な医薬の調製のための使用に向けられる。

本発明のさらなる実施態様では、本発明は、ここに記載するポリペプチドの任意のものをコードするＤＮＡを含むベクターを提供する。そのようなベクターの任意のもの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、又はバキュウ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。

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、ここに記載する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、上記又は下記のポリペプチドの任意のもの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ヌクレオチド配列の任意のものから誘導されうる。

【００２５】

(発明の詳細な記載)

Ⅰ． 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、並びに血管、例えば動脈、毛細管、静脈、及び／又はリンパ管それ自体の病気の一部を称する。これには、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。このような疾患には、例えば動脈の病気、例えばアテローム性動脈硬化、高血圧、炎症性脈管炎、レーノー病及びレーノー現象、動脈瘤、及び動脈再狭窄；静脈及びリンパ管の疾患、例えば血栓静脈炎、リンパ管炎、及びリンパ浮腫；及び他の血管疾患、例えば末梢血管病、癌、例えば血管腫瘍、例えば血管腫(毛細管及び海綿状)、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮細胞腫、カポジ肉腫、リンパ管腫、及びリンパ管肉腫、腫瘍血管形成、外傷、例えば傷、火傷、及び他に損傷を被った組織、移植固定、瘢痕化、虚血再潅流傷害、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。

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なのない、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。この故に、その用語は、心臓肥大の発達における生理学的病状、例えば血圧の上昇、大動脈狭窄、又は心筋梗塞も含まれる。

【００２６】

「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。

「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、及び心室壁を通っ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、影響をう受けていない心臓領域におけるコラーゲンの形成が増加する。

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にかかわらず、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)、β-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)。

【００２７】

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)。β-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。

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

【００２８】

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、黒色腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平上皮細胞癌、小細

胞肺癌、非小細胞肺癌、胃癌、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、例えば肝癌(hepatic carcinoma)及び肝細胞腫(hepatoma)、膀胱癌、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮体癌、唾液腺癌、腎細胞癌及びウィルムス腫瘍等の腎臓癌、基底細胞癌、黒色腫、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、精巣癌、食道癌、及び様々な種類の頭部及び頸部の癌が含まれる。ここでの治療に好適な癌は乳癌、大腸癌、肺癌、黒色腫、卵巣癌及び上述に記した血管腫瘍に係るものである。

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

【００２９】

「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相以外の位置で）阻止する薬剤、例えば、Ｇ１停止及びM相停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM相ブロッカーは、ビンカス（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキソール、及びトポＩＩ阻害剤、例えばドキソルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。Ｇ１停止させるこれらの薬剤は、Ｓ相停止にも波及し、例えば、ＤＮＡアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、５-フルオロウラシル及びＡｒａ-Ｃである。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael,編集, Chapter 1, Murakamiらによる表題「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」（WB Saunders: Philadelphia, 1995）、特に13頁に見出される。さらなる例には、腫瘍壊死因子(ＴＮＦ)、酸性又は塩基性ＦＧＦ又は肝実質細胞成長因子(ＨＧＦ)の血管形成活性を阻害又は中和可能な抗体、組織因子の凝固活性を阻害又は中和可能な抗体、プロテインＣ又はプロテインＳ(1991年2月21日に公開されたWO91/01753を参照されたい)、又はＨＥＲ２レセプターに結合可能な抗体(WO89/06692)、例えば４Ｄ５抗体(及びそれらの機能的等価物)(例えばWO92/22653)が含まれる。

「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。

【００３０】

「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称する。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、アンジオテンシン-ＩＩレセプターアンタゴニスト：エンドセリンレセプターアンタゴニスト、例えばBOSENTAN™及びMOXONODIN™、インターフェロン-ガンマ(ＩＦＮ-γ)；デス-アスパラタート-アンジオテンシン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)ＡＡＡＡｔ-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、及びカーベジルロール：アンジ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。

「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、表皮成長因子(ＥＧＦ)、ＣＴＧＦ及びそのファミリーのメンバー、ＦＧＦ、及びＴＧＦ-α及びＴＧＦ-βが含まれる。

「アンジオスタチック薬」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。例には、上述した血管形成剤の抗体又は他のアンタゴニスト、例えばＶＥＧＦに対する抗体が含まれる。さらに、細胞治療薬、例えば細胞毒性薬、化学治療薬、成長阻害、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。

本発明における薬理学的意味で、活性剤、例えばＰＲＯ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-ＰＲＯ抗体の「治療的有効量」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ＰＲＯ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-ＰＲＯ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ＰＲＯ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。

【００３１】

「天然配列ＰＲＯポリペプチド」は、天然由来の対応するＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチド」という用語には、特に、特定のＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチドは、添付の図面に示される全長アミノ酸配列を含む成熟又は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ＰＲＯ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ＰＲＯ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。

ＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチドの形態を意味する。通常、ＰＲＯポリペプチドＥＣＤは、それらの膜貫通及び／又は細胞質ドメインを１％未満、好ましくはそのようなドメインを０．５％未満しか持たない。本発明のＰＲＯポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインのいずれかの末端から約５アミノ酸を越えない可能性が高い。従って、ＰＲＯポリペプチド細胞外ドメインは、場合によっては、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。

ここに開示する種々のＰＲＯ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。

【００３２】

「ＰＲＯ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、ここに開示される全長天然配列ＰＲＯ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全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、シグナルペプチド有無のここに開示されたＰＲＯの細胞外ドメイン又はここに開示された全長ＰＲＯポリペプチドの他の断片と、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有する活性ＰＲＯポリペプチドを意味する。このようなＰＲＯポリペプチド変異体には、例えば、全長天然アミノ酸配列のＮ-又はＣ-末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたＰＲＯポリペプチドが含まれる。通常、ＰＲＯポリペプチド変異体は、ここに開示される全長天然アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、シグナルペプチド有無のここに開示されたＰＲＯの細胞外ドメイン又はここに開示された全長ＰＲＯポリペプチドの他の断片と、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは少なくとも約８１％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８４％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８８％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約

９０％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％のアミノ酸配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約９９％のアミノ酸配列同一性を有している。通常は、ＰＲＯ変異体ポリペプチドは、少なくとも約１０アミノ酸長、より多くは少なくとも約２０アミノ酸長、より多くは少なくとも約３０アミノ酸長、より多くは少なくとも約４０アミノ酸長、より多くは少なくとも約５０アミノ酸長、より多くは少なくとも約６０アミノ酸長、より多くは少なくとも約７０アミノ酸長、より多くは少なくとも約８０アミノ酸長、より多くは少なくとも約９０アミノ酸長、より多くは少なくとも約１００アミノ酸長、より多くは少なくとも約１５０アミノ酸長、より多くは少なくとも約２００アミノ酸長、より多くは少なくとも約３００アミノ酸長、又はそれ以上である。

以下に示すように、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与える。このソースコードは、UNIX（登録商標）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）及び％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する仮説的な例を示し、「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」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。

【００３３】

```
/*                                表１
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * 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, _M, 0, 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, 0,_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, _M, 0, 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, _M, 0, 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}
 };
```

```
/*
 */
#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 an 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  DINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  DINS1           1       /* penalty per base */
#define  PINS0           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           ijmp;           /* 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();
```

```
/* 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 an 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, 0xFFFFFFF, 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)                                                    main
	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 jmps */
	readjmps();	/* get the actual jmps */
	print();	/* print stats, alignment */

	cleanup(0);	/* unlink any tmp files */
}
```

```
/* 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()                                                                    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_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

        ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("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;
                }
```

...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
         */
```

```
                id = xx - yy + len1 - 1;
                if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
                        col1[yy] = mis;
                else if (delx >= dely[yy]) {
                        col1[yy] = delx;
                        ij = dx[id].ijmp;
                        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(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 {
                        col1[yy] = dely[yy];
                        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(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)
                                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                        if (col1[yy] > smax) {
                                smax = col1[yy];
                                dmax = id;
                        }
                }
        }
        if (endgaps && xx < len0)
                col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
        if (col1[yy-1] > smax) {
                smax = col1[yy-1];
                dmax = id;
        }
        tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
    }
    (void) free((char *)ndely);
    (void) free((char *)dely);
    (void) free((char *)col0);
    (void) free((char *)col1);
}
```

```
/*
 *
 * 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()                                                          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();
}
```

**getmat**

```
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
        int     lx, ly;                 /* "core" (minus endgaps) */
        int     firstgap, lastgap;      /* leading trailing overlap */
{
        int             nm, 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;

        nm = 0;
        while ( *p0 && *p1 ) {
                if (siz0) {
                        p1++;
                        n1++;
                        siz0--;
                }
                else if (siz1) {
                        p0++;
                        n0++;
                        siz1--;
                }
                else {
                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                                nm++;
                        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)nm/(double)lx;
        fprintf(fx, "\n");
        fprintf(fx, "< %d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
                nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
```

...getmat

```
        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, DINS0, DINS1);
        else
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
                smax, PINS0, 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     out[2][P_LINE]; /* output line */
static char     star[P_LINE];   /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
```

pr_align

```
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];
        }
```

**...pr_align**

```
        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';
```

**dumpblock**

**...dumpblock**

```
        (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; 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;
{
```

**...putline**

```
        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()                                                          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';
}
```

**stripname**

```
/*
 * 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));

}
```

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

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";             /* tmp file for jmps */
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';
```

...getseq

```
        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_calloc

```
g_calloc(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_calloc() 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

```
readjmps()
{
        int             fd = -1;
        int             siz, i0, i1;
        register  i, j, xx;

        if (fj) {
                (void) fclose(fj);
                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--)
                                ;
```

```
                        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 jmps
         */
        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;
        }
}
```

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                                    writejmps
        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);
}
```

【００３４】

表　２

| | | |
|---|---|---|
| PRO | XXXXXXXXXXXXXXX | ( 長 さ = 15　アミノ酸　) |
| 比較タンパク質 | XXXXXYYYYYYY | ( 長 さ = 12　アミノ酸　) |

% アミノ酸配列同一性＝

（ＡＬＩＧＮ-２で決定した２つのポリペプチド配列間の同一一致したアミノ酸残基の数）を
（ＰＲＯポリペプチドのアミノ酸残基の総数）で 除する＝

５を１５で除する　＝ 33.3%

【００３５】

表 3

| | | |
|---|---|---|
| PRO | XXXXXXXXXX | ( 長 さ = 10　アミノ酸　) |
| 比較タンパク質 | XXXXXYYYYYYZZYZ | ( 長 さ = 15　アミノ酸　) |

% アミノ酸配列同一性＝

（ＡＬＩＧＮ-２で決定した２つのポリペプチド配列間の同一一致したアミノ酸残基の数）を
（ＰＲＯポリペプチドのアミノ酸残基の総数）で 除する＝

５を１０で除する　＝ 50%

【００３６】

表 4

| | | |
|---|---|---|
| PRO-DNA | NNNNNNNNNNNNNN | ( 長 さ ＝14 ヌクレオチド ) |
| 比較ＤＮＡ | NNNNNNLLLLLLLLLL | ( 長 さ ＝16 ヌクレオチド ) |

％核酸配列同一性＝

（ＡＬＩＧＮ-２で決定した２つの核酸配列間の同一一致したヌクレオチド数）を
（ＰＲＯ-ＤＮＡ核酸配列のヌクレオチドの総数）で除する＝

６を１４で除する ＝42.9%

【００３７】

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で決定した２つの核酸配列間の同一一致したヌクレオチド数）を
（ＰＲＯ-ＤＮＡ核酸配列のヌクレオチドの総数）で除する＝

４を１２で除する ＝33.3%

【００３８】

ここに定義されるＰＲＯポリペプチド配列に対する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、ＰＲＯ配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegalign(DNASTAR)ソフトウエアのような公に入手可能なコンピュータソフトウエ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、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、％アミノ酸配列同一性値は、以下に記載するように、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが表１に与えられている配列比較プログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテク社によって作成され、表１に示したソースコードは米国著作権事務所, Washington D.C., 20559に使用者用

書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2はジェネンテク社、South San Francisco, Californiaを通して公的に入手可能であり、また表１に与え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。

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の長さと異なる場合、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、表２-３は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「ＰＲＯ」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。

【００３９】

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は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2（Altschul等, 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、また他の手段ではNational Institute of Health, Bethesda, MDから得られる。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。

アミノ酸配列比較にNCBI-BLAST2が用いれれる状況では、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。

さらに、％アミノ酸配列同一性値は、WU-BLAST-2コンピュータプログラム（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて決定してもよい。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、％アミノ酸配列同一性値は、（ａ）天然ＰＲＯポリペプチドから誘導された配列を有する対象とするＰＲＯポリペプチドのアミノ酸配列と、対象とする比較アミノ酸配列（即ち、対象とするＰＲＯポリペプチドが比較されるＰＲＯポリペプチド変異体であってもよい配列）との間の、WU-BLAST-2によって決定した一致する同一アミノ酸残基の数を、（ｂ）対象とする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持つ又は持っているアミノ酸配列Ａを含んでなるポリペプチド」という表現では、アミノ酸配列Ａが対象とする比較アミノ酸配列であり、アミノ酸配列Ｂが対象とするＰＲＯポリペプチドのアミノ酸配列である。

【００４０】

「ＰＲＯ変異体ポリヌクレオチド」又は「ＰＲＯ変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性なＰＲＯポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、ここに開示する全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠く全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無のＰＲＯポリペプチド細胞外ドメイン、又はここに開示する全長ＰＲＯポリペプチド配列の他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。通常は、ＰＲＯ変異体ポリヌクレオチドは、ここに開示する全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠く全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無のＰＲＯポリペプチド細胞外ドメイン、又はここに開示する全長ＰＲＯポリペプチド配列の他の断片をコードする核酸配列と少なくとも約８０％の核酸配列同一性、好ましくは少なくとも約８１％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８４％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８８％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％の核酸配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約９９％の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然のヌクレオチド配列を含まない。

通常は、ＰＲＯ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、より多くは少なくとも約６０ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約９０ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約１２０ヌクレオチド長、より多くは少な

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

【００４１】

ここに定義されるＰＲＯポリペプチドコード化核酸配列に対して同定されている「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、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、ＰＲＯポリペプチドコード化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、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegalign(DNASTAR)ソフトウエアのような公に入手可能なコンピュータソフトウエ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、%核酸配列同一性値は、以下に記載するように、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが表１に与えられている配列比較プログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテク社によって作成され、表１に示したソースコードは米国著作権事務所, Washington D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2はジェネンテク社、South San Francisco, Californiaを通して公的に入手可能であり、またＦｉｇ２Ａ-Ｐに与え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。

ここでの目的のためには、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アミノ酸配列Ｃと言うこともできる）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ヌクレオチドの数であり、ＺはＤの全ヌクレオチド数である。核酸配列Ｃの長さが核酸配列Ｄの長さと異なる場合、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。この方法を用いた％核酸配列同一性の計算の例として、表４-５は、「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。

特に断らない限りは、ここでの全ての％核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、％核酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2（Altschul等, 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://ww.ncbi.nlm.nih.govからダウンロードできる。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。

【００４２】

配列比較にNCBI-BLAST2が用いれれる状況では、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と言うこともできる）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ヌクレオチドの数であり、ＺはＤの全ヌクレオチド数である。核酸配列Ｃの長さが核酸配列Ｄの長さと異なる場合、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。

さらに、％核酸配列同一性値は、WU-BLAST-2コンピュータプログラム（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて決定してもよい。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、％核酸配列同一性値は、（ａ）天然配列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とするＰＲＯポリペプチドコード化配列の核酸配列と、対象とする比較核酸分子（即ち、対象とするＰＲＯポリペプチドコード化核酸分子の配列が比較される変異体ポリヌクレオチドであってもよい配列）との間の、WU-BLAST-2によって決定した一致する同一ヌクレオチドの数を、（ｂ）対象とする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％のアミノ酸配列同一性を持つ又は持っている核酸配列Ａを含んでなる単離された核酸分子」という表現では、核酸配列Ａが対象とする比較核酸配列であり、核酸配列Ｂが対象とするＰＲＯポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

他の実施態様では、ＰＲＯ変異体ポリヌクレオチドは、活性なＰＲＯポリペプチドをコードする核酸分子であり、好ましくは緊縮性ハイブリッド形成及び洗浄条件下で、各々Ｆｉｇ２（配列番号：２）、Ｆｉｇ４（配列番号：４）、Ｆｉｇ６（配列番号：６）、Ｆｉｇ８（配列番号：８）、Ｆｉｇ１０（配列番号：１０）、Ｆｉｇ１２（配列番号：１２）、Ｆｉｇ１４（配列番号：１４）、Ｆｉｇ１６（配列番号：１６）、Ｆｉｇ１８（配列番号：１８）、Ｆｉｇ２０（配列番号：２０）、Ｆｉｇ２２（配列番号：２２）、Ｆｉｇ２４（配列番号：２４）、Ｆｉｇ２６（配列番号：２６）、Ｆｉｇ２８（配列番号：２８）、Ｆｉｇ３０（配列番号：３０）、及びＦｉｇ３２（配列番号：３２）に示す全長ＰＲＯ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ッド形成できる。ＰＲＯ変異体ポリペプチドは、ＰＲＯ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。

【００４３】

上記のように実施されるアミノ酸配列同一性比較の文脈における「ポジティブ（陽性）」という用語は、比較された配列において同一であるアミノ酸残基ばかりでなく特性を有するものも含む。対象とするアミノ酸残基に対してポジティブ値をスコアされるアミノ酸残基は、対象とするアミノ酸残基と同一であるか、又は対象とするアミノ酸残基の（下記の表６で特定するように）好ましい置換とされるものである。

ここでの目的のために、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％ポジティブ値（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％ポジティブ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ポジティブであるとの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の長さと異なる場合、ＡのＢに対する％ポジティブは、ＢのＡに対する％ポジティブとは異なることは理解されるであろう。

「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は、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。好ましくは、単離されたポリペプチドは、自然に結合する全ての成分と結合していない。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充分なほど、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、ＰＲＯ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。

ＰＲＯポリペプチドをコードする「単離された」核酸分子、又は抗-ＰＲＯ抗体をコードする「単離された」核酸分子は、同定され、ＰＲＯ-コード化核酸の天然源、又は抗-ＰＲＯ-コード化核酸の天然源に通常付随している少なくとも１つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。好ましくは、単離された核酸分子は、自然に結合する全ての汚染物質と結合していない。単離されたＰＲＯ-コード化核酸分子又は単離された抗-ＰＲＯ-コード化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。ゆえに、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在するＰＲＯ-コード化核酸分子又は抗-ＰＲＯ-コード化核酸分子とは区別される。しかし、ＰＲＯポリペプチドをコードする単離された核酸分子、又は抗-ＰＲＯ抗体をコードする単離された核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるＰＲＯポリペプチド又は抗-ＰＲＯ抗体を通常は発現する細胞に含まれるＰＲＯ-核酸分子、又は抗-ＰＲＯ-核酸分子を含む。

【００４４】

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

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのＤＮＡは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのＰＲＯ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い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、従来の手法に従って、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。

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

ここで定義される「緊縮性条件」又は「高度の緊縮性条件」は、（１）洗浄のために低イオン強度及び高温度、例えば、５０℃において０．０１５Ｍの塩化ナトリウム／０．００１５Ｍのクエン酸ナトリウム／０．１％のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；（２）ハイブリッド形成中にホルムアミド等の変性剤、例えば、４２℃において５０％（v/v）ホルムアミドと０．１％ウシ血清アルブミン／０．１％フィコール／０．１％のポリビニルピロリドン／５０ｍＭのｐＨ６．５のリン酸ナトリウムバッファー、及び７５０ｍＭの塩化ナトリウム、７５ｍＭクエン酸ナトリウムを用いるもの；（３）４２℃における５０％ホルムアミド、５ｘＳＳＣ（０．７５ＭのＮａＣｌ、０．０７５Ｍのクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、０．１％のピロリン酸ナトリウム、５ｘデンハード液、超音波処理サケ精子ＤＮＡ（５０μｇ／ｍｌ）、０．１％

ＳＤＳ、及び１０％のデキストラン硫酸と、４２℃における０．２ｘＳＳＣ（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）中の洗浄及び５５℃での５０％ホルムアミド、次いで５５℃におけるＥＤＴＡを含む０．１ｘＳＳＣからなる高緊縮性洗浄を用いるものによって同定される。

「中程度の緊縮性条件」は、Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されているように同定され、上記の緊縮性より低い洗浄溶液及びハイブリッド形成条件（例えば、温度、イオン強度及び％ＳＤＳ）の使用を含む。中程度の緊縮性条件は、２０％ホルムアミド、５ｘＳＳＣ（１５０mMのＮａＣｌ、１５mMのクエン酸三ナトリウム）、５０mMリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５ｘデンハード液、１０％デキストラン硫酸、及び２０ｍｇ／ｍｌの変性剪断サケ精子ＤＮＡを含む溶液中の３７℃での終夜インキュベーション、次いで１ｘＳＳＣ中３７－５０℃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であろう。

【００４５】

「エピトープタグ」なる修飾詞は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したＰＲＯポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するに十分な数の残基を有しているが、その長さは融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう充分に短い。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にかなり独特である。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から５０のアミノ酸残基(好ましくは約１０から約２０のアミノ酸残基)を有する。

ＰＲＯ変異体における「活性な」及び「活性」とは、天然又は天然発生ＰＲＯ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ＰＲＯタンパク質の形態を称する。

ここで開示されているスクリーニングアッセイにより同定可能なＰＲＯポリペプチドに拮抗する分子(例えば、有機又は無機小分子、ペプチド等)における「生

物学的活性」とは、ここで同定されたＰＲＯポリペプチドに結合又は複合体化、又は他の細胞タンパク質とＰＲＯポリペプチドとの相互作用を干渉、又はＰＲＯポリペプチドの転写又は翻訳を阻害する分子の能力を称するときに使用される。特に好ましい生物学的活性には、血管に影響を及ぼす全身疾患、例えば真性糖尿病、並びに動脈、毛細管、静脈及び／又はリンパ管の病気、及び癌に作用する心臓肥大活性が含まれる。

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然ＰＲＯポリペプチドの一又は複数の生物学的活性、例えば適切であるならば、その分裂促進又は血管形成活性を阻止、阻害、又は中和する任意の分子を含む。ＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストは、ＰＲＯポリペプチドの細胞レセプターへの結合に干渉する、ＰＲＯポリペプチドにより活性化される細胞を無力化又は死亡させる、又はＰＲＯポリペプチドが細胞レセプターに結合した後に血管内皮細胞の活性化に干渉することにより作用する。ＰＲＯポリペプチドアンタゴニストによる仲介のこのような点の全ては、この発明の目的と等しいと考えられる。アンタゴニストは、分裂促進、血管形成、又はＰＲＯポリペプチドの他の生物学的活性を阻害し、よって、腫瘍、特に固形悪性腫瘍、慢性関節リュウマチ、乾癬、アテローム性動脈硬化、糖尿病、他の網膜症、水晶体後繊維増殖症、年齢関連性斑変性、新血管新生緑内障、移植角膜組織及び他の組織の免疫拒絶、慢性関節リウマチ、血管新生緑内障、血管腫、甲状腺過形成(グレイブス病)、角膜及び他の組織の移植、及び慢性炎症を含む、所望しない過度の新血管新生により特徴付けられる病気又は疾患の治療に有用である。また、アンタゴニストは、所望しない過度の血管浸透性により特徴付けられる病気又は疾患、例えば脳腫瘍に関連した浮腫、悪性腫瘍に関連した腹水症、メーグス症候群、肺炎、ネフローゼ症候群、心外膜液(例えば心膜炎に関連したもの)、胸膜滲出の治療に有用である。同様に「アゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然ＰＲＯポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を含む。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然ＰＲＯポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、有機小分子等を含む。

「小分子」とは、ここでは約５００ダルトン以下の分子量を有するものと定義する。

ここで使用される場合の「ＰＲＯポリペプチドレセプター」なる用語は、ＰＲＯ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ＰＲＯ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称する。

【００４６】

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

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

「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、β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β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.I, 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。

【００４７】

「抗体断片」には、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域が含まれる。抗体断片の例には、Ｆａｂ、Ｆａｂ'、$F(ab')_2$及びＦｖ断片；ダイアボディー(diabodies)；直鎖状抗体(Zapata等, Protein Eng. 8(10):1057-1062[1995])；単鎖抗体分子；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。

抗体のパパイン消化により、各々が単一の抗原結合部位を有する「Ｆａｂ」断片と呼ばれる２つの同一の抗原結合断片と、その名称が容易に結晶化する能力を表す、残りの「Ｆｃ」断片が産生される。ペプシン処理により、２つの抗原結合部位を有し、更に抗原を架橋させ得る$F(ab')_2$断片が得られる。

「Ｆｖ」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この配置において、各可変ドメインの３つのＣＤＲは相互に作用して$V_H$-$V_L$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Ｆｖの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

またＦａｂ断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(ＣＨ１)を有す

る。Ｆａｂ'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖ＣＨ１領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でＦａｂ断片とは異なる。Ｆａｂ'-ＳＨは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持しているＦａｂ'に対するここでの命名である。Ｆ(ａｂ')$_2$抗体断片は、間にヒンジシステインを有するＦａｂ'断片の対として生産された。抗体断片の他の化学結合も知られている。

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

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには５つの主たるクラス：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ及びＩｇＭがあり、それらのいくつかは更にサブクラス(アイソタイプ)、例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３及びＩｇＧ４、ＩｇＡ及びＩｇＡ２に分割される。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれα、σ、ε、γ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。

【００４８】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能な突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。更に、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的には含む通常の(ポリクローナル)抗体と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンによって汚染されていないハイブリドーマ培養から合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、実質的に均一な抗体集団から得られているという抗体の特徴を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、最初にKohler等, Nature 256, 495 (1975)により開示されたハイブリドーマ法によって

作ることができ、あるいは組換えＤＮＡ法によって作ることができる(例えば、米国特許第4,816,567号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson等, Nature 352:624-628(1991)、及びMarksほか, Ｊ. Mol. Biol. 222:581-597(1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリ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])。

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。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ＦｖＦＲ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(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。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™抗体を含む。

【００４９】

「一本鎖Ｆｖ」又は「ｓＦｖ」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、Ｆｖポリペプチドは、ｓＦｖが抗原結合に対する所望の構造を形成できるようにするポリペプチドリンカーを$V_H$と$V_L$ドメインの間に更に含んでいる。ｓＦｖのレビューには、例えば、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol.113, Rosenburg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。

「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充分なほど、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。

「標識」なる語は、ここで用いられる場合、抗体に直接又は間接的に複合して「標識」抗体を生成する検出可能な化合物又は組成物を称する。標識は、それ自身検出可能でもよく（例えば、放射性標識又は蛍光標識）、又は酵素標識の場合、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変換を触媒してもよい。検出可能な標識として提供できる放射性核種は、例えば、Ｉ-１３１、Ｉ-１２３、Ｉ-１２５、Ｙ-９０、Ｒｅ-１８８、Ａｔ-２１１、Ｃｕ-６７、Ｂｉ-２１２、及びＰｄ-１０９を含む。また、標識は毒素などの検出できない物質であってもよい。

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

【００５０】

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

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である（即ち「異種の」）アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ド

メイン配列は、ＩｇG-１、ＩｇG-２、ＩｇG-３又はＩｇG-４サブタイプ、ＩｇＡ（ＩｇA-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。

【００５１】

ＩＩ．本発明の組成物と方法

Ａ．ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５及びＰＲＯ８８７変異体

ここに記載した全長天然配列ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５及びＰＲＯ８８７ポリペプチドに加えて、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５及びＰＲＯ８８７変異体も調製できると考えられる。ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５及びＰＲＯ８８７変異体は、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ＤＮＡ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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲ

Ｏ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７の翻訳後プロセスを変えうることと評価されるであろう。

天然全長配列ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７又はここに記載したＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７の種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第5,364,934号に記載されている保存的及び非保存的変異についての任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７と比較してＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７のアミノ酸配列が変化するＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも１つのアミノ酸のＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７の一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。いずれのアミノ酸残基が所望

の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７の配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされ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、一のアミノ酸の類似した構造及び／又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては１から５のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、得られた変異体を全長又は成熟天然配列により示される活性について試験することにより決定される。

【００５２】

特別の実施態様では、関心のある保存的置換を、好ましい置換を先頭にして表６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に例示的置換を示し又は以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より置換的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

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; | |

| | | |
|---|---|---|
| | ﾉﾙﾛｲｼﾝ | leu |
| Leu(L) | ﾉﾙﾛｲｼﾝ; 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; ﾉﾙﾛｲｼﾝ | leu |

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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）標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は（ｃ）側鎖の嵩を維持しながら、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：ﾉﾙﾛｲｼﾝ, met, ala, val, leu, ile;

（２）中性の親水性：cys, ser, thr;

（３）酸性：asp, glu;

（４）塩基性：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

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。

【００５３】

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、アラニンスキャンニング、及びＰＣＲ突然変異誘発等の当該技術において公知の技術を使用して作成することができる。部位指向性突然変異誘発［Carter等, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)］、カセット突然変異誘発［Wells等, Gene, 34: 315 (1985)］、制限選択突然変異誘発［Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)］又は他の周知の技術が、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７変異体ＤＮＡを製造するために、クローン化されたＤＮＡに実施できる。

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャン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。

【００５４】

Ｂ.　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５及びＰＲＯ８８７の修飾

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５及びＰＲＯ８８７の共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一型は、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７を水不溶性支持体マトリクスあるいは抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７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α-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。

【００５５】

本発明の範囲内に含まれるＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７に見られる一又は複数の炭水化物部分の欠失（存在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び／又は酵素的手段によるグリコシル化の削除のいずれかによる）、及び／又は天然配列ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７に存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。さらに、この文節は、存在する種々の炭水化物部分の性質及び割合の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含む。

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴ってもよい。この変更は、例えば、一又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８

４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７（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。ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７アミノ酸配列は、場合によっては、ＤＮＡレベルでの変化、特に、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

【００５６】

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, Arch. Biochem. Biophys., 2

59:52 (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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７の共有結合的修飾の他の型は、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

【００５７】

また、本発明のＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７は、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７を含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７との融合を含む。エピトー

プタグは、一般的にはＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７のアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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)］；ＫＴ３エピトープペプチド［Martin等, Science, 255:192-194 (1992)］；α-チューブリンエピトープペプチド［Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)］；及びＴ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ［Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)］を含む。

それに換わる実施態様では、キメラ分子はＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲ

Ｏ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＩｇＧ分子のＦｃ領域であり得る。Ｉｇ融合体は、好ましくはＩｇ分子内の少なくとも１つの可変領域に換えてＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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、ＩｇＧ１分子のヒンジ、ＣＨ２及びＣＨ３、又はヒンジ、ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３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。

【００５８】

Ｃ．　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５及びＰＲＯ８８７ポリペプチドの調製

本発明は、本出願においてＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７と称される、新規に同定及び単離されたヌクレオチド配列コード化ポリペプチドを提供するものである。特に、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドをコードするｃＤＮＡは、以下の実施例にさらなる詳細が開示されているようにして、同定され単離される。分離発現環状部に生産されるタンパク質は、異なるＰＲＯ番号が付与されるが、ＵＮＱ番号は任意の付与されるＤＮ

Ａ及びコード化タンパク質で唯一であり、変わることはないであろう。しかしながら、簡単にする目的で、本出願においては、ＤＮＡ１６４５１-１３８８、ＤＮＡ３５６００-１１６２、ＤＮＡ４７３６５-１２０６、ＤＮＡ５９８３８-１４６２、ＤＮＡ４４１９６-１３５３、ＤＮＡ７６５３２-１７０２、ＤＮＡ３０８６８、ＤＮＡ３４４３３、ＤＮＡ４１３７４、ＤＮＡ５３９８７、ＤＮＡ５８１２０、ＤＮＡ５８１２１、ＤＮＡ５８１２２、ＤＮＡ５８１２５、ＤＮＡ５８１２８又はＤＮＡ５８１３０にコードされるタンパク質、さらなる天然相同体、及びＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７の先の定義に含まれる変異体は、由来又は調製方法に無関係に、それぞれ「ＰＲＯ１７９」、「ＰＲＯ２３８」、「ＰＲＯ３６４」、「ＰＲＯ８４４」、「ＰＲＯ８４６」、「ＰＲＯ１７６０」、「ＰＲＯ２０５」、「ＰＲＯ３２１」、「ＰＲＯ３３３」、「ＰＲＯ８４０」、「ＰＲＯ８７７」、「ＰＲＯ８７８」、「ＰＲＯ８７９」、「ＰＲＯ８８２」、「ＰＲＯ８８５」又は「ＰＲＯ８８７」と称される。

以下の説明は、主として、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７を調製することができると考えられる。例えば、

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。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。ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７の種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて全長ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドを生産してもよい。

【００５９】

ｉ．　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードするＤＮＡの単離

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドをコードするＤＮＡは、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードするｍＲ

ＮＡ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ＰＲＯ１７９、ヒトＰＲＯ２３８、ヒトＰＲＯ３６４、ヒトＰＲＯ８４４、ヒトＰＲＯ８４６、ヒトＰＲＯ１７６０、ヒトＰＲＯ２０５、ヒトＰＲＯ３２１、ヒトＰＲＯ３３３、ヒトＰＲＯ８４０、ヒトＰＲＯ８７７、ヒトＰＲＯ８７８、ヒトＰＲＯ８７９、ヒトＰＲＯ８８２、ヒトＰＲＯ８８５又はヒトＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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(ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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)。

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、充分な長さで、疑陽性が最小化されるよう充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、$^{32}$Ｐ標識されたＡＴＰのような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用が含まれる。中程度の厳密性及び高度の厳密性を含むハイブリッド形成条件は、上掲のSambrook等に与えられている。

このようなライブラリスクリーニング法において同定された配列は、Genbank等の公共データベース又は個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内又は全長配列に渡っての（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エアプログラム、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展法を使用し、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。

【００６０】

ｉｉ．　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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

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。

【００６１】

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（ATCC53,6

35）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、例えばバシリスブチリス(B. subtilis)及びバシリ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に記載されたバシリリチェニフォルミス４１Ｐ）、シュードモナス、例えば緑膿筋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$k a n^{r}$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　ｒｂｓ７ｉｌｖＧ$k a n^{r}$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。

【００６２】

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、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ブ(Schizosaccharomyces prombe)（Beach及びNurse, Nature, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日発行のEP 139,383）；クルベロミセスホスツ(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, CBS 4574; Louvencourt等, J. Bacteriol. 737 [1983]）、ケーフラギリス(K. fragilis)（ATCC 12,424）、ケーブルガリクス(K. bulgaricus)（ATCC 16,045）、ケーウィケラミイ(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. drosophilarum)（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(Tolypocladium)（1991年1月10日発行のWO 91/00357）；及びコウジ菌、例えば偽巣性コウジ菌（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]）及びクロカビ（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。

グリコシル化ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、Ｐ

ＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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／-ＤＨＦＲ(CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980));マウスのセルトリ細胞（TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)）；ヒト肺細胞（W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞（Hep G2, HB 8065); 及びマウス乳房腫瘍細胞（MMT 060562, ATCC CCL51)を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

【００６３】

ｉｉｉ．　複製可能なベクターの選択及び使用

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７は直接的に組換え手法によって生産されるだけではなく、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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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、ｌｐｐあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及びクルイベロマイシス(Kluyveromyces)α因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスフォターゼリーダー、白体(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行の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。

【００６４】

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、２μ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)例えばバシリに対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

哺乳動物細胞に適切な選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、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードする核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型ＤＨＦＲを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub 等により，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたＤＨＦＲ活性に欠陥のあるＣＨＯ株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドＹＲｐ７に存在するｔｒｐ１遺伝子である。Stinchcomb等，Nature，282：39(1979)；Kingman等，Gene，7：141(1979)；Tschemper等，Gene，10：157(1980)。ｔｒｐ１遺伝子は、例えば、ＡＴＣＣ番号４４０７６あるいはＰＥＰ４-１のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する。Jones，Genetics，85:12 (1977)。

発現及びクローニングベクターは、通常、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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β-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，Nu

cleic 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もまたＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードするＤＮＡと作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ(S.D.)配列を有する。

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、３-ホスホグリセラートキナーゼ(Hitzeman 等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980))又は他の糖分解酵素(Hess 等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968)；Holland, Biochemistry, 17：4900(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。

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。

【００６５】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

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、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８

８５又はＰＲＯ８８７をコードするｍＲＮＡの非翻訳部分にポリアデニル化フラグメント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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

【００６６】

ｉｖ． 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な方法、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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

【００６７】

ｖ．　ポリペプチドの精製

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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™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。ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７の性質に依存する。

【００６８】

Ｄ．　ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドの用途

ｉ．　心血管、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血管、内皮及び血管形成活性をテストするために使用可能である。

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テストするアッセイには、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テスト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テストするエンドセリンレセプタ結合アッセイ、機能活性が第２のメッセッンジャーの細胞内レベルを測定することにより、Ｒａｔ-Ｉ細胞内で測定されるイノシトールホスファート蓄積アッセイ、雄のニュージーランドウサギの内皮を使用するインビボ(単離された管)研究、及び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、WO95/16035(骨、軟骨、腱)、；WO95/05846(神経、ニューロン)、及びWO91/07491(皮膚、内皮)に記載されているものが含まれる。

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$Ｂ_1$($ＥＴＢ_1$)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ＰＲＯ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、テスト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。

心肥大アッセイにはいくつかある。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ら,「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ＳＤ)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$Ｆ_{2\alpha}$($ＰＧＦ_{2\alpha}$)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。種々の心肥大の潜在的インヒビターによる、$ＰＧＦ_{2\alpha}$又は$ＰＧＦ_{2\alpha}$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ついでテストする。

【００６９】

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肥大の阻害をテストすることである。この薬理学的モデルは、フルプロ

ステノール(ＰＧＦ$_{2\alpha}$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ＳＤ)に誘発された心肥大を阻害するＰＲＯポリペプチドの能力をテストするものである。心筋梗塞に誘発される病的な心肥大のあるラットにおいて、心筋内のＰＧＦ$_{2\alpha}$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ら， 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、心肥大の治療に有用である可能性がある。心肥大におけるＰＲＯポリペプチドの効力は、ＰＲＯ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(体重により正規化)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、圧力負荷心肥大アッセイである。インビボテストにおいて、テスト用動物の腹部大動脈の収縮による圧力負荷心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ＳＤ)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ら，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。

また他のインビボアッセイにおいて、心肥大、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、心肥大はＭＩを有するグループに存在することが示され、体重に対し心臓重量は１８％増加していることが明らかとなった。上掲のLai等。心肥大の候補ブロッカー、例えばＰＲＯ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。ＳＤラットを使用する、心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。

【００７０】

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ＰＲＯ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WO97/33551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、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。

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ら，Br．J．Cancer．48：689-696(1983)。

【００７１】

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フラグメント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。

乳癌の動物モデルは、Drebinら， 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ら，Cancer Research，54：4726-4728(1994)及びTooら，Cancer Research，55：681-684(1995)により記載されている。このモデルはAntiCancer,Inc.,(San Diego，California)から販売されている、いわゆる「METAMOUSE™」に基づく。

動物内で生じた腫瘍は除去され、インビトロで培養することができる。ついで、インビトロ培養からの細胞を動物に継代させる。このような腫瘍はさらなるテスト又は薬剤スクリーニングの目的で役立ちうる。あるいは、継代により得られた腫瘍は単離可能で、継代前細胞及び一又は複数の継代段階の後に単離された細胞のＲＮＡは、関心のある遺伝子の差次的発現用に分析される。このような継代技術は、任意の周知の腫瘍又は癌細胞系で行うことができる。

例えば、Ｍｅｔｈ Ａ、ＣＭＳ４、ＣＭＳ５、ＣＭＳ２１及びＷＥＨＩ-１６４はＢＡＬＢ／ｃ雌マウス(DeLeoら，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ら，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、１０ｘ１０$^{6}$から１０ｘ１０$^{7}$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１００μｌ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フラグメントを注射することで、正常なマウスに導入することができる。Zupiら，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。

【００７２】

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、これらの変化は形態計測とフローサイトメトリー分析

を組み合わせて、注意深く監視する必要がある。

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ＰＲＯ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ら, 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ら, Cell, 56：312-321(1989))；胚のエレクトロポレーション(Lo, Mol. Cell. Biol., 3：1803-1814(1983))；及び精子媒介性遺伝子移動が含まれる。Lavitranoら, 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。

本発明の目的において、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ら, 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技術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。

【００７３】

また、動物の胚性細胞に導入されたＰＲＯポリペプチドをコードする変更ゲノムＤＮＡと、ＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯ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、ＰＲＯ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態及びその病理的状態の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

ここで同定されたＰＲＯ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。

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。

【００７４】

ｉｉ．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ＰＲＯ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ＰＲＯＤＮＡ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。

【００７５】

ｉｉｉ．抗体結合性の研究

心臓血管、内皮及び血管形成アッセイに使用される内皮細胞又は他の細胞におけるＰＲＯポリペプチドの効果を阻害する抗-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)pp. 147-158 。

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

サンドイッチアッセイでは、検出される互いに異なる免疫原部分、又はエピト

ープ、又はタンパク質に結合可能な２つの抗体が使用される。サンドイッチアッセイにおいて、分析されるテスト用サンプルは、固体支持体に固定化された第１の抗体に結合し、その後、第２の抗体が分析物に結合し、よって不溶性の３部位複合体が形成される。例えば、米国特許第4,376,100号を参照されたい。第２の抗体は検出可能な部分で、それ自身がラベルされてもよく（直接サンドイッチアッセイ）、又は検出可能な部分でラベル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。

【００７６】

ｉｖ．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、ＰＲＯ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。

【００７７】

ｖ．　遺伝子治療

ここで、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチド、及びポリペプチジルアゴニスト及びアンタゴニストは、それらのペプチドを、しばしば遺伝子治療と呼ばれるインビボでの発現により本発明に従って用いてもよい。

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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドが必要とされている部位、すなわちＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドの合成部位、もし知られているならばＰＲＯ１７９、ＰＲ

Ｏ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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よる。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。

【００７８】

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、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４

６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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、ポリリシン、及びデンドリマーを用いることもできる。

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フラグメント、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．USA，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。

【００７９】

ｖｉ．　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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドをコードする遺伝子の用途に関する。ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドの検出は、心血管、内皮及び血管形成疾患、又は心血管、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ＰＲＯ１７９、ヒトＰＲＯ２３８、ヒトＰＲＯ３６４、ヒトＰＲＯ８４４、ヒトＰＲＯ８４６、ヒトＰＲＯ１７６０、ヒトＰＲＯ２０５、ヒトＰＲＯ３２１、ヒトＰＲＯ３３３、ヒトＰＲＯ８４０、ヒトＰＲＯ８７７、ヒトＰＲＯ８７８、ヒトＰＲＯ８７９、ヒトＰＲＯ８８２、ヒトＰＲＯ８８５又はヒトＰＲＯ８８７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ら，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、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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(point mutations)は、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドをコードする放射能標識されたＲＮＡ、又はＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

ＤＮＡ配列の相違に基づく遺伝子テストは、変性剤を用いるか用いないで、ゲル中のＤＮＡフラグメントの電気泳動移動性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フラグメントは、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フラグメントの移動は、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ら，Science，230：1242(1985)。

また特定の位置における配列変化はヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばＲＮアーゼ及びＳＩ保護、又は化学的切断方法、例えばCottonら， Proc．Natl．Acad．Sci．USA，85：4397-4401(1985)により明らかになる。

よって、特定のＤＮＡ配列の欠失はハイブリッド形成、ＲＮアーゼ保護、化学的切断、直接ＤＮＡ配列化、又は制限酵素、例えば制限フラグメント長のポリモルフィズム(ＲＦＬＰ)の使用、及びゲノムＤＮＡのサザンブロット等の方法により達成することができる。

【００８０】

ｖｉｉ．ＰＲＯ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。

ＰＲＯ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。ＰＲＯポリペプチドがシグナル配列を有している場合は、ｍＲＮＡは平滑筋細胞では少ないのに対して内皮細胞では高度に発現しており、このことはＰＲＯ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ＰＲＯ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-ＰＲＯ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。

ＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチドの量と相関関係がある。

【００８１】

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

体細胞ハイブリッドのＰＣＲマッピングは、特定の染色体に特定のＤＮＡを割り当てるための急速な手順である。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、サブ局部限定を、類似した方法で、大きなゲノムクローンのプール又は特定の染色体からの断片のパネルで達成することができる。同様に、その染色体へのマッピングに使用可能な他のマッピング方法には、インサイツハイブリッド形成、標識されたフローソート染色体を用いたプレスクリーニング、及び染色体特異性ｃＤＮＡライブラリ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。

中期染色体展開へのｃＤＮＡクローンの蛍光インサイツハイブリッド形成(ＦＩＳＨ)を、正確な染色体位置を一工程で提供するために使用することができる。この技術は５００又は６００塩基と短いｃＤＮＡで使用することができるが；２０００塩基対を越える長さのクローンは、単純な検出に対して十分なシグナル強さを有する独特の染色体位置に結合する見込みが高い。ＦＩＳＨには、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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)。

【００８２】

ｉｘ．　候補薬のスクリーニングアッセイ

本発明は、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドに類似する（アゴニスト）又はＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドと結合又は複合体形成する化合物、又は他にコード化ポリペプチドと他の細胞性タンパク質との相互作用を阻害する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、それを特に小分子候補薬の同定に適したものにする、化学的ライブラリ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、イムノアッセイ、及び細胞ベースのアッセイで、この分野で知られたものを含む種々の方式で実施される。

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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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、例えばミ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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、

ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

【００８３】

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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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［Fiels及びSong, Nature(London) 340, 245-246 (1989); Chien等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991))に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより監視することができる。酵母菌ＧＡＬ４などの多くの転写活性化剤は、２つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はＤＮＡ結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する

。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「２-ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、２つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がＧＡＬ４のＤＮＡ結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。ＧＡＬ１-ｌａｃＺリポーター遺伝子のＧＡＬ４活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したＧＡＬ４活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、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つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（MATCHMAKER(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。

ここで同定されたＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドをコードする遺伝子と細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験できる：通常は反応混合物は、遺伝子産物と細胞外又は細胞内成分を、それら２つの生成物が相互作用及び結合する条件下及び時間で含むように調製される。候補化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。さらに、プラシーボを第３の反応混合物に添加してポジティブコントロールを提供してもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は細胞外成分との結合（複合体形成）は上記のように監視される。試験化合物を含有する反応混合物ではなく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。

【００８４】

ＰＲＯポリペプチドが同時有糸分裂促進物質ＣｏｎＡの存在下で内皮細胞の増殖を刺激する能力を有している場合、スクリーニング方法の一例では、この能力の利点が利用される。特に、増殖アッセイにおいて、ヒト臍帯静脈内皮細胞を得

、９６-ウェル平底培養皿(Costar，Cambridge，MA)で培養し、細胞の増殖を容易にするのに適切な反応混合物を補い、該混合物はＣｏｎ-A(Calbiochem，La Jolla，CA)を含有している。Ｃｏｎ-A及びスクリーニングされる化合物を添加し、３７℃でインキュベートした後、培養物を$^{3-}$Hチミジンで標識し、ガラス繊維フィルター上に収集する(ｐｈＤ；Cambridge　Technology，Watertown，MA)。３媒体の平均$^{3-}$Hチミジン取り込み(cpm)を、液体シンチレーション計測器を使用して測定する(Beckman Instruments．Irvine．CA)。有意な$^{3-}$(H)チミジン混入率が内皮細胞の刺激において示された。

アンタゴニストを検定するために、上述したアッセイを行うが、このアッセイにおいて、ＰＲＯポリペプチドはスクリーニングされる化合物とともに添加してよく、ＰＲＯポリペプチド存在下での$^{3-}$(H)チミジン導入を阻害する化合物の能力が、化合物がＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、ＰＲＯポリペプチド及び膜結合ＰＲＯポリペプチドレセプター又は組換えレセプターを持つ潜在的アンタゴニストを、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。ＰＲＯポリペプチドは、放射活性等で標識でき、レセプターに結合したＰＲＯポリペプチド分子の数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパンニング及びＦＡＣＳソートにより同定できる。Coligan等，Current Protocols in Immun.，1(2)：Chapter 5 (1991)。好ましくは、発現クローニングが用いられ、ポリアデニル化ＲＮＡがＰＲＯポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このＲＮＡから生成されたｃＤＮＡライブラリがプールに分配され、ＣＯＳ細胞又はＰＲＯポリペプチド反応性でない他の細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を標識したＰＲＯポリペプチドに暴露する。ＰＲＯポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフィ分析を施す。ポジティブプールを同定し、相互作用サブプール化及び再スクリーニング工程を用いてサブプールを調製して再形質移入し、結果的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

【００８５】

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

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

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

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンとＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチドの作用を競合的に阻害するＰＲＯポリペプチドの変異形態であってもよい。

他の潜在的なＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯ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、ＰＲＯ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約－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。

【００８６】

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、ＰＲＯ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ＰＲＯリペプチドの正常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。

リボザイムは、ＲＮＡの特異的切断を触媒できる酵素的ＲＮＡ分子である。リボザイムは、相補的標的ＲＮＡへの配列特異的ハイブリッド形成、次いでヌクレ

オチド鎖切断的切断により作用する。潜在的ＲＮＡ標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4: 469-471 (1994)及びＰＣＴ公報、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。

【００８７】

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ＰＲＯ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、ＰＲＯ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。ＰＲＯポリペプチド又はアンタゴニストにより媒介される血管形成の増加は、虚血組織、心臓の側枝冠動脈、続いて冠動脈狭窄に有益である。アンタゴニストはこのようなポリペプチドの作用を阻害し、例えば傷の治癒又は胚線維症の間に、過度の結合組織の生成を制限するために使用される。これには急性心筋梗塞及び心不全が含まれる。

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

分子のアンタゴニストに対抗する場合、特定の指示に対し、分子それ自身又はそのアゴニストを使用するか否かの決定は、主として、分子が新血管新生、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、分子が血管形成を促進する場合は、そのアンタゴニストは血管形成の制限又は防止が所望されている疾患の治療に有用である。このような疾病の例には、血管腫瘍、例えば血管腫、腫瘍血管形成、網膜の新血管新生、糖尿病性網膜症又は時期尚早の幼児性網膜症又は黄斑変性及び増殖性硝子体網膜症に関連した脈絡膜、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、瘢痕組織過剰生成、例えば外科手術の後の形成されるケロイドのようなもの、心筋梗塞の後の線維症、又は胚線維症に関連した線維症障害が含まれる。

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

【００８８】

他方、分子が血管形成を刺激する場合、指示に対し、それ自体を所望する血管

形成、例えば末梢血管病、高血圧、血管炎、レーノー病及びレーノー現象、動脈瘤、及び動脈再狭窄、血栓静脈炎、リンパ管炎、リンパ浮腫、創傷治癒及び組織の修復、虚血再潅流傷害、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、例えばうっ血性心不全、及び骨粗鬆症等に使用される。

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

特定の型の病気は以下に記載され、ここでのＰＲＯポリペプチド又はその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提供される。アテローム性動脈硬化は、体液の蓄積、平滑筋細胞の増殖、及び動脈壁内の繊維組織の形成により、動脈内の厚みが増した脈管内膜にプラークが蓄積することにより特徴付けられる病気である。病気は、任意の器官において大、中及び小動脈を襲う。内皮及び血管平滑筋細胞機能の変化は、これらのプラークの蓄積及び緩和を調節する、重要な役割を担っていることが知られている。

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

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って、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。

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、子宮頸部及び腋か領域に生じる。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当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を害している。Griener等, Lymphology, 4: 140-144 (1971)。

【００８９】

ここでのＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストの他の用途は、成長及び／又は転移可能な腫瘍の血管新生に関与する腫瘍血管形成にある。このプロセスは新しい血管の成長に依存する。新生物及び腫瘍血管形成に係る関連した病状の例には、乳癌腫、肺癌腫、胃癌腫、食道癌腫、結腸直腸癌腫、肝臓癌腫、卵巣癌腫、テコーマ、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、カポジ肉腫、黒色腫、皮膚癌腫、血管腫、海面性血管腫、血管芽腫、膵臓癌腫、網膜癌腫、星状細胞腫、膠芽腫、シュワン細胞腫、乏突起膠細胞腫、髄芽腫、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)は年輩者の集団における、ひどい視覚損失に至る原因である。ＡＭＤの滲出形態は脈絡膜新血管新生及び網膜色素内皮細胞剥離により特徴付けられる。脈絡膜新血管新生が予後の動的低下に関連しているため、ＰＲＯ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。

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

またさらに、ＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは、他の組織、例えば器官(例えば、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。

【００９０】

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

さらに、ＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは歯周病の治療及び他の歯修復プロセスに使用することができる。このような薬剤は骨形成細胞を誘引し、骨形成細胞の成長を刺激し、又は骨形成細胞の原種の分化を誘発する環境で提

供される。ここでのＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは、血管が、骨の回転及び成長の調節において重要な役割を担っているため、骨粗鬆症又は骨関節症の、例えば骨及び／又は軟骨修復を刺激、又は炎症プロセスにより媒介される組織破壊(コラゲナーセ活性、破骨細胞等)のプロセス又は炎症をブロックすることによる治療に有用である。

ここでＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストにあるとされる組織再生活性の他の範疇は、腱／靱帯形成である。組織が通常形成されない環境での腱／靱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靱帯の裂け目、奇形、及びの腱又は靱帯の欠損の治癒に適用される。このような調製物は、腱又は靱帯組織へのダメージの予防、並びに腱又は靱帯の骨又は他の組織への固定の改善、及び腱又は靱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ＰＲＯ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／靱帯様組織形成は、先天的、外傷誘発性、又は他の由来による腱又は靱帯のたの欠損の修復に寄与し、また腱又は靱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-又は靱帯-形成細胞を誘引、腱-又は靱帯-形成細胞の成長を刺激、腱-又は靱帯-形成細胞原種の分化を誘発、又はイクスビボでの回復インビボでの組織修復効果における腱／靱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、及び他の腱又は靱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の含む。

【００９１】

ＰＲＯ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、死亡又は外傷に関与する中枢及び末梢神経系の病気及び神経障害、並びに機械的又は外傷的疾患の治療に有用である。特に、ＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは、末梢神経系の病気、例えば末梢神経損傷、末梢神経障害及び局所的神経障害、及び中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンティングドン病、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、ＰＲＯポリペプチド又はそれに対するアンタゴニストを使用しての治療が可能である。

虚血-再潅流傷害は他の徴候である。内皮細胞機能不全は虚血-再潅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。

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

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

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

上述した観点から、内皮細胞機能、増殖及び／又は形態を変更又はこれに衝撃を与えると示されている、ここで記載されたＰＲＯ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。

【００９２】

ｘｉ．投与プロコトール、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。

ＰＲＯ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、クエン酸炎、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™、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ™又はポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の非イオン性界面活性剤を含む。

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、舌下状錠剤、及び除放性製剤を含む。ＰＲＯ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。

【００９３】

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

インビボ投与に用いられるＰＲＯ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。ＰＲＯ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、ＰＲＯ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。ＰＲＯ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）ＰＲＯポリペプチド又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニスト；

ｂ）溶液中のポリペプチド又は他の分子の安定性を最大にする範囲内のｐＨ、好ましくは約４-８のｐＨを維持可能なバッファー；

ｃ）主として、撹拌誘発性集合体に対しポリペプチド又は分子を安定化させる洗浄剤／界面活性剤；

ｄ）等張剤；

ｅ）フェノール、ベンジルアルコール及びベンゼトニウムハロゲン化物、例えば塩化物の群から選択される防腐剤；及び

ｆ）水；

を含有し得る。

使用される洗浄剤が非イオン性であるならば、それは、例えばポリソルベート(例えば、POLYSORBATE™(TWEEN™)２０、８０等)、ポロキサマー(例えば、POLOXAMER™１８８等)であってよい。非イオン性界面活性剤を使用することにより、タンパク質の変性を引き起こすことなく、表面応力の剪断に調製物をさらすことができる。さらに、このような界面活性剤含有調製物は、エアゾール装置、例えば静脈投与、及びニードレスジェッ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、ＰＲＯ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、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール及びマンニトールが含まれる。これらの糖アルコールは、単独で、又は組合せて使用することもできる。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。

【００９４】

治療用ＰＲＯ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）。

また、ＰＲＯ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™（乳酸－グリコール酸コポリマ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。

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、凝集機構がチオージスルフィド交換による分子間Ｓ－Ｓ結合であることが分かったら、スルフヒドリル残基を変更し、酸性溶液から凍結乾燥し、水分量を調整し、適当な添加物を使用し、特定の重合体マトリクス化合物を開発することで安定性を保証することができる。

ＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチドを含む。ＰＲＯ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。

【００９５】

ＰＲＯ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、一般的な医学的状態、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。ＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチド、より好ましくは天然配列ヒトＰＲＯ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、ＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチドを投与することができる。

上記の指針では、有効投与量は、一般的に約０．００１から約１．０ｍｇ／ｋｇ、好ましくは約０．０１－１．０ｍｇ／ｋｇ、最も好ましくは約０．０１－０．１ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

成人の高血圧の治療におけ非経口用途では、注射の形態で、体重１ｋｇ当たり約０．０１から５０ｍｇ、好ましくは約０．０５から２０ｍｇ、最も好ましくは１から２０ｍｇのＰＲＯ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、ＰＲＯポリペプチドをベースとする分子を、好ましくは体重１ｋｇ当たり約５ｍｇから１ｇ、好ましくは約１０から１００ｍｇ、１日に１から３回投与する。内毒素汚染物質、安全レベルの最小量、例えば０．５ｎｇ／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 a

nd 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ＰＲＯ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。

【００９６】

ＰＲＯ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ＰＲＯ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学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。

ここで記載され、骨、軟骨、腱、又は靱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。

【００９７】

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の材料、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。

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。

【００９８】

ｘｉｉ．　組合せ治療

当問題となる疾患の防止又は治療におけるＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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、心肥大の治療のためには、ＰＲＯ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™及びMOXONODIN™；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-アスパラート-アンジオテンシンＩインヒビター(米国特許第5,773,415号)及びアンジオテンシンＩＩインヒビターの投与を組合せることができる。

高血圧に関連した心臓肥大の治療のためには、ＰＲＯポリペプチドを、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、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を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。

【００９９】

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、β-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；β-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、ＰＲＯ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-α又はＴＧＦ-β、ＩＧＦ、ＦＧＦ、及びＣＴＧＦが含まれる。

加えて、癌の治療に使用されるＰＲＯ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、ＰＲＯ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。

ＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチドと共に投与しない場合と同じ用量である。

【０１００】

ｘｉｉｉ．　製造品

上述した疾患の診断又は治療に有用なＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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つの容器及びラベルを具備する。適切な容器には、例えばボトル、バイアル、シリンジ及び試験管が含まれる。容器はガラス又はプラスチックのような種々の物質から形成できる。容器は、状態の診断又は治療に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針で穿孔可能なストッパーを具備する静脈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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストである。容器上又は添付されるラベルには、組成物が選択した状態の診断又は治療に使用されることが示されている。この

製造品は、製薬的に許容可能なバッファー、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。

【０１０１】

Ｃ．　抗体

本発明の多くの有用な候補薬のいくつかは、ここで同定された遺伝子の生成、又は遺伝子生成物を阻害、及び／又は遺伝子生成物の活性を低減する抗体及び抗体フラグメントである。

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、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

【０１０２】

ｉｉ．　モノクローナル抗体

あるいは、抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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、及びヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髄腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、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。

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髄腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやバージニア州マナサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒト異種骨髄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、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドに対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(ＲＩＡ)や酵素結合免疫測定法(ＥＬＩＳＡ)等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキャッチャード分析法によって測定することができる。

【０１０３】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを制限希釈工程によりサブクローニングし、標準的な方法で成長させることができる。Goding, 上掲。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地及びＲＰＭＩ-１６４０倍地が含まれる。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の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。

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

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

一価抗体の調製にはインビトロ法がまた適している。抗体の消化による、そのフラグメント、特にＦａｂフラグメントの生成は、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。

【０１０４】

ｉｉｉ．　ヒト及びヒト化抗体

抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７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フラグメント(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Ｆｖフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたＣＤＲもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのＣＤＲ領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのＦＲ領域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)。

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒトを源にする一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯動物のＣＤＲ又はＣＤＲ配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンター(winter)及び共同研究者［Jones等, Nature, 321:522-525 (1986)；Riechmann等, Nature, 332:323-327 (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。

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。

【０１０５】

ｉｖ．　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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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.,10:3655-3656 (1991)に開示されている。

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、ＣＨ２及びＣＨ３領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(ＣＨ１)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするＤＮＡ、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作成するための更なる詳細については、例えばSuresh等, Methods in Enzymology, 121:210(1986)を参照されたい。

【０１０６】

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ＨＩＶ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4,6767,980号に開示されているものが含まれる。

ｖｉ． 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Ｆｃ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（ＡＤＣＣ）を有しうる。Caron等, Ｊ. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, Ｂ. Ｊ. Ｉmmunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体はまた、Wolff等, Cancer research 53: 2560-2565 (1993)に記載されたような異種二官能性架橋を用いても調製しうる。あるいは、抗体は、２つの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。

【０１０７】

ｖｉｉ.　免疫抱合体

本発明はまた、化学治療薬、毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はそのフラグメント）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）に抱合された抗体を含む免疫抱合体にも関する。

このような免疫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フラグメントは、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、（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 oficinalis)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。

抗体及び細胞毒性薬の抱合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオール)プロピオネート（ＳＰＤＰ）、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レート等）、アルデヒド（グルタルアルデヒド等）、ビス-アジド化合物（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。

ｖｉｉｉ．　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Ｆ

ａｂ’フラグメントは、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。

【０１０８】

ｉｘ．　抗体の製薬組成物

ここで同定されるＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドが細胞内であり、全抗体が阻害剤として用いられる場合、内在化抗体が好ましい。しかし、リポフェクション又はリポソームも抗体、又は抗体フラグメントを細胞に導入するのに使用できる。抗体フラグメントが用いられる場合、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フラグメントが好ましい。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)参照。

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に１以上の活性化合物、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、細胞毒性薬、サイトカイン又は成長阻害剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により

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

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

持続放出製剤を調製してもよい。持続放出製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。持続放出性マトリクスの例は、ポリエステルヒドロゲル（例えば、ポリ(２-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、Ｌ-グルタミン酸及びγ-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ュ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。

【０１０９】

ｘ．　抗体を使用する治療方法

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、

ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドに対する抗体を上述した種々の心血管、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、ボーラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入経路などにより投与される。抗体の静脈内投与が好ましい。

他の治療的養生法を例えば本発明の抗体の投与と組み合わせてもよい。例えば、抗体で癌の治療をする場合は、このような抗体で治療される患者は放射線治療を受けてもよい。あるいは、又はそれに加えて、患者に化学治療薬を投与してもよい。このような化学治療薬の調製法及び用量スケジュールは、製造者の指示に従って使用されるか、熟練した実務者により経験的に決定される。そのような化学治療に対する調製法及び用量スケジュールはまたChemotherapy Service M.C. Perry編, (Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992)にも記載されている。化学治療薬は、抗体の投与に先立って、又は続いて投与してもよく、あるいはそれらと同時に投与してもよい。抗体は、タモキシフェン又はEVIST™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。

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。

【０１１０】

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-ＰＲＯ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、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WO91/01753)。

補助剤はその有効性に応じて変わり、便宜的な方式でスクリーニングされるマトリクスにより、腫瘍における影響力と比較することが望ましい。抗-ＰＲＯ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-ＰＲＯポリペプチド抗体は、ＴＮＦ、場合によっては補助剤と共に投与される。固形腫瘍が、四肢又は一般的な循環器からの単離が可能な他の位置で見出される例では、ここに記載される治療薬は単離された腫瘍又は器官に投与される。他の実施態様において、ＦＧＦ又はＰＤＧＦアンタゴニスト、例えば抗-ＦＧＦ又は抗-ＰＤＧＦ中和剤は、抗-ＰＲＯポリペプチド抗体と共に患者に投与される。抗-ＰＲＯ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。

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

は一連の治療に渡って適切に投与される。

例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約１μｇ／ｋｇから５０ｍｇ／ｋｇ（例えば、０．１－２０ｍｇ／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、上記の要因に応じて、約１μｇ／ｋｇから１００ｍｇ／ｋｇ又はそれ以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。この治療の進行は、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。

【０１１１】

ｘｉ．　製造品

また、抗体を収容する容器とラベルを含む製造品を提供する。このような製造品は上述しており、ここで活性剤は抗-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７抗体である。

ｘｉｉ．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、ＰＲＯ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、ＰＲＯ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、ＰＲＯ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ツ検出は、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、インサイツ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。

【０１１２】

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

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

（実施例）

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ＡＴＣＣ登録番号により以下の実施例及び明細書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、ＶＡである。特に記さない限り、本発明は上記及び以下の教科書に記載されたもののような組換えＤＮＡ技術の標準的な手法を用いた：上掲のSambrook等; Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989) ; Innis等, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc.; N.Y.., 1990); Harlow等, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor 1988); Gait, Oligonucleotide Synthesis (IRL Press, Oxford, 1984) ; Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan等, Current Protocols in Immunology, 1991。

【０１１３】

実施例１

新規なポリペプチド及びそれをコードするｃＤＮＡを同定するための細胞外ドメイン相同性スクリーニング

Swiss-Prot公的データベースからの約９５０の既知の分泌タンパク質からの細胞外ドメイン（ＥＣＤ）配列（もしあれば、分泌シグナル配列を含む）を、ＥＳ

Ｔデータベースの検索に使用した。ＥＳＴデータベースは、公的データベース（例えば、GenBank）及び企業のデータベース（例えば、LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む。検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST-2（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて、ＥＣＤタンパク質配列のＥＳＴ配列の６フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア７０（９０の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, WA）で集団化してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。

この細胞外ドメイン相同性スクリーニングを用いて、phrapを用いて他の同定されたＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。さらに、得られたコンセンサスＤＮＡ配列を、しばしば（常にではない）BLAST又はBLAST-2及びphrapの繰り返しサイクルを用いて伸長し、コンセンサス配列を上で議論したＥＳＴ配列の供給源を用いて可能な限り伸長させた。

上記のように得られたコンセンサス配列に基づいて、次いでオリゴヌクレオチドを合成し、ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及びＰＲＯポリペプチドの全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして用いるために使用した。正方向及び逆方向ＰＣＲプライマーは一般的に２０から３０ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約１００－１０００ｂｐ長のＰＣＲ産物を与えるために設計される。プローブ配列は、典型的に４０－５５ｂｐ長である。幾つかの場合には、コンセンサス配列が約１－１．５ｋｂｐより大きいときに付加的なオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを、Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology, のように、ＰＣＲプライマー対でのＰＣＲによりスクリーニングした。ポジティブライブラリを、次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて対象とする遺伝子をコードするクローンの単離するのに使用した。

ｃＤＮＡクローンの単離に用いたｃＤＮＡライブラリは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。ｃＤ

ＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、平滑末端でＳａｌＩへミキナーゼアダプターに結合させ、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター（ｐＲＫ５Ｂ又はｐＲＫ５Ｄ等；ｐＲＫ５ＢはＳｆｉＩ部位を含まないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等，Science，253：1278-1280（1991)参照）に、独特のＸｈｏＩ及びＮｏｔＩ部位において、所定の方向でクローニングした。

【０１１４】

実施例２

アミラーゼスクリーニングによるｃＤＮＡクローンの単離

１．オリゴｄＴプライムｃＤＮＡライブラリの調製

ｍＲＮＡを対象とするヒト組織から、Invitrogen，San Diego，CAからの試薬及びプロトコールを用いて単離した（Fast Track 2）。このＲＮＡを、Life Technologies，Gaithersburg，MD（Super Script Plasmid System)からの試薬及びプロトコールを用いるベクターｐＲＫ５ＤにおけるオリゴｄＴプライムしたｃＤＮＡの生成に使用した。この方法において、二本鎖ｃＤＮＡは１０００ｂｐを越えるサイズ分類し、ＳａｌＩ／ＮｏｔＩ結合ｃＤＮＡをＸｈｏＩ／ＮｏｔＩ切断ベクターにクローニングした。ｐＲＫ５Ｄを、ｓｐ６転写開始部位、それに続くＳｆｉＩ制限酵素部位、さらにＸｈｏＩ／ＮｏｔＩｃＤＮＡクローニング部位を持つベクターにクローニングした。

２．ランダムプライムｃＤＮＡライブラリの調製

一次ｃＤＮＡクローンの５’末端を好ましく表現するために二次ｃＤＮＡライブラリを作成した。Ｓｐ６ＲＮＡを（上記の）一次ライブラリから生成し、このＲＮＡを、ベクターｐＳＳＴ-AMY．０におけるLife Technologies（上で参照したSuper Script Plasmid System)からの試薬及びプロトコールを用いたランダムプライムしたｃＤＮＡライブラリの生成に使用した。この方法において、二本鎖ｃＤＮＡを５００－１０００ｂｐにサイズ分類し、平滑末端でＮｏｔＩアダプターに結合させ、ＳｆｉＩ部位で切断し、そしてＳｆｉＩ／ＮｏｔＩ切断ベクターにクローニングした。ｐＳＳＴ-AMY．０は、ｃＤＮＡクローニング部位の前に酵母アルコールデヒドロゲナーゼプロモータ、及びクローニング部位の後に

マウスアミラーゼ配列（分泌シグナルを持たない成熟配列）に次いで酵母アルコールデヒドロゲナーゼ転写終結区を有するクローニングベクターである。即ち、アミラーゼ配列でフレームに融合するこのベクターにクローニングされたｃＤＮＡは、適当に形質移入された酵母コロニーからのアミラーゼの分泌を導くであろう。

【０１１５】

３．形質転換及び検出

上記２パラグラフに記載したライブラリからのＤＮＡを氷上で冷却し、それにエレクトロコンピテントＤＨ１０Ｂ細菌（Life Technoligies、２０ｍｌ）を添加した。細菌及びベクターの混合物は、次いで製造者に推奨されているように電気穿孔した。次いで、ＳＯＣ培地（Life Technplogies、１ｍｌ）を添加し、この混合物を３７℃で３０分間インキュベートした。形質転換体は、次いでアンピシリンを含む２０標準１５０ｍｍＬＢプレートに蒔き、１６時間インキュベートした（３７℃）。ポジティブコロニーをプレートから廃棄し、細菌ペレットから標準的な方法、例えばＣｓＣｌ-勾配を用いてＤＮＡを単離した。精製ＤＮＡは、次いで以下の酵母プロトコールにのせた。

酵母方法は３つの範疇に分けられる：（１）酵母のプラスミド／ｃＤＮＡ結合ベクターでの形質転換；（２）アミラーゼを分泌する酵母クローンの検出及び単離；及び（３）酵母コロニーから直接的な挿入物のＰＣＲ増幅及び配列決定及びさらなる分析のためのＤＮＡの精製。

用いた酵母菌株はＨＤ５６-５Ａ（ATCC-90785）であった。この株は以下の遺伝子型：ＭＡＴアルファ、ｕｒａ３-５２、ｌｅｕ２-３、ｌｅｕ２-１１２、ｈｉｓ３-１１、ｈｉｓ３-１５、$MAL^{+}$、$SUC^{+}$、$GAL^{+}$を有する。好ましくは、不完全な翻訳後経路を持つ酵母変異体を用いることができる。このような変異体は、ｓｅｃ７１、ｓｅｃ７２、ｓｅｃ６２に転位不全対立遺伝子を持つが、切断されたｓｅｃ７１が最も好ましい。あるいは、これらの遺伝子の正常な操作を阻害するアンタゴニスト（アンチセンスヌクレオチド及び／又はリガンドを含む）、この翻訳後経路に含まれる他のタンパク質（例えば、ＳＥＣ６１ｐ、ＳＥＣ７２ｐ、ＳＥＣ６２ｐ、ＳＥＣ６３ｐ、ＴＤＪ１ｐ又はＳＳＡ１ｐ-４ｐ）

又はこれらのタンパク質の複合体形成も、アミラーゼ発現酵母と組み合わせて好ましく用いられる。

形質転換は、Gietz等, Nucl. Acid. Res., 20: 1425 (1992)に概略が記されたプロトコールに基づいて実施された。形質転換細胞は、次いで寒天からＹＥＰＤ複合培地ブロス（１００ｍｌ）に播種し、３０℃で終夜成長させた。ＹＥＰＤブロスは、Kaiser等, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 207 (1994)に記載されているように調製した。終夜培地は、次いで新鮮なＹＥＰＤブロス（５００ｍｌ）中におよそ２ｘ１０$^{6}$細胞／ｍｌ（約$OD_{600}$＝０．１）に希釈し、１ｘ１０$^{7}$細胞／ｍｌ（約$OD_{600}$＝０．４－０．５）まで再成長させた。

【０１１６】

次いで細胞を収穫し、5,000rpmで５分間のSorval GS3 ローターのＧＳ３ローターボトルに移し、上清を捨て、次いで無菌水に再懸濁することにより形質転換のために調製し、そして５０ｍｌのファルコン管内で、Beckman GS-6KR遠心機において3,500rpmで再度遠心分離した。上清を捨て、細胞をＬｉＡｃ／ＴＥ（10ml, 10mMのﾄﾘｽ-HCl, 1mMのEDTA　pH7.5, 100mMの$Li_2OOCCH_3$）で続けて洗浄し、ＬｉＡｃ／ＴＥ（2.5ml）中に再懸濁させた。

形質転換は、マイクロチューブ内で、調製した細胞（100μl）を新鮮な変性一本鎖サケ精子ＤＮＡ（Lofstrand Labs, Gaitherburg, MD）及び形質転換ＤＮＡ（1μg. vol.＜10μl）と混合することにより起こした。混合物はボルテックスにより簡単に混合し、次いで40%ＰＥＧ／ＴＥ（600μl, 40%のポリエチレングリコール-４０００, 10mMのﾄﾘｽ-HCl, 1mMのEDTA, 100mMの$Li_2OOCCH_3$, pH 7.5）を添加した。この混合物を緩く撹拌し、３０℃で撹拌しながら３０分間インキュベートした。次いで細胞に４２℃で１５分間熱衝撃を与え、反応容器をミクロチューブ内で12,000rpmで5-10秒間遠心分離し、デカント及びＴＥ（500μl, 10mMのﾄﾘｽ-HCl, 1mMのEDTA pH 7.5）への再懸濁に次いで遠心分離した。次いで、細胞をＴＥ（1ml）中に希釈し、アリコート（200μl）を150mm成長プレート（ＶＷＲ）に予め調製した選択培地に拡げた。

あるいは、複数の少量反応ではなく、形質転換を１回の大規模反応で実施した

が、試薬の量はしかるべくスケールアップした。

用いた選択培地は、Kaiser等, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor press, Cold Spring Harbor, NY, p. 208-210 (1994)に記載されているように調製したウラシルを欠く合成完全デキストロース寒天（ＳＣＤ-Ｕｒａ）であった。形質転換体は３０℃で２－３日成長させた。

アミラーゼを分泌するコロニーの検出は、選択成長培地における赤色デンプンの包含により実施した。Biely等, Anal. Biochem., 172: 176-179 (1988)に記載された方法に従って、デンプンを赤色染料（反応性 Red-120, Sigma）に結合させた。結合したデンプンをＳＣＤ-Ｕｒａ寒天プレートに最終濃度0.15%（w/v）で導入し、リン酸カリウムでｐＨ７．０に緩衝した（最終濃度50-100mM）。

ポジティブコロニーを拾って新鮮な選択培地（150mmプレート）に画線し、良好に単離され同定可能な単一コロニーを得た。アミラーゼ分泌についてポジティブな良好に単離されたコロニーは、緩衝ＳＣＤ-Ｕｒａ寒天への赤色団分の直接導入により検出した。ポジティブコロニーは、デンプンを分解して、ポジティブコロニーの周囲に直接目視できる暈を形成する能力により決定した。

【０１１７】

４．ＰＣＲ増幅によるＤＮＡの単離

ポジティブコロニーが単離された場合、その一部を楊枝で拾い、９６ウェルプレートにおいて無菌水（30μl）に希釈した。この時点で、ポジティブコロニーは凍結して次の分析のために保存するか、即座に増幅するかのいずれかである。細胞のアリコート（5μl）を、0.5μlのKlentaq（Clontech, Palo Alto, CA）; 4.0μlの10mM dNTP（Perkin Elmer-Cetus）; 2.5μlのKentaqバッファー(Clontech); 0.25μlの正方向オリゴ１；0.25μlの逆方向オリゴ２；12.5μlの蒸留水を含有する25μl容量におけるＰＣＲ反応のテンプレートとして使用した。正方向オリゴヌクレオチド１の配列は：

5'-TGTAAAACGACGGCCAGTTAAATAGACCTGCAATTATTAATCT-3'

（配列番号：３３）であった。

逆方向オリゴヌクレオチド２の配列は：

5'-CAGGAAACAGCTATGACCACCTGCACACCTGCAAATCCATT-3'

（配列番号：３４）であった。

次いで、ＰＣＲは以下の通り実施した：

| | | |
|---|---|---|
| ａ． | 変性 | 92℃、5分間 |
| ｂ．次の３サイクル： | 変性 | 92℃、30秒間 |
| | アニール | 59℃、30秒間 |
| | 伸長 | 72℃、60秒間 |
| ｃ．次の３サイクル： | 変性 | 92℃、30秒間 |
| | アニール | 57℃、30秒間 |
| | 伸長 | 72℃、60秒間 |
| ｄ．次の２５サイクル： | 変性 | 92℃、30秒間 |
| | アニール | 55℃、30秒間 |
| | 伸長 | 72℃、60秒間 |
| ｅ． | 保持 | 4℃ |

下線を施した領域は、各々ＡＤＨプロモーター領域及びアミラーゼ領域にアニーリングされ、挿入物が存在しない場合はベクターｐＳＳＴ-AMY．０からの３０７ｂｐ領域を増幅する。典型的には、これらのオリゴヌクレオチドの５’末端の最初の１８ヌクレオチドは、配列プライマーのアニーリング部位を含んでいた。即ち、空のベクターからのＰＣＲ反応の全生成物は３４３ｂｐであった。しかしながら、シグナル配列融合ｃＤＮＡは、かなり長いヌクレオチド配列をもたらした。

ＰＣＲに続いて、反応のアリコート（5μl）を、上掲のSambrook等に記載されたように1%アガロースゲル中でトリス-ボレート-ＥＤＴＡ（ＴＢＥ）緩衝系を用いたアガロースゲル電気泳動により試験した。４００ｂｐより大きな単一で強いＰＣＲ産物をもたらすクローンを、96 Qiaquick PCR 清浄化カラム（Qiagen Inc., Chatsworth, CA）での精製の後にＤＮＡ配列によりさらに分析した。

【０１１８】

実施例３

シグナルアルゴリズム分析を用いたｃＤＮＡクローンの単離

種々のポリペプチド-コード化核酸配列は、ジェネンテク，インク（South San

Francisco, CA）によって開発された独自の配列発見アルゴリズムを、公的（例えば、GenBank）及び／又は私的（LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA）データベースからのＥＳＴｓ並びに集団化及び構築されたＥＳＴ断片に適用することにより同定した。シグナル配列アルゴリズムは、考慮している配列又は配列断片の５'-末端の第１の、場合によっては第２のメチオニンコドン（ＡＴＧ）を取り囲むＤＮＡヌクレオチドの性質に基づく分泌シグナルスコアを計算する。第１のＡＴＧに続くヌクレオチドは、停止コドンを持たない少なくとも３５の不明瞭でないアミノ酸をコードしなければならない。第１のＡＴＧが必要なアミノ酸を有する場合、第２のものは試験しない。何れも要件を満たさない場合、候補配列にスコアをつけなかった。ＥＳＴ配列が真正のシグナル配列を含むか否かを決定するために、ＡＴＧコドンを取り囲むＤＮＡ及び対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られた７つのセンサー（評価パラメータ）の組を用いてスコアをつけた。このアルゴリズムの使用により、多くのポリペプチド-コード化核酸配列の同定がなされた。

【０１１９】

実施例４

ヒトＰＲＯ１７９をコードするｃＤＮＡクローンの単離

ｃＤＮＡは上記実施例２に記載したようなスクリーニングで単離された。上記スクリーニングにおいて単離されたｃＤＮＡ配列は、BLAST及びFastA配列アラインメントにより、アンジオポエチン(angiopoietin)タンパク質をコードするヌクレオチド配列と配列相同性を有することがわかった。このｃＤＮＡ配列を、ここでＤＮＡ１００２８及び／又はＤＮＡ２５２５０と命名する。

配列相同性に基づいて、ＤＮＡ１００２８分子の配列からプローブを調製し、上記実施例２のパラグラフ１に記載したように調製したヒト胎児肝臓ライブラリ（LIB6）のスクリーニングに使用した。クローニングベクターはｐＲＫ５Ｂであり（ｐＲＫ５ＢはＳｆｉＩ部位を含まないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991)参照）、ｃＤＮＡサイズカットは２８００ｂｐ未満であった。

上記に記載したようにして単離されたクローンのＤＮＡ配列は、ＰＲＯ１７９

の全長ＤＮＡ配列とＰＲＯ１７９の誘導されたタンパク質配列を提供した。ＤＮＡ１６４５１-１３８８の完全長ヌクレオチド配列はＦｉｇ１（配列番号：１）に示される。クローンＤＮＡ１６４５１-１３８８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３７－３９に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１４１７－１４１９に停止シグナルを持つ（Ｆｉｇ１）。予測されるポリペプチド前駆体は４６０アミノ酸長であり(Ｆｉｇ２、配列番号：２)、Ｆｉｇ２に示される全長ＰＲＯ１７９タンパク質は、約５３,６３７ダルトンの算定分子量及び約６．６１の見積もりｐＩを持つ。

Ｆｉｇ２（配列番号：２）に示した全長ＰＲＯ１７９配列の分析により、Ｆｉｇ２に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。全長ＰＲＯ１７９配列(Ｆｉｇ２、配列番号２)の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１から約アミノ酸１６のシグナルペプチド；約アミノ酸１２０から約アミノ酸１４２及び約アミノ酸１２７から約アミノ酸１４９のロイシンジッパーパターン；約アミノ酸２３から約アミノ酸２７、約アミノ酸１５から約アミノ酸１１９、約アミノ酸２９６から約アミノ酸３００、及び約アミノ酸３５７から約アミノ酸３６１のN-グリコシル化部位；及び約アミノ酸２７１から約アミノ酸３１０、約アミノ酸３１２から約アミノ酸３２２、約アミノ酸３３１から約アミノ酸３６９、及び約アミノ酸３９３から約アミノ酸４２４のフィブリノーゲンβ及びγ鎖C末端ドメインである。

クローンＤＮＡ１６４５１－１３８８は１９９８年4月１４日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９７７６が付与された。配列に関して、挿入したクローンは正確な配列を含み、ここで提供された配列は既知の配列決定の技術に基づくことが理解される。

全長ＰＲＯ１７９配列のアミノ酸配列の分析は、それがアンジオポエチンファミリーのタンパク質と有意な類似性を有し、よってＰＲＯ１７９が新規なアンジオポエチンファミリーのメンバーであることを示唆している。より詳細には、Dayhoffデータベース（ﾊﾞｰｼﾞｮﾝ35.45 Swiss Prot 35）の分析により、ＰＲＯ１７９アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との有意な相同性が明らかになった：AF004

326_1，P_R94605，HSU83508_1，P_R94603，P_R94317，AF025818_1，HSY16132_1，P_R65760，I37391及びHUMRSC192_1。

【０１２０】

実施例５

ヒトＰＲＯ２３８をコードするｃＤＮＡクローンの単離

上記実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴに対してコンセンサスＤＮＡ配列を組み立てた。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ３０９０８と命名する。ＤＮＡ３０９０８コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ２３８の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブはコンセンサスＤＮＡ３０９０８配列から作成された。

全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上掲のAusubel等，Current Protocols in Molecular Biologyに従って、ＰＣＲプライマー対でのＰＣＲ増幅によりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いたＰＲＯ２３８遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

ＰＣＲプライマー（正及び逆）を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー１：

5'-GGTGCTAAACTGGTGCTCTGTGGC-3'(配列番号：３５)

正方向ＰＣＲプライマー２：

5'-CAGGGCAAGA TGAGCATTCC-3'(配列番号：３６)

逆方向ＰＣＲプライマー：

5'-TCATACTGTTCCATCTCGGCACGC-3'(配列番号：３７)

ハイブリッド形成プローブ：

5'-AATGGTGGGGCCCTAGAAGAGCTCATCAGAGAACTCACCGCTTCTCATGC-3'(配列番号：３８)

ｃＤＮＡライブライリの作成のためのＲＮＡはヒト胎児肝臓組織から単離した。ｃＤＮＡクローンを単離するために用いたｃＤＮＡライブラリは、Invitrogen

, San Diego, CA からのもの等の市販試薬を用いて標準的方法によって形成した。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、ＳａｌＩヘミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター（ｐＲＫＢ又はｐＲＫＤ等；ｐＲＫ５Ｂは、ＳｆｉＩ部位を持たないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991)を参照されたい）に独特のＸｈｏｌ及びＮｏｔＩ部位においてクローン化した。

上述のようにして単離されたクローンのＤＮＡ配列決定により、全長ＰＲＯ２３８に対する全長ＤＮＡ配列[ここでＤＮＡ３５６００-１１６２と命名](Ｆｉｇ３、配列番号：３)及びそのＰＲＯ２３８に対する誘導タンパク質配列が得られた。

ＤＮＡ３５６００－１１６２の全ヌクレオチド配列をＦｉｇ３（配列番号：３）に示す。クローンＤＮＡ３５６００－１１６２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１３４－１３６に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１０６４－１０６６の見かけの停止コドンを持つ(Ｆｉｇ３)。予測されるポリペプチド前駆体は３１０アミノ酸長であり(Ｆｉｇ４、配列番号：４)、約３３,５２４ダルトンの算定分子量及び約９．５５の見積もりｐＩを持つ。

Ｆｉｇ４（配列番号：４）に示した全長ＰＲＯ２３８配列の分析により、Ｆｉｇ４に示されるような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。全長ＰＲＯ２３８ポリペプチドの分析により(Ｆｉｇ４、配列番号：４)、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１から約アミノ酸２１のシグナル配列；約アミノ酸１０２から約アミノ酸１１９及び約アミノ酸２７８から約アミノ酸２９２の膜貫通ドメイン；約アミノ酸２２８から約アミノ酸２３２のN-グリコシル化部位；約アミノ酸４７から約アミノ酸５１のグリコサミノグリカン付着部位；約アミノ酸１４５から約アミノ酸１５３のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸４４から約アミノ酸５０、約アミノ酸１０５から約アミノ酸１１１、約アミノ酸２３８から約アミノ酸２４４、約アミノ酸２４２から約アミノ酸２

４８、及び約アミノ酸２９１から約アミノ酸２９７のN-ミリストイル化部位；約アミノ酸２６５から約アミノ酸２６９のアミド化部位；及び約アミノ酸６から約アミノ酸１７の原核生物膜離歩タンパク質脂質付着部位である。クローンＤＮＡ３５６００－１１６２は１９９７年１０月１６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９３７０が付与された。

全長ＰＲＯ２３８ポリペプチドのアミノ酸配列の分析により、その部分が還元酵素、特に酸化還元酵素と有意な相同性を持つことが示唆され、それによってＰＲＯ２３８が新規な還元酵素でありうることが示された。

【０１２１】

実施例６

ヒトＰＲＯ３６４をコードするｃＤＮＡクローンの単離

発現配列タグ（ＥＳＴ）ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を検索し、腫瘍壊死因子レセプター（ＴＮＦＲ）ファミリーのポリペプチドのメンバーと相同性を示すポリペプチドをコードしたＥＳＴ（Incyte EST no. 3003460）を同定した。

BLAST（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）及び「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）の繰り返しサイクルを用いてIncyte EST no. 3003460及び他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。コンセンサス配列を、ここで「<consen01>」と命名し、またここでＤＮＡ４４８２５とも呼ぶ。

ＤＮＡ４４８２５及び「<consen01>」コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ３６４の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドプローブを合成した。正方向及び逆方向ＰＣＲプライマーは一般的に２０から３０ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約１００－１０００ｂｐ長のＰＣＲ産物を与えるように設計される。プローブ配列は典型的には４０－５５ｂｐ長である。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上掲のAusubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、ＰＣＲプライマー対でのＰＣＲ増幅に

よりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いた興味ある遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

用いたオリゴヌクレオチド配列は以下の通り：

正方向ＰＣＲプライマー（４４８２５.ｆ１）：

5'-CACAGCACGGGGCGATGGG-3'（配列番号：３９）

正方向ＰＣＲプライマー（４４８２５.ｆ２）：

5'-GCTCTGCGTTCTGCTCTG-3'（配列番号：４０）

正方向ＰＣＲプライマー（４４８２５.ＧＩＴＲ.ｆ）：

5'-GGCACAGCACGGGGCGATGGGCGCGTTT-3'（配列番号：４１）

逆方向ＰＣＲプライマー（４４８２５.ｒ１）：

5'-CTGGTCACTGCCACCTTCCTGCAC-3'（配列番号：４２）

逆方向ＰＣＲプライマー（４４８２５.ｒ２）：

5'-CGCTGACCCAGGCTGAG-3'（配列番号：４３）

正方向ＰＣＲプライマー（４４８２５.ＧＩＴＲ.ｒ）：

5'-GAAGGTCCCCGAGGCACAGTCGATACA-3'（配列番号：４４）

さらに、ＤＮＡ４４８２５コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリッド形成プローブ（４４８２５.ｐ１）：

5'-GAGGAGTGCTGTTCCGAGTGGGACTGCATGTGTGTCCAGC-3'（配列番号：４５）

ハイブリッド形成プローブ（４４８２５.ＧＩＴＲ.ｐ）：

5'-AGCCTGGGTCAGCGCCCCACCGGGGGTCCCGGGTGCGGCC-3'（配列番号：４６）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ３６４遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト骨髄組織から単離した。ｃＤＮＡクローンを単離するために用いたｃＤＮＡライブラリは、Invitrogen, San

Diego, CA からのもの等の市販試薬を用いて標準的方法によって形成した。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、ＳａｌＩヘミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター（ｐＲＫＢ又はｐＲＫＤ等；ｐＲＫ５Ｄは、ＳｆｉＩ部位を持たないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991)を参照されたい）に独特のＸｈｏｌ及びＮｏｔＩ部位においてクローン化した。

ｃＤＮＡクローンは同定され、完全に配列決定された。ＤＮＡ４７３６５－１２０６の完全長ヌクレオチド配列をＦｉｇ５（配列番号：５）に示す。クローンＤＮＡ４７３６５－１２０６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１２１－１２３に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置８４４－８４６に停止コドンを持つ（Ｆｉｇ５；配列番号：５）。予測されるポリペプチド前駆体は２４１アミノ酸長であり、約２６,０００ダルトンの算定分子量及び約６．３４の見積もりｐＩを持つ。全長ＰＲＯ３６４タンパク質をＦｉｇ６（配列番号：６）に示す。

【０１２２】

Ｆｉｇ６（配列番号：６）に示した全長ＰＲＯ３６４配列の分析により、Ｆｉｇ６に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。全長ＰＲＯ３６４配列（Ｆｉｇ６；配列番号：６）の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１から約アミノ酸２５のシグナルペプチド；約アミノ酸１６２からアミノ酸１８０の膜貫通ドメイン；約アミノ酸１４６から約アミノ酸１５０のN-グリコシル化部位；約アミノ酸5から約アミノ酸１１、約アミノ酸8から約アミノ酸１４、約アミノ酸２５から約アミノ酸３１、約アミノ酸３０から約アミノ酸３６、約アミノ酸３３から約アミノ酸３９、約アミノ酸１１８から約アミノ酸１２４、約アミノ酸１２２から約アミノ酸１２８、約アミノ酸１５６から約アミノ酸１６２のN-ミリストイル化部位；約アミノ酸１６６から約アミノ酸１７７の原核生物膜タンパク脂質結合部位；及び約アミノ酸１７１から約アミノ酸１９３のロイシンジッパーパターン。

クローンＤＮＡ４７３６５－１２０６は１９９７年１１月７日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９４３６が付与された。

全長ＰＲＯ３６４ポリペプチドのアミノ酸配列の分析は、その一部が腫瘍壊死因子レセプターファミリーのメンバーと有意な相同性を有することを示唆し、よってＰＲＯ３６４が腫瘍壊死因子レセプターファミリーの新規なメンバーであることを示している。ＰＲＯ３６４の細胞内ドメインはＴＲＡＦ２結合に必要であることが示されたＣＤ３０受容体の最小ドメインと同様のモチーフ(アミノ酸２０７-２１４の領域にある)を含み、またそれはＴＮＦＲ２の中に存在する。ＴＮＦＲファミリーに特徴的な３つの見かけの細胞外システインの豊富なドメインがあり(Naismith and Sprang, Trends Biochem. Sci., 23:74-79(1998)参照)、その第３のＣＲＤはＴＮＦＲファミリーのシステインをより典型的な４つ又は６つよりもむしろ３つを持つ。マウスＣＲＤ１(下に記載する)に比較すると、マウスＧＩＴＲのＣＲＤ１にシステイン５つに対して、ＰＲＯ３６４アミノ酸配列はＣＲＤ１に８つのシステインを持ち、マウスＧＩＴＲに４つの潜在的なN結合グリコシル化部位があるのに対し、ＥＣＤには１つの潜在的なN結合グリコシル化部位が存在する。

全長ＰＲＯ３６４ポリペプチドのアミノ酸配列及び当該アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の詳細な検査により、Nocentini等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 6216-6221 (1997)に報告されたマウスＧＩＴＲ(mＧＩＴＲ)タンパク質との配列相同性が明らかになった。従って、ＰＲＯ３６４はNocentini等に報告されたマウスＧＩＴＲタンパク質のヒト対応物を代表する。

【０１２３】

実施例７

ヒトＰＲＯ８４４をコードするｃＤＮＡクローンの単離

発現配列タグ（ＥＳＴ）ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）が検索され、ＥＳＴはＬＰと配列同一性があることが確認された。ここで得られた情報と発見に基づき、このＥＳＴクローン、癌性肺ライブラリ(309-LUNGTUT09)からのインサイトクローン2657496がさらに調べられた。

ｃＤＮＡクローンは同定され、完全に配列決定された。ＤＮＡ５９８３８-１４６２の完全長ヌクレオチド配列をＦｉｇ７（配列番号：７）に示す。クローンＤＮＡ５９８３８-１４６２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５－７に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置３３８－３４０に停止コドンを持つ（Ｆｉｇ７；配列番号：７）。予測されるポリペプチド前駆体は１１１アミノ酸長であり、約１２，０５０ダルトンの算定分子量及び約５．４５の見積もりｐＩを持つ。全長ＰＲＯ８４４タンパク質をＦｉｇ８（配列番号：８）に示す。

Ｆｉｇ８（配列番号：８）に示した全長ＰＲＯ８４４配列の分析により、Ｆｉｇ８に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。全長ＰＲＯ８４４配列（Ｆｉｇ８；配列番号：８）の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１
から約アミノ酸１９のシグナルペプチド；約アミノ酸２３から約アミノ酸２９、約アミノ酸２７から約アミノ酸３３、約アミノ酸３２から約アミノ酸３８、約アミノ酸１０２から約アミノ酸１０８のN-ミリストイル化部位；及び約アミノ酸４９から約アミノ酸６３のＷＡＰ型「４-ジスルフィドコア」ドメインシグネチャーである。

クローンＤＮＡ５９８３８-１４６２は１９９８年6月１６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９９７６が付与された。寄託されたクローンはここで提供された表示よりも事実上正しい配列を有する。

全長ＰＲＯ８４４ポリペプチドのアミノ酸配列の分析により、セリンプロテアーゼ抑制剤と有意な相同性が示され、よって、ＰＲＯ８４４は新規なプロテイナーゼ抑制剤であることを示唆している。より詳細には、Dayhoffデータベース（ﾊﾞｰｼﾞｮﾝ35.45 Swiss Prot 35）の分析により、ＰＲＯ８４４アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との有意な相同性が明らかになった：ALK1_HUMAN, P_P82403, P_P82402, ELAF_HUMAN及びP_P60950。

【０１２４】

実施例８

ヒトＰＲＯ８４６をコードするｃＤＮＡクローンの単離

上記実施例１に記載したように、コンセンサスＤＮＡ配列は、phrapを使用して他のＥＳＴ配列に対して構築した。このコンセンサス配列をここでＤＮＡ３９９４９及び「<consen1322>」と命名する。ＤＮＡ３９９４９コンセンサス配列及び「<consen1322>」に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ８４６の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。ＰＣＲプライマー(正方向及び逆方向)は、ＤＮＡ３９９４９及び「<consen1322>」コンセンサス配列に基づいて合成される。さらに、合成ヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブはコンセンサスＤＮＡ３０９０８配列から構築される。

全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上掲のAusubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、ＰＣＲプライマー対でのＰＣＲ増幅によりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いたＰＲＯ８４６遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

上記の方法により、以下のヌクレオチド配列が得られた：

正方向ＰＣＲプライマー(39949.fl)：

5'-CCCTGCAGTGCACCTACAGGGAAG-3'(配列番号：４７)

逆方向ＰＣＲプライマー(39949.rl)：

5'-CTGTCTTCCCCTGCTTGGCTGTGG-3'(配列番号：４８)

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ＤＮＡ３９９４９配列から構築した：

ハイブリッド形成プローブ(39949.pl)：

5'-GGTGCAGGAAGGGTGGGATCCTCTTCTCTCGCTGCTCTGGCCACATC-3'(配列番号：４９)

ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児腎臓組織(LIB227)から単離した。ｃＤＮＡクローンを単離するために用いたｃＤＮＡライブラリは、例えば、Invitrogen, San Diego, CAの市販試薬を用いて標準的方法によって作成し

た。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位でプライムし、ＳａｌＩへミキナーゼ化アダプターの平滑末端で結合させ、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動で適切にサイズ分割をし、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、ＳｆｉＩ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Ｘｈｏｌ及びＮｏｔＩ部位においてクローン化した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＰＲＯ８４６ポリペプチドの全長ＤＮＡ配列[ここで、ＤＮＡ４４１９６-１３５３と命名される](Ｆｉｇ９、配列番号：９)及びＰＲＯ８４６ポリペプチドの誘導タンパク質配列が得られた。

ＤＮＡ４４１９６-１３５３の完全長ヌクレオチド配列はＦｉｇ９(配列番号：９)に示される。クローンＤＮＡ４４１９６-１３５３は単一のオープンリーディングフレームを有し、ヌクレオチド位置２５－２７に見掛けの翻訳開始部位、及びヌクレオチド位置１０２１－１０２３に停止シグナルを持つ（Ｆｉｇ９）。予想されるポリペプチド前駆体は、３３２アミノ酸長であり、約３６，１４３ダルトンの算定分子量及び約５．８９の見積もりｐＩを有する(Ｆｉｇ１０、配列番号：１０)。

Ｆｉｇ１０（配列番号：１０）に示された全長ＰＲＯ８４６配列の分析により、Ｆｉｇ１０に示す様々な重要なポリペプチドドメインの存在が証明されたが、それらの重要なポリペプチドドメインに対して与えられる位置はおよそ上記の通りである。全長ＰＲＯ８４６配列（Ｆｉｇ１０；配列番号：１０）の分析により以下の存在が証明された：約アミノ酸１から約アミノ酸１７のシグナルペプチド；約アミノ酸２４８から約アミノ酸２６９の膜貫通ドメイン；約アミノ酸９６から約アミノ酸１００のN-グリコシル化部位；約アミノ酸１０４から約アミノ酸１１４のフィブロゲンβ及びγ鎖C-末端ドメイン；約アミノ酸１３から約アミノ酸１２８のＩｇ様V型ドメインである。クローンＤＮＡ４４１９６-１３５３は１９９８年5月6日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９８４７が付与された。

【０１２５】

実施例９

ヒトＰＲＯ１７６０をコードするｃＤＮＡクローンの単離

上記の実施例３に記載したシグナル配列アルゴリズムの使用により、IncyteデータベースからＥＳＴクラスター配列を同定した。次いでこのＥＳＴクラスター配列を、公的データベース（例えば、GenBank）及び企業のＥＳＴＤＮＡデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（ＥＳＴ）データベースと比較して、存在する相同性を同定した。一又は複数のＥＳＴが前立腺癌ライブラリから得られた。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア７０（９０の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ５８７９８と命名する。

ＤＮＡ５８７９８配列とＩｎｃｙｔｅのＥＳＴクローン３３５８７４５に含まれる配列との間の配列相同性に鑑みて、このＥＳＴを含むクローンを購入し、ｃＤＮＡ挿入物を得て配列決定した。ここで、挿入物は全長タンパク質をコードすることがわかった。このｃＤＮＡ挿入物の配列をＦｉｇ１１(配列番号：１１)に示し、ここでＤＮＡ７６５３２－１７０２と命名する。

クローンＤＮＡ７６５３２－１７０２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６０－６２に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置６２４－６２６の停止コドンで終端する（Ｆｉｇ１１）。予測されるポリペプチド前駆体は１８８アミノ酸長である（Ｆｉｇ１２、配列番号：１２）。Ｆｉｇ．１２に示される全長ＰＲＯ１７６０タンパク質は約２１，０４２ダルトンの算定分子量及び約５．３６の推定ｐＩを有する。

Ｆｉｇ１２(配列番号：１２)に示される全長ＰＲＯ１７６０配列の分析により、Ｆｉｇ１２に示される様々な重要なポリペプチドドメインの存在が証明されたが、それらの重要なポリペプチドドメインに対して与えられる位置はおよそ上記の通りである。全長ＰＲＯ１７６０配列の分析により以下の存在が証明された：

約アミノ１から約アミノ酸２０のシグナルペプチド；約アミノ酸１２１から約アミノ酸１２５及び約アミノ酸１７１から約アミノ酸１７５のN-グリコシル化部位；約アミノ酸５４から約アミノ酸６０及び約アミノ酸１６０から約アミノ酸１６６のN-ミリストイル化部位である。クローンＤＮＡ７６５３２－１７０２は１９９８年１１月１７日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０３４７３が付与された。

Ｆｉｇ１２（配列番号：１２）に示した全長配列のＷＵ－ＢＬＡＳＴ２配列アラインメント分析法を使用しての、Ｄａｙｈｏｆｆデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ１７６０のアミノ酸配列と以下のDayhoff配列：CELT07F12_2，T22J18_16，ATF1C12_3，APE3_YEAST，P_W22471，SAU56908_1，SCPA_STRPY，ATAC00423817，SAPURCLUS_2 及びAF041468_9との間の配列同一性が明らかにされた。

【０１２６】

実施例１０

心臓新生児肥大の刺激（アッセイ１）

このアッセイは新生児心臓の肥大を刺激するＰＲＯポリペプチドの能力を測定するように設計されている。このアッセイで陽性と試験されるＰＲＯポリペプチドは様々な心不全疾患の治療上の処置に利用できることが期待される。

１日齢のHarlan Sprague Dawleyラットから筋細胞を得た。細胞（$7.5\times10^{4}$/mlで180μl、血清＜0.1%、新たに単離）をDMEM/F12＋4%FCSで予めコートした９６ウェルプレートに１日目に添加した。試験ＰＲＯポリペプチド又は成長培地のみ(ネガティブコントロール)を含有する試験試料(20μL/ウェル)を１日目にウェルに直接添加した。次いで２日目に最終濃度が$10^{-6}$Mとなるようにｐｇｆ(20μL/ウェル)が加えられる。次いで４日目に細胞が染色され、５日目に視覚によりスコアをつけ、ここでサイズの増加しない細胞(ネガティブコントロールと比較)は０．０とスコアされ、サイズの小から中規模の増加を示した細胞(ネガティブコントロールと比較)は１．０とスコアされさらにサイズの大きな増大を示した細胞(ネガティブコントロールと比較)は２．０とスコアされる。このアッセイで陽性の結果としたのは、１．０又はそれ以上のスコアである。

以下の表７に示される様に、ＰＲＯ８８２はこのアッセイで陽性と試験された。

表7

| PRO# | 濃度/希釈度 | 大きさの相対的な増大（負のコントロールとの比較） |
|---|---|---|
| PRO882 | 0.01% | 3 |
| PRO882 | 0.01% | 3 |
| PRO882 | 0.10% | 4 |
| PRO882 | 0.10% | 4 |
| PRO882 | 1.00% | 6 |
| PRO882 | 1.00% | 6 |
| PRO882 | 0.01% | 3 |
| PRO882 | 0.10% | 4.5 |
| PRO882 | 1.00% | 6 |
| PRO882 | 1.00% | 5.5 |
| PRO882 | 2.6 nM | 5.75 |

【０１２７】

実施例１１

血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）に刺激された内皮細胞成長増殖の阻害（アッセイ９）

内皮細胞のＶＥＧＦ刺激増殖を阻害する様々なＰＲＯポリペプチドの能力を試験した。このアッセイで陽性と試験されたポリペプチドは哺乳動物の内皮細胞成長の抑制に役立ち、例えば腫瘍成長の抑制に有益な効果を与える。

特に、ウシ副腎皮質毛細管内皮細胞（ＡＣＥ）（初代培養からのもの、最大12-14継代）を９６ウェルのプレートにおいて100マイクロリットル当たり500細胞／ウェルでプレーティングした。アッセイ媒体は、低グルコースDMEM、10%子ウシ血清（牛胎児ではない）、2mMグルタミン、及び1Xペニシリン／ストレプトマイシン／ファンギゾンを含む。対照ウェルは以下を含む：（１)ＡＣＥ細胞無添加；（２）ＡＣＥ細胞のみ；（３）ＡＣＥ細胞＋5ng/mlＦＧＦ；（４）ＡＣＥ細胞＋3ng/mlＶＥＧＦ；（５）ＡＣＥ細胞＋3ng/mlＶＥＧＦ＋1ng/mlＴＧＴ-ベータ；及び（６）ＡＣＥ細胞＋3ng/mlＶＥＧＦ＋5ng/mlＬＩＦ。次いで、試験試料、ポリ-HisタグＰＲＯポリペプチド（100マイクロリットル容量）をウェルに添加した（各々、1%、0.1%及び0.01%希釈）。細胞培地を37℃／5%$CO_2$で6-7日間インキュベートした。インキュベーションの後、ウェル中の培地を吸引して細胞

をＰＢＳで1X洗浄した。次いで、酸ホスファターゼ反応混合物（100マイクロリットル、0.1M酢酸ナトリウム，pH5.5，0.1% トリトンX-100，10mMのリン酸ｐ-ニトロフェニル）を各ウェルに添加した。37℃で2時間のインキュベーション後に、10マイクロリットルの1NのNaOHの添加により反応を停止させた。光学密度（ＯＤ）を405nmでマイクロタイタープレートで測定した。

ＰＲＯポリペプチドの活性は、刺激なしの細胞に対する、（OD405nmでの酸性ホスファターゼ活性を測定したときの）ＶＥＧＦ（3ng/ｍｌ）刺激増殖の阻害パーセントとして計算した。ＴＧＦ-ベータは、ＶＥＧＦ-刺激ＡＣＥ細胞増殖の70-90%をブロックするため、ＴＧＦ-ベータを1ng/mlにおいて活性対照として用いた。以下の表８に示す結果は、癌治療、特に腫瘍血管形成の阻害におけるＰＲＯポリペプチドの有用性を示す。表８に示される数値（相対的阻害）は、刺激なしの細胞に対するＰＲＯポリペプチドによるＶＥＧＦ刺激増殖の阻害パーセントを算定し、次いでＶＥＧＦ刺激細胞増殖の70-90%を阻害することが知られている１ng/mlのＴＧＦ-βにより得られた阻害パーセントでそのパーセントを割ることにより決定される。結果は、ＰＲＯポリペプチドが内皮細胞成長のＶＥＧＦ刺激の30%又はそれ以上の阻害を示した場合（30%以上の相対的阻害）をポジティブと考えた。

表8

VEGF刺激性内皮細胞成長の抑制

| PRO名 | PRO濃度 | 相対的抑制% |
|---|---|---|
| PRO333 | 0.01% | 97.0 |
| PRO333 | 0.10% | 90.0 |
| PRO333 | 1.00% | 63.0 |
| PRO877 | 0.01% | 101.0 |
| PRO877 | 0.01% | 108.0 |
| PRO877 | 0.10% | 86.0 |
| PRO877 | 0.10% | 99.0 |
| PRO877 | 1.00% | 46.0 |
| PRO877 | 1.00% | 46.0 |
| PRO879 | 0.01% | 100.0 |
| PRO879 | 0.01% | 105.0 |
| PRO879 | 0.10% | 97.0 |
| PRO879 | 0.10% | 101.0 |
| PRO879 | 1.00% | 55.0 |
| PRO879 | 1.00% | 66.0 |
| PRO882 | 0.01% | 96.0 |
| PRO882 | 0.10% | 86.0 |
| PRO882 | 1.00% | 70.0 |
| PRO885 | 0.01% | 100.0 |
| PRO885 | 0.10% | 93.0 |
| PRO885 | 1.00% | 64.0 |

【０１２８】

実施例１２

内皮細胞におけるｃ-ｆｏｓの誘導（アッセイ３４）

このアッセイはＰＲＯポリペプチドが内皮細胞においてｃ-ｆｏｓを誘導する能力を示すか否かを決定するために設計されている。このアッセイで陽性と試験されたＰＲＯポリペプチドは、症状や疾患の治療上の処置に役立ち、その脈管形成は例えば創傷治癒、及びその様なもの(これらのＰＲＯポリペプチドのアゴニストのような)を含むものに有用である。このアッセイで陽性と試験されたＰＲＯポリペプチドは癌性腫瘍の治療上の処置に役立つことが期待される。

成長培地（50%のハムのＦ１２ｗ／ｏＧＨＴ：低グルコース、及びグリシンなしの50%ＤＭＥＭ：$NaHCO_3$、1%グルタミン、10mMのＨＥＰＥＳ、10%のＦＢＳ、10ng/mlのｂＦＧＦ）中のヒト静脈臍静脈内皮細胞（HUVEC, Cell Systems）を$1x10^4$細胞／ウェルの細胞密度で９６ウェルマクロタイタープレートにプレーティングした。プレーティングの次の日、成長培地を除き、細胞を100μl／ウェ

ルの試験試料とコントロール（ポジティブコントロール：成長培地；ネガティブコントロール：10mMのＨＥＰＥＳ、140mMのＮａＣｌ、4%（w/v）マンニトール、pH6.8）で処理することにより、細胞を飢餓させた。細胞を5%$CO_2$中で37℃において30分間インキュベートした。試料を取り除いて、ｂＤＮＡキットプロトコール（Chiron Diagnostics, cat.#6005-037）の最初の部分に従った。ここで、下記の各大文字の試薬／バッファーはキットから利用可能であった。

簡単には、試験に必要なＴＭ溶菌バッファー(TM Lysis Buffer)及びプローブの量を製造者により提供された情報に基づいて計算した。適当な量の解凍プローブをＴＭ溶菌バッファーに添加した。捕獲ハイブリッド形成バッファー(Capture Hybridization Buffer)を室温まで温めた。ｂＤＮＡ条片を金属条片ホルダーにセットアップし、100μｌの捕獲ハイブリッド形成バッファーを必要な各ｂ-ＤＮＡウェルに添加し、少なくとも30分インキュベートした。細胞内の試験プレートをインキュベータから取り除き、真空マニフォールドを使用して培地を穏やかに除いた。マイクロタイタープレートの各ウェルに100μｌのプローブを伴う溶菌ハイブリッド形成バッファーを各ｂ-ＤＮＡウェルにピペットで素早く添加した。ついで、プレートを15分間55℃でインキュベートした。インキュベーターからの取り出し、マイクロタイターアダプターヘッドを備えたボルテックスミキサーにプレートを配し、1分の間、#2の設定でボルテックスした。80μｌの溶菌液を取り除き、捕獲ハイブリッド形成バッファーを含むｂＤＮＡウェルに添加し、ピペットで上下して混合した。プレートを少なくとも16時間の間53℃でインキュベートした。

【０１２９】

次の日に、ｂＤＮＡキットプロトコールの第２の部分に従った。すなわち、プレートをインキュベーターから取り除き、ベンチに配置して10分間冷却した。必要な添加の容積は製造者により適用された情報に基づいて計算した。ＡＬハイブリッド形成バッファー中に1:100の希釈のアンプリファイアー濃縮物（Amplifier Concentrate）（20fm/μｌ）を作成することによりアンプリファイアー作用液を調製した。ハイブリダイゼーション混合物はウォシュＡで２回洗浄された。50μｌのアンプリファイアー作用液がそれぞれのウェルに加えられ、該ウェルは５３

℃で３０分でインキュベートされた。ついで、プレートをインキュベーターから取り除いて10分間冷却した。標識プローブ作用液を、ＡＬハイブリッド形成バッファー中に1:100の希釈で標識濃縮物（40pmoles/μl）を作成することにより調製した。10分の冷却期間後、アンプリファイアーハイブリッド形成混合物を除去し、プレートを洗浄剤Ａで2回洗浄した。50μlの標識プローブ作用液を各ウェルに添加し、ウェルを53℃で15分間インキュベートした。10分間の冷却後、基質を室温まで温めた。アッセイに必要な各モルの基質に3μlの基質エンハンサーを添加して、プレートを10分間冷却し、標識ハイブリッド形成混合物を取り除き、プレートを洗浄剤Ａで2回、洗浄剤Ｄで3回洗浄した。50μlのエンハンサーを伴う基質溶液を各ウェルに添加した。プレートを37℃で30分間インキュベートし、ＲＬＵを適当な照度計で読みとった。

複製を平均化し変動係数を決定した。ネガティブコントロール（上述のＨＥＰＥＳバッファー）値に対する増加倍数の活性の測定は化学発光単位（ＲＬＵ）によって示された。結果を下記の表９に示し、ネガティブコントロール値に対して少なくとも２倍の値を示す試料は陽性と考えた。ネガティブコントロール＝1.00％希釈で1.00RLU。ポジティブコントロール＝1.00％希釈で8.39RLU。

【０１３０】

表9

内皮細胞でのc-fosの誘導

| PRO名 | PRO濃度 | RLU値 |
|---|---|---|
| PRO321 | 0.011 nM | 1.51 |
| PRO321 | 0.11 nM | 1.07 |
| PRO321 | 1.1 nM | 2.11 |
| PRO321 | 0.011 nM | 2.13 |
| PRO321 | 0.11 nM | 2.27 |
| PRO321 | 1.10 nM | 2.65 |
| PRO840 | 2.44 nM | 1.85 |
| PRO840 | 24.4 nM | 2.21 |
| PRO840 | 244 nM | 3.04 |
| PRO840 | 2.44 nM | 2.82 |
| PRO840 | 24.4 nM | 2.90 |
| PRO840 | 244 nM | 1.01 |
| PRO878 | 0.01% | 2.43 |
| PRO878 | 0.10% | 2.71 |
| PRO878 | 1.00% | 1.39 |
| PRO878 | 0.01% | 2.48 |
| PRO878 | 0.10% | 2.45 |
| PRO878 | 1.00% | 1.89 |
| PRO879 | 0.01% | 1.23 |
| PRO879 | 0.10% | 1.33 |
| PRO879 | 1.00% | 2.54 |
| PRO879 | 0.01% | 2.06 |
| PRO879 | 0.10% | 1.65 |
| PRO879 | 1.00% | 2.25 |

【０１３１】

実施例１３

Ｆ２ａにより誘発される心臓新生児肥大の促進（アッセイ３７）

このアッセイは新生児心臓の肥大を刺激するＰＲＯポリペプチドの能力を測定するように設計されている。このアッセイで陽性と試験されたＰＲＯポリペプチドは様々な心不全疾患と治療上の処置に役立つことが期待される。

１日齢のHarlan Sprague Dawleyラットから筋細胞を得た。細胞（$7.5x10^4$/mlで180μl、血清＜0.1%、新たに単離）をDMEM/F12＋4%FCSで予めコートした９６ウェルプレートに１日目に添加した。試験ＰＲＯポリペプチド（20μl/ウェル）を含有する試験試料を１日目にウェルに直接添加した。次いで２日後にＰＧＦ（20μl/ウェル）を最終濃度$10^{-6}$Mで添加した。次いで細胞を４日目に染色し、

５日目にスコアをつけた。視覚的スコアは細胞サイズに基づき、ネガティブコントロールに比較してサイズの増加を示さない細胞を0.0とスコア付けし、ネガティブコントロールに比較してサイズの小から中程度の増加を示す細胞を1.0とスコア付けし、ネガティブコントロールに比較してサイズの大きな増加を示す細胞を2.0とスコア付けした。1.0又はそれ以上のスコアを陽性と考えた。

アッセイ反応にＣａ濃度が重要であるためＰＢＳは含有しない。プレートはDMEM/F12＋4%FCS（200μl/ウェル）でコートした。アッセイ媒体は以下を含む：DMEM/F12（2.44gmの重炭酸塩を含む）、10μg/mlのトランスフェリン、1μg/mlのインシュリン、1μg/mlのアプロチニン、2mmol/Lのグルタミン、100U/mlのペニシリンG、100μg/mlのストレプトマイシン。マンニトール（4%）を含むタンパク質バッファーは1/10（0.4%）及び1/100（0.04%）ではポジティブシグナル（スコア3.5）を与えたが、1/1000(0.004%)では与えなかった。従って、マンニトールを含む試験試料バッファーは実行しなかった。

ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ８８２及びＰＲＯ８８７ポリペプチドは、このアッセイで陽性と試験された。

【０１３２】

実施例１４

心臓成人肥大の阻害（アッセイ４２）

このアッセイは心臓成人肥大の阻害を測定するように設計されている。このアッセイで陽性と試験されたＰＲＯポリペプチドは、心臓肥大に関与する心疾患の治療上の処置での使用が見出される。

心室筋細胞を成体（250g）Harlan Sprague Dawleyラットから新たに単離し、細胞を2000細胞/180μlウェル容積でプレーティングした。２日目にＰＲＯポリペプチドを含む試験試料（20μl）を添加した。５日目に細胞を固定した後に染色した。数時間後に細胞からのＰＣＲによりＡＮＰメッセージの増加も測定できる。結果は細胞サイズの視覚的スコアに基づく：0＝阻害無し、-1＝小さな阻害、-2＝大きな阻害。0未満のスコアをポジティブと考えた。活性参照は、ポジティブコントロールとしての0.1mMのフェニルエフィン（ＰＥ）に相当する。2のスコアは極めてポジティブと考える。アッセイ媒体は以下を含む：100mMのインシ

ュリン、0.2%のＢＳＡ、5mMのクレチン、2mMのL-カルニチン、5mMのタウリン、100U/mlのペニシリンG、100μg/mlのストレプトマイシン(ＣＣＴ媒体)中に懸濁したＭ１９９(修飾)-グルタミンフリー、$NaHCO_3$、フェノールレッド。９６ウェルプレートの内側６０ウェルのみを使用した。これらの中で、６ウェルをネガティブ及びポジティブ（ＰＥ）コントロール用にとっておいた。

ＰＲＯ８７８ポリペプチドは、上記のアッセイで０よりも小さいスコアを示した。

【０１３３】

実施例１５

内皮細胞アポトーシスの誘発（アッセイ７３）

内皮細胞においてアポトーシスを誘導するＰＲＯポリペプチドの能力をヒト静脈の臍静脈内皮細胞（HUVEC, Cell Systems）中で試験した。アッセイでの陽性の結果は、血管疾患のような腫瘍の治療上の処置でのＰＲＯポリペプチドの有用性が示唆され、内皮細胞のアポトーシスの誘発に有益である。

内皮細胞においてアポトーシスを誘導するＰＲＯポリペプチドの能力を、９６ウェル型を用い、100ng/mlVEGFを補った０％血清媒地中で、ヒト静脈の臍静脈内皮細胞（HUVEC, Cell Systems）で試験した。（HUVEC細胞はプレート表面から容易に取り除かれ、全てのウェルでのピペット作業はできるだけ穏やかに行われるべきである。）

培地は吸引され、細胞は一度PBSで洗浄された。5mlの1xトリプシンがT-175フラスコで細胞に添加され、細胞はプレートから遊離されるまでそのまま置かれた(約5-10分)。トリプシン処理は5mlの成長培地の添加によって停止された。細胞は4℃で5分間、1000rpmで回転させた。培地を吸引し、細胞を10mlの10%血清添加培地(Cell Systems)、1xペニシリン/ストレプトマイシン中に再懸濁した。

細胞を９６ウェルマイクロタイタープレート（Amersham Life Science, cytostar-Tシンチレーティングマイクロプレート、無菌、組織培地処理、個々にラッピング）で10%の血清（CSG-媒体、Cell Systems）中、ウェル当たり$2x10^4$細胞の密度で全容量100μｌでプレーティングした。２日目に、ＰＲＯポリペプチドを含有する試験試料を1%、0.33%及び0.11%希釈の３段階で添加した。細胞無しの

ウェルをブランクとして用い、細胞のみのウェルをネガティブコントロールとして用いた。ポジティブコントロールとしてスタウロスポリンの３ｘストックの1:3連続希釈50μｌを用いた。ＰＲＯポリペプチドのアポトーシスを誘導する能力は、カルシウム及びリン脂質結合タンパク質のメンバーであるアネキシンＶの検出のために９６ウェルをプロセッシングしてアポトーシスを検出することにより決定した。

0.2mlのアネキシンＶ-ビオチンのストック溶液（100μg/ml）を、4.6mlの2 x Ｃａ$^{2+}$結合バッファー及び2.5%BSA中に希釈した(1:25希釈)。50μｌの希釈アネキシンＶ-ビオチン液を、1.0μg/mlの最終濃度になるまで各ウェル（コントロールを除く）に添加した。試料を$^{35}$Ｓ-ストレプトアビジンの直接添加の前にアネキシン-ビオチンと共に10-15分間インキュベートした。$^{35}$Ｓ-ストレプトアビジンは2 x Ｃａ$^{2+}$合バッファー、2.5%BSA中に希釈し、最終濃度が3 x $10^4$cpm／ウェルになるまで全てのウェルに添加した。次いでプレートを密封し、1000rpmで15分間遠心分離し、2時間の間、軌道シェイカー上に配した。分析は1450 Microbeta Trilux (Wallac)で実施した。結果は以下の表１０に示され、バックグラウンドを越えるパーセントがネガティブコントロールを越える毎分当たりのカウントのパーセント量を表す。バックグラウンドを越えるパーセントが30%以上のものがポジティブであると考えられる。

ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ３６４及びＰＲＯ８７９は、上記のアッセイにおいてポジティブな結果をスコアした。

表10

内皮細胞アポトーシスの誘導

| PRO名 | PRO濃度 | バックグラウンドを超えるパーセント |
|---|---|---|
| PRO333 | 0.11% | 61.7 % |
| PRO333 | 0.33% | 37.6 % |
| PRO364 | 2.99 nM | 19.3 % |
| PRO364 | 8.99 nM | 6.9 % |
| PRO364 | 27.23 nM | 31.5 % |
| PRO879 | 1.00% | 64.2 % |
| PRO879 | 0.11% | 65.5% |
| PRO879 | 0.33% | 14.7% |

【０１３４】

実施例１６

ＬＩＦとエンドセリン-１(ＥＴ-１)に誘発される心臓新生児肥大の抑制（アッセイ７４）

このアッセイは、本発明のＰＲＯポリペプチドがＬＩＦ及びエンドセリン-１(ＥＴ-１)に誘発される新生児心臓の肥大を抑制するＰＲＯポリペプチドの能力を示すかどうかを決定するように設計されている。本アッセイで陽性反応を示した試験化合物は心筋の好ましくない肥大に特徴付けられる又は関与する心疾患又は障害の治療上の処置に役立つことが期待される。

１日齢のHarlan Sprague Dawleyラットからの筋細胞（$7.5x10^4$/mlで180μl、血清＜0.1%、新たに単離）をDMEM/F12＋4%FCSで予めコートした９６ウェルプレートに１日目に添加する。ついで２日目に試験ＰＲＯポリペプチドサンプル又は成長培地のみのもの(ネガティブコントロール)を20μlの容量でウェルに直接添加する。ついで３日目にＬＩＦ+ＥＴ-１がウェルに添加される。さらに２日後、細胞は培地で染色され、次の日に視覚によりスコアをつける。ＰＲＯポリペプチドで処理したミオサイトが未処理のミオサイトに比べて視覚的に平均して小さいか、又は少ない数であれば、アッセイで陽性となる。

ＰＲＯ２３８及びＰＲＯ１７６０ポリペプチドはこのアッセイで陽性と試験された。

【０１３５】

実施例１７

内皮管形成-芽の形成の刺激（アッセイ８６）

このアッセイはＰＲＯポリペプチドが内皮空胞及び管腔形成を促進する能力を示すかどうかを決定するために設計される。このアッセイで陽性と試験されたＰＲＯポリペプチドは、例えば飲作用、イオン･ポンプ、血管透過性及び／又は接合形成が有益であることを含み、内皮空胞及び／又は管腔形成が有益である障害の治療的な処置に有用であることが期待される。

ＨＵＶＥＣ細胞（初生から８未満の継代数）をＩ型ラット尾のコラーゲンと混合して(最終濃度２．６ｍｇ／ｍｌ)、密度６ｘ１０$^5$細胞／ｍｌとし、１％のＦＢＳと形成される間にＰＲＯポリペプチドの存在で空胞を染色する為の１μＭの

６-ＦＡＭ-ＦＩＴＣ染料を補填したＭ１９９培地をウェル当たり５０μｌで蒔いた。細胞を３７℃／５％$CO_2$で４８時間インキュベートし、室温で１０分間３．７％のホルマリンで固定し、Ｍ１９９培地で５回洗浄し、ついで４℃で終夜、Ph-Phalloidinで染色し、４μＭのＤＡＰＩで核染色を行った。アッセイでの陽性の結果は２に等しいか２より小さい[１＝細胞は全て丸い、２＝細胞は長い、３＝細胞は幾つかの結合で管を形成している、４＝細胞は複雑な管状網目を形成している]。

このアッセイにおいて、ＰＲＯ１７９ポリペプチドは陽性と試験された。

【０１３６】

実施例１８

内皮細胞アポトーシス(ＥＬＩＳＡ)の誘発（アッセイ１０９）

内皮細胞においてアポトーシスを誘導するＰＲＯポリペプチドの能力を、100ng/mlのＶＥＧＦ、0.1%のＢＳＡ、1Xpenn/strepを補充した0%血清培地中で９６ウェルフォーマットを使用して、ヒト静脈の臍静脈内皮細胞（HUVEC, Cell Systems）中で試験した。使用した９６ウェルプレートはFalconにより製造された（番号3072）。９６ウェルのコーティングは、ＰＢＳ溶液中の0.2%ゼラチン100μｌで＞30分間ゼラチン化を起こすことにより調製した。ゼラチン混合物を完全に吸引した後、10%血清含有培地中で最終濃度$2x10^4$細胞/mlの最終濃度－ウェル当たり100μｌ容量でプレーティングした。対象とするＰＲＯポリペプチドを含有する試験試料を添加する前に細胞を24時間成長させた。

全てのウェルに、100ng/mlのＶＥＧＦ、0.1%のＢＳＡ、1Xpenn/strepを補充した0%血清培地中100μｌを添加した。ＰＲＯポリペプチドを含有する試験試料を1%、0.33%及び0.11%の希釈で三つ組で添加した。細胞の無いウェルをブランクとして使用し、細胞だけのウェルをネガティブコントロールとして使用した。ポジティブコントロールとして、3x原液のスタウロスポリンの50μｌの1:3の連続希釈物を使用した。ＥＬＩＳＡに先立って、細胞を24から35時間インキュベートした。

ＥＬＩＳＡを、Boehringer マニュアル［Boehringer, 細胞死検出ELISA plus, カタログ番号1920685］に従ってアポトーシス調製溶液のレベルを決定するのに使用した。試料調製：９６ウェルプレートを1krpmで10分間スピン沈降させ（200

g）、高速反転により上清を除去し、プレートをペーパータオル上に上下逆に置いて残りの液体を除去した。各ウェルに、200μlの1X溶菌バッファーを添加して振盪させずに30分間室温でインキュベートした。プレートを1krpmで10分間スピン沈降させ、20μlの溶菌液（細胞質画分）をストレプトアビジン被覆ＭＴＰに移した。80μlの免疫試薬混合物を各ウェルで20μl溶菌液に加えた。ＭＴＰを粘着性ホイルでカバーし、それを軌道振盪機（200rpm）に配することにより2時間室温でインキュベートした。2時間後、上清を吸引により除去し、ウェル当たり250μlの1Xインキュベーションバッファーで3回ウェルをリンスした（吸引で除去した）。各ウェルに基質溶液を添加し（100μl）、軌道振盪機で室温において250rpmで、光度測定分析に十分な発色がされるまでインキュベートした（約10-20分後）。参照波長492nmとして405nmでプレートを読むのに９６ウェルリーダーを用いた。ＰＩＮ３２（コントロールバッファー）について得られたレベルを100%に設定した。レベル＞130%の試料をアポトーシス誘導についてのポジティブと考えた。

ＰＲＯ８４６及びＰＲＯ８４４は、このアッセイにおいて陽性と試験された。

【０１３７】

実施例１９

インサイツハイブリッド形成

インサイツハイブリッド形成は、細胞又は組織調製物内での核酸配列の検出及び局在化のための強力で多用途の技術である。それは、例えば、遺伝子発現部位の同定、転写物の組織分布の分析、ウイルス感染の同定と局在化、特定のｍＲＮＡ合成における変化の追跡及び染色体マッピングにおける補助に有用である。

インサイツハイブリッド形成は、Lu及びGillett, Cell Vision 1: 169-176 (1994)のプロトコールの最適化バージョンに従って、ＰＣＲ生成$^{33}$Ｐ-標識リボプローブを用いて実施される。簡単には、ホルマリン固定、パラフィン包埋ヒト組織を切片化し、脱パラフィンし、プロテイナーゼＫ（20g/ml）で１５分間３７℃で脱タンパクし、さらに上掲のLu及びGillettに記載されたようにインサイツハイブリッド形成する。($^{33}$-Ｐ)ＵＴＰ-標識アンチセンスリボプローブをＰＣＲ産物から生成し、５５℃で終夜ハイブリッド形成する。スライドをKodak NTB2

TM核トラックエマルションに浸漬して４週間露出する。

33Ｐ-リボプローブ合成

6.0μｌ（125mCi）の33Ｐ-ＵＴＰ（Amersham BF 1002, SA＜2000 Ci/mmol）をスピード真空乾燥させた。乾燥33Ｐ-ＵＴＰを含む各管に以下の成分を添加した：

2.0μｌの5ｘ転写バッファー

1.0μｌのＤＴＴ（100mM）

2.0μｌのＮＴＰ混合物（2.5mM: 各10μｌの10mM GTP, CTP及びATP+10μｌの$H_2O$）

1.0μｌのＵＴＰ（50μM）

1.0μｌのＲＮＡｓｉｎ

1.0μｌのＤＮＡテンプレート（1μg）

1.0μｌの$H_2O$

1.0μｌのＲＮＡポリメラーゼ（ＰＣＲ産物についてT3＝AS, T7=S,通常）

管を３７℃で１時間インキュベートし、1.0μｌのRQ1 ＤＮａｓｅを添加し、次いで３７℃で１５分間インキュベートした。90μｌのＴＥ（10mMトリスpH7.6／1mMのＥＤＴApH8.0）を添加し、混合物をDE81紙にピペットした。残りの溶液をMicrocon-50TM限外濾過ユニットに負荷し、プログラム１０を用いてスピンさせた（6分間）。濾過ユニットを第２の管に変換し、プログラム２を用いてスピンさせた（3分間）。最終回収スピンの後、100μｌのＴＥを添加した。1μｌの最終生成物をDE81紙にピペットし6mlのBIOFLUOR II™で数えた。

プローブをＴＢＥ／尿素ゲル上で走らせた。1-3μｌのプローブ又は5μｌのＲＮＡ ＭｒｋIIIを3μｌの負荷バッファーに添加した。加熱ブロック上で９５℃に３分間加熱した後、ゲルを即座に氷上に置いた。ゲルのウェルをフラッシングし、試料を負荷し、180-250ボルトで45分間走らせた。ゲルをサランラップでラップし、－７０℃冷凍機内で補強スクリーンを持つＸＡＲフィルムに１時間から終夜露出した。

【０１３８】

33Ｐ-ハイブリッド形成

Ａ．凍結切片の前処理

スライドを冷凍機から取り出し、アルミニウムトレイに配置して室温で５分間解凍した。トレイを５５℃のインキュベータに５分間配置して凝結を減らした。スライドを蒸気フード内において氷上4%パラホルムアルデヒド中で５分間固定し、0.5ｘＳＳＣで５分間室温で洗浄した（25ml 20xSSC + 975ml SQ $H_2O$）。0.5μg/mlのプロテイナーゼＫ中、３７℃で１０分間の脱タンパクの後（250mlの予備加熱ＲＮａｓｅ無しＲＮａｓｅバッファー中の10mg/mlストック12.5μl）、切片を0.5ｘＳＳＣで１０分間室温で洗浄した。切片を、70%、95%、及び100%エタノール中、各2分間脱水した。

Ｂ．パラフィン包埋切片の前処理：

スライドを脱パラフィンし、ＳＱ $H_2O$中に配置し、2ｘＳＳＣで室温において各々５分間２回リンスした。切片を20μg/mlのプロテイナーゼＫ（250ｍｌのＲＮａｓｅ無しＲＮａｓｅバッファー中10mg/mlを500μｌ；３７℃、１５分間）－ヒト胚又は８ｘプロテイナーゼＫ（250mlのＲＮａｓｅバッファー中100μl、３７℃、３０分間）－ホルマリン組織で脱タンパクした。続く0.5ｘＳＳＣでのリンス及び脱水は上記のように実施した。

Ｃ．プレハイブリッド化：

スライドをＢｏｘバッファー（4ｘＳＳＣ、50%ホルムアミド）－飽和濾紙で列を作ったプラスチックボックスに並べた。組織を50μlのハイブリッド形成バッファー（3.75gデキストラン硫酸＋6mlＳＱ $H_2O$）で被覆し、ボルテックスし、キャップを外して２分間マイクロ波で加熱した。氷上で冷却した後、18.75mlのホルムアミド、3.75ｍｌの20ｘＳＳＣ及び9mlのＳＱ $H_2O$を添加し、組織を良くボルテックスし、４２℃で1-4時間インキュベートした。

Ｄ．ハイブリッド形成：

スライド当たり$1.0x10^6$cpmのプローブ及び1.0μlのｔＲＮＡ（50mg/mlストック）を９５℃で３分間加熱した。スライドを氷上で冷却し、スライド当たり48μlのハイブリッド形成バッファーを添加した。ボルテックスの後、50μlの３３Ｐ混合物をスライド上のプレハイブリッド50μlに添加した。スライドを５５℃で終夜インキュベートした。

Ｅ．洗浄：

洗浄は、2x10分間、2ｘＳＳＣ、ＥＤＴＡで室温で実施し（400mlの20ｘSSC＋16mlの0.25M EDTA、$V_f$＝４Ｌ）、次いでＲＮａｓｅＡ処理を３７℃で３０分間行った（250mlＲＮａｓｅバッファー中10mg/mlを500μｌ＝20μg/ml）。スライドを2x10分間、2ｘＳＳＣ、ＥＤＴＡで室温において洗浄した。緊縮性洗浄条件は次の通り：５５℃で２時間、0.1ｘＳＳＣ、ＥＤＴＡ（20mlの20ｘSSC＋16mlのEDTA、$V_f$＝４Ｌ）。

【０１３９】

Ｆ．オリゴヌクレオチド

ここに開示したＤＮＡ配列の二つについてインサイツ分析を実施した。これらの分析に対して用いたオリゴヌクレオチドは次の通りである：

（１）ＤＮＡ４７３６５-１２０６（ＰＲＯ３６４）(ＴＮＦ受容体相同体)

p1：

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCAACCCGAGCATGGCACAGCAC-3'(配列番号：５０)

p2：

5'-CTATGAAATTAACCCTCACTAAAGGGATCTCCCAGCCGCCCCTTCTC-3'(配列番号：５１)

（２）ＤＮＡ３０８６８（ＰＲＯ２０５）(ホリスタチン相同体)

p1：

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCAGAGACAGGGCAAGCAGAATG-3'(配列番号：５２)

p2：

5'-CTATGAAATTAACCCTCACTAAAGGGAGAAGGGGATGACTGGAGGAAC-3'(配列番号：５３)

（３）ＤＮＡ４１３７４（ＰＲＯ３３３）(ＣＤ３３相同体)

p1：

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCTCCACAGAACCTCGCCATCA-3'(配列番号：５４)

p2：

5'-CTATGAAATTAACCCTCACTAAAGGGATGGGGCAAGACTCACAAGCAG -3'(配列番号：５５)

【０１４０】

Ｇ．結果

ここに開示した上記の２つのＤＮＡ配列についてインサイツ分析を実施した。

これらの分析からの結果は次の通りである：

（１）ＤＮＡ４７３６５－１２０６（ＰＲＯ３６４）（ＴＮＦ受容体相同体）

発現は、胎児において、椎骨体の前側表面を内張りする筋膜で観察された。発現は、胎児網膜全体でも見られた。しかしながら胎児ニューロン全体では低レベルの発現が起こった。他の組織は全てネガティブであった。

（２）ＤＮＡ３０８６８（ＰＲＯ２０５）(ホリスタチン相同体)

胎児組織において、脊髄、自律神経節、腸管神経、仙骨神経叢、末梢及び脳神経で発現があった。他の胎児及び成人組織は全てネガティブであった。

試験した胎児の組織（12-16週）は以下を含む：胎盤、臍帯、肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、肺、心臓、大動脈、食道、胃、小腸、脾臓、胸腺、膵臓、脳、眼、脊髄、体壁、骨盤及び下肢。

成人組織は以下を含む：肝臓、腎臓、副腎、心筋、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺及び皮膚。

【０１４１】

（３）ＤＮＡ４１３７４（ＰＲＯ３３３）(ＣＤ３３相同体)

この分子は（Ｔリンパ球共刺激アッセイにおいて一方向混合リンパ球反応におけるＴリンパ球増殖を亢進する）免疫賦活性があることが示された。この分子の分布パターンは、この研究の開始時に利用できる組織を含む限られた組織スクリーニングによって評価した。

多くの検定された組織において、弱い核酸発現は胸腺Ｔリンパ球で検出された(脾臓とリンパ節は検定されなかった)。この結果はこれに続くin situハイブリダイゼーション研究で確認された。その研究の結果はＴリンパ球特定領域の非ヒト霊長類胸腺及びヒト扁桃腺で、同様に低いレベルで発現を示した。制限された分散パターンはＴリンパ球や抗体提示細胞のようなＴリンパ球に深く関与する細胞(樹状細胞集団など)により発現が示唆される。重大なリンパ球炎症及び反応性濾胞形成の存在での炎症したヒト組織(炎症性腸疾患及び慢性リンパ球性の間質性肺炎／気管支炎)には、多数のＴリンパ球を含む領域の発現が検出されない。

分散の違い(例えば、Ｔリンパ球性炎症のある領域以外の胸腺と扁桃のリンパ領域での発現)は以下の可能性を示唆する：

１．炎症した細胞以外の胸腺及び扁桃腺リンパ節に存在するＴリンパ球部分集合で選択的／制限的発現があるということ。未成熟で、機能していないＴリンパ球は、胸腺及び扁桃の両方に存在するが、恐らく慢性炎症組織での主要な集団ではない。

２．Ｔリンパ球での発現は弱く、Ｔリンパ球を持つ組織での検出の違いは、Ｔリンパ球集団の型の違いの反映であるよりもむしろ、それらの組織部分のＲＮＡの質の反映であるということ。

３．胸腺及び扁桃での発現はリンパ球内ではなく、むしろＴリンパ球に深く関与する特異的細胞集団内であり、炎症した肺及び腸では検出されないということ。その様な可能性があるのは樹状細胞集団である。

非ヒト霊長類では、胸腺リンパ球の弱い発散発現がある。

その後の研究で、次のような結果が報告された：

炎症肺：(慢性リンパ球性及び肉芽腫性肺)：弱い負のシグナルはコントロールのセンスプローブに比較して間質で観察された。；通常のチンパンジー胸腺(ヒト胸腺は入手不可能)及びヒト扁桃で弱い発現があった。後に発現は毛包周辺帯域を含むこの構造のＴリンパ球領域及び副皮質で顕著であった。

次のヒト組織では発現が検出されなかった：炎症性腸疾患(８患者検体)、慢性炎症性及び通常の肺(６患者検体)、慢性硬化性腎炎(１患者検体)、急性炎症性及び硬化肝臓(１０患者検体)、通常及び乾癬の皮膚、及び末梢リンパ節(非反応性)。

【０１４２】

実施例２０

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７のハイブリッド形成プローブとしての使用

以下の方法は、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、Ｐ

ＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードするヌクレオチド配列のハイブリッド形成プローブとしての使用を記述する。

（それぞれＦｉｇ１，３，５，７，９，１１，１３，１５，１７，１９，２１，２３，２５，２７，２９，及び３１、それぞれ配列番号：１，３，５，７，９，１１，１３，１５，１７，１９，２１，２３，２５，２７，２９，及び３１に示されたような）全長又は成熟ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７又はその断片のコード化配列を含むＤＮＡは、ヒト組織ｃＤＮＡライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリの同種ＤＮＡ（ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

ハイブリッド形成及びいずれかのライブラリＤＮＡを含むフィルターの洗浄は、以下の高緊縮性条件下で実施される。ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドをコードしている遺伝子から誘導された放射標識プローブのフィルターへのハイブリッド形成は、50%ホルムアミド、5x 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、2xデンハード液、及び10%デキストラン硫酸の溶液中で４２℃で２０時間実施した。フィルターの洗浄は、0.1xＳＳＣ及び0.1%ＳＤＳ水溶液中で、４２℃で実施した。

全長天然配列をコードするＤＮＡと所望の同一性を持つＤＮＡは、次いでこの分野で知られた標準的技術を用いて同定できる。

【０１４３】

実施例２１

大腸菌におけるＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７の発現

この実施例は、大腸菌での組換え発現による非グリコシル化形態のＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７の調製を例示する。

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７（それぞれ配列番号：１，３，５，７，９，１１，１３，１５，１７，１９，２１，２３，２５，２７，２９，又は３１）をコードするＤＮＡ配列を、選択したＰＣＲプライマーを用いて最初に増幅した。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を持たなければならない。種々の発現ベクターが用いられる。好適なベクターの例は、ｐＢＲ３２２（大腸菌から誘導されたもの；Bolivar等，Gene，2:95 (1977)参照）であり、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性についての遺伝子を含む。ベクターは、制限酵素で消化され脱リン酸される。ＰＣＲ増幅した配列は、次いでベクターに結合させる。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配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む）、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７コード化領域、ラムダ転写終結区、及びａｒｇＵ遺伝子を含む。

ライゲーション混合物は、次いで、上掲のSambrook等に記載された方法を用いた選択した大腸菌の形質転換に使用される。形質転換体は、それらのＬＢプレー

トで成長する能力により同定され、次いで抗生物質耐性クローンが選択される。プラスミドＤＮＡが単離され、制限分析及びＤＮＡ配列決定で確認される。

選択されたクローンは、抗生物質を添加したＬＢブロスなどの液体培地で終夜成長させることができる。終夜培地は、続いて大規模培地の播種に用いられる。次に細胞を最適密度で成長させ、その間に発現プロモーターが作動する。

更に数時間の培養の後、細胞を遠心分離により採集できる。遠心分離で得られた細胞ペレットは、この分野で知られた種々の試薬を用いて可溶化され、ついで可溶化ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７タンパク質を金属キレート化カラムを用いてポリペプチドを緊密に結合させる条件下で精製できる。

ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４及びＰＲＯ１７６０は上記した方法でポリ-Ｈｉｓタグ形態で大腸菌でうまく発現された。

【０１４４】

実施例２２

哺乳動物細胞におけるＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードする核酸のの発現

この実施例は、哺乳動物細胞での組換え発現による潜在的にグリコシル化形態のＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７の調製を例示する。

発現ベクターとしてベクターｐＲＫ５（1989年3月15日発行のEP 307,247参照）を用いた。場合によっては、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲ

Ｏ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ＤＮＡを選択した制限酵素でｐＲＫ５に結合させ、上掲のSambrook等に記載されたような結合方法を用いてＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７コードＤＮＡの挿入を行う。得られたベクターは、ｐＲＫ５-(ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７コードＤＮＡ)と呼ばれる。

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）は、子ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分又は抗生物質を添加したＤＭＥＭなどの媒質中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化した。約１０μｇのｐＲＫ５-(ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７コードＤＮＡ)を約1μｇのＶＡ ＲＮＡ遺伝子をコードするＤＮＡ［Thimmappaya等, Cell, 31:543 (1982))］と混合し、５００μｌの1mMトリス-ＨＣｌ、0.1mMのＥＤＴＡ、0.227MのＣａＣｌ２に溶解させた。この混合物に、滴状の、500μｌの50mMのＨＥＰＥＳ（pH 7.35）、280mMのＮａＣｌ、1.5mMの$NaPO_4$を添加し、２５℃で10分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、２９３細胞に加えて３７℃で約4時間定着させた。培養培地を吸引し、2mlのＰＢＳ中20%グリセロールを３０秒間添加した。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した。

形質移入の約２４時間後、培養培地を除去し、培養培地（のみ）又は200μCi/mlの$^{35}S$-システイン及び200μCi/mlの$^{35}S$-メチオニンを含む培養培地で置換した。１２時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15%ＳＤＳゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、ＰＲＯ１

７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドの存在を現す選択された時間にわたってフィルムに暴露した。形質転換した細胞を含む培地は、更なるインキュベーションを施し（無血清培地で）、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

【０１４５】

これに換わる技術では、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードする遺伝子を、Somparyac等，Proc. 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細胞に一過的に導入してもよい。２９３細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700μgのｐＲＫ５-(ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７コードＤＮＡ)を添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、ＰＢＳで洗浄した。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した。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、5μｇ/mlウシインシュリン及び0.1μg/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した。約４日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いでＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードする発現された遺伝子を含む試料を濃縮し、透析又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製した。

他の実施態様では、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４

４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードする遺伝子をＣＨＯ細胞で発現させることができる。ｐＲＫ５-(ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７コードＤＮＡ)核酸は、$CaPO_4$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（単独）又は$^{35}S$-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。ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドの存在を同定した後、培養培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約６日間インキュベートし、次いで条件培地を収集する。次いで、発現されたＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７を含む培地を濃縮して、選択した方法によって精製することができる。

【０１４６】

また、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７ポリペプチドをコードしているエピトープタグ遺伝子を、宿主ＣＨＯ細胞において発現させてもよい。ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードしている遺伝子は

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増幅を受けてバキュロウイルス発現ベクター中にポリ-ｈｉｓタグ等の選択されたエピトープタグとインフレームで融合できる。ポリ-ｈｉｓタグＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードする遺伝子挿入物は、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）形質移入した。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ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードする発現遺伝子を含む培地を次いで濃縮し、$Ni^{2+}$-キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６及びＰＲＯ２０５は上述した方法によりＣＨＯ細胞中で安定に発現された。さらに、ＰＲＯ３６４とＰＲＯ８４６は一時的な方法によりＣＨＯ細胞中で安定に発現された。

【０１４７】

実施例２３

酵母菌でのＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードする核酸の発現

以下の方法は、酵母菌中でのＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲ

Ｏ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードする遺伝子の組換え発現を記載する。

第１に、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターからのＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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に挿入してＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードする遺伝子の細胞内発現を指示する。分泌のために、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードするＤＮＡを選択したプラスミドに、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーター、天然ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７シグナルポリペプチド又は他の哺乳類シグナルペプチドをコードするＤＮＡ、又は、例えば酵母菌アルファ因子分泌シグナル／リーダー配列、及び（必要ならば）ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７の発現のためのリンカー配列とともにクローニングすることができる。

酵母菌株ＡＢ１１０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、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、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、次いでクマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。

続いて組換えＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７は、発酵培地から遠心分離により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単離及び精製できる。ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７を含む濃縮物は、選択され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。

【０１４８】

実施例２４

バキュロウイルス感染昆虫細胞でのＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードする核酸の発現

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。

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードする配列は、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た。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（ＩｇＧのＦｃ領域など）を含む。ｐＶＬ１３９３（Navogen）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。簡単には、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７又はＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７の所定部分［膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン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。生成物は、次いで、選択され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BaculoGoldＴＭウイルスＤＮＡ（Pharmingen）を、Spodoptera frugiperda（「Ｓｆ９」）細胞（ATCC 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、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilley等, Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施した。

次いで、発現されたポリ-Ｈｉｓタグ-[ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７]は、例えば、$Ni^{2+}$-キレートアフィニティクロマトグラフィーにより以下のように精製される。抽出物は、Rupert等, 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細胞から調製した。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$MgCl_2$；0.1mMのＥＤＴＡ；10%のグリセロール；0.1%のＮＰ-４０；0.4MのＫＣｌ）中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理した。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、300mMＮａＣｌ、10%のグリセロール、pH7.8）で50倍希釈し、0.45μmフィルターで濾過した。$Ni^{2+}$-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させた。濾過した細胞抽出物は、毎分0.5mlでカラムに負荷した。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した。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のリン酸塩；300mMのＮａＣｌ、10%のグリセロール、pH6.0）で洗浄した。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のイミダゾール勾配で展開した。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）に複合した$Ni^{2+}$-ＮＴＡでのウェスタンブロットで分析した。溶離したＨｉｓ１０－タグＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７を含む分画をプールし、負荷バッファーで透析した。

【０１４９】

あるいは、ＩｇＧタグ（又はＦｃタグ）-ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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。

発現は実際には0.5-2Lのスケールであったが、容易により大きな（例えば8L）調製にスケールアップできる。タンパク質はＩｇＧ作成物（イムノアドヘシン）として発現され、そこではタンパク質細胞外領域がヒンジ、ＣＨ２及びＣＨ３ドメイン及び／又はポリ-Ｈｉｓタグ形態を含むＩｇＧ１定常領域配列に融合している。

ＰＣＲ増幅に続いて、対応するコード化配列をバキュロウイルス発現ベクター（ＩｇＧ融合物に対するpb.PH.IgG及びポリ-Ｈｉｓタグに対するpb.PH.His.c）

にサブクローニングし、そのベクター及びBaculogold(登録商標)バキュロウイルスＤＮＡ（Pharmingen）を１０５スポドプテラグルヒペルダ（Spodoptera frugiperda）（「Ｓｆ９」）細胞（ATCC CRL 1711）にリポフェクチン（Gibco BRL）を用いて同時形質移入した。pb.PH.IgG及びPH.His.cは、市販のバキュロウイルス発現ベクターｐＶＬ１３９３（Pharmingen）の修飾物であり、Ｈｉｓ又はＦｃタグ配列を含むように修飾されたポリリンカー領域を持つ。細胞を、10%のＦＢＳ（Hyclone）を添加したHinkのＴＮＭ-ＦM培地で成長させた。細胞は、２８℃で５日間インキュベートした。上清を回収し、続いて10%ＦＢＳを添加したHinkのＴＮＭ-ＦH培地におけるＳｆ９細胞感染による約10の感染効率（ＭＯＩ）での最初のウイルス増幅に用いた。細胞を２８℃で３日間インキュベートした。上清を回収し、バキュロウイルス発現ベクターにおける作成物の発現を、1mlの上清の25mLのヒスチジンタグタンパク質用のＮｉ$^{2+}$-ＮＴＡビーズ（QIAGEN）又はＩｇＧタグタンパク質用のプロテインＡセファロースCL-4Bビーズ（Pharmacia）へのバッチ結合、次いでクマシーブルー染色により周知の濃度のタンパク質標準と比較するＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析により測定した。

第１の増幅ウイルス上清をＥＳＦ-９２１培地（Expression System LLC）で成長させたＳｆ９細胞のスピナー培地（500ml）の約０．１のＭＯＩでの感染に使用した。細胞は２８℃で３日間インキュベートした。上清を回収して濾過した。バッチ結合及びＳＤＳ－ＰＡＧＥを、スピナー培地の発現が確認されるまで、必要に応じて繰り返した。

形質移入細胞からの条件培地（0.5～3L）を、遠心分離により細胞を除去し0.22ミクロンフィルターを通して濾過することにより回収した。ポリ-Ｈｉｓタグ作成物については、配列を含むタンパク質をＮｉ$^{2+}$-ＮＴＡカラム（Qiagen）を用いて精製した。精製前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのＮａＣｌ及び5mMイミダゾールを含む20mMのＨｅｐｅｓ，pH7.4バッファーで平衡化した6mlのNi$^{2+}$-NTAカラムに4-5ml/分の流速で４℃においてポンプ供給した。負荷後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのＨｅｐｅｓ、0.14MのＮａＣｌ及び4%のマンニト

ールを含む貯蔵バッファー，pH6.8中で25mlのG25 Superfine（Pharmacia）を用いて脱塩し、－８０℃で貯蔵した。

【０１５０】

タンパク質のイムノアドヘシン（Ｆｃ含有）作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、20mMのリン酸ナトリウムバッファー，pH6.8で平衡化した5mlのプロテインＡカラム（Pharmacia）に負荷した。負荷後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、100mMのクエン酸，pH3.5で溶離した。溶離したタンパク質は、1mlの画分を275mLの1Mトリスバッファー，pH9を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Ｈｉｓタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。タンパク質の均一性はＳＤＳポリアクリルアミドゲル（ＰＥＧ）電気泳動及びエドマン(Edman)分解によるＮ-末端アミノ酸配列決定により評価できる。

ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ８８５及びＰＲＯ８８７は、上記の方法でバキュロウイルス感染したＳｆ９昆虫細胞で発現された。

あるいは、修飾バキュロウイルス法をｈｉｇｈ５細胞取り込みに使用してもよい。この方法では、所望の配列をコードするＤＮＡは、Ｐｆｕ（Stratagene）等の適当な系で増幅されても、又はバキュロウイルス発現ベクターの含まれるエピトープタグの上流（5'-）に融合させてもよい。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（ＩｇＧのＦｃ領域等）を含む。種々のプラスミドを用いることができ、ｐＩＥ1-１（Novagen）等の市販のプラスミドから誘導されたプラスミドを含む。ｐＩＥ1-１及びｐＩＥ1-２ベクターは、安定に形質転換された昆虫細胞におけるバキュロウイルスｉｅ１プロモーターからの組換えタンパク質の構成的発現のために設計される。このプラスミドは複数のクローニング部位の方向においてのみ相違し、未感染昆虫細胞におけるｉｅ１媒介遺伝子発現に重要であることが知られた全てのプロモーター配列並びにｈｒ５エンハンサー成分を含む。ｐＩＥ1-１及びｐＩＥ1-２はｉｅ翻訳開始部位を含み、融合タンパク質の製造に使用できる。簡単には、所望の配列又は配列の所望の部分（膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列など）を、５'及び

３'領域に相補的なプライマーでのＰＣＲにより増幅する。５'プライマーは隣接する（選択された）制限酵素部位を導入してもよい。生成物は、次いで、選択された制限酵素で消化して発現ベクターにサブクローニングされる。例えば、ｐＩＥｌ-１の誘導体はヒトＩｇＧ（pb.PH.IgG）のＦｃ領域又は８ヒスチジン（pb.PH.His）タグ下流（3'-）を含むことができる。好ましくは、ベクター作成物は確認のために配列決定される。

【０１５１】

Ｈｉｇｈ-５細胞は、２７℃、$CO_2$無し、pen/strep無しの条件下で50%の集密度まで成長させた。150mmプレート各々について、30μgのＰＲＯポリペプチドを含むｐＩＥベースベクターを1mlのＥｘ-細胞培地（媒質：Ex-細胞401＋1/100のL-Ｇｌｕ JRH Biosciences #14401-78P（注：この媒質は光感受性））と混合し、別の管において、100μlのセルフェクチン（CellFECTIN(Gibco BRL #10362-010)(ボルテックスで混合)）を1mlのＥｘ-細胞培地と混合した。２つの溶液を混合し、室温で１５分間インキュベーションした。8mlのＥｘ-細胞培地を2mlのＤＮＡ／セルフェクチン混合物に添加し、Ｅｘ-細胞培地で１回洗浄したhigh-５細胞上に層形成させた。次いでプレートを暗中室温でインキュベートした。次いでＤＮＡ／セルフェクチン混合物を吸引し、細胞をＥｘ-細胞で１回洗浄して過剰のセルフェクチンを除去した。30mlの新鮮なＥｘ-細胞培地を添加し、細胞を２８℃で３日間インキュベートした。上清を回収して、バキュロウイルス感染ベクターでのＰＲＯポリペプチドの発現を、1mlの上清の25mLのヒスチジンタグタンパク質用の$Ni^{2+}$-ＮＴＡビーズ（QIAGEN）又はＩｇＧタグタンパク質用のプロテインＡセファロースCL-4Bビーズ（Pharmacia）へのバッチ結合、次いでクマシーブルー染色により周知の濃度のタンパク質標準と比較するＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析により測定した。

形質移入細胞からの条件培地（0.5～3L）を、遠心分離により細胞を除去し0.22ミクロンフィルターを通して濾過することにより回収した。ポリ-Ｈｉｓタグ作成物については、タンパク質作成物を$Ni^{2+}$-ＮＴＡカラム（Qiagen）を用いて精製した。精製前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのＮａＣｌ及び5mMイミダゾールを含む20mMのＨｅｐｅｓ，pH7.4

バッファーで平衡化した6mlの$Ni^{2+}$-NTAカラムに4-5ml/分の流速で４８℃においてポンプ供給した。負荷後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのＨｅｐｅｓ、0.14MのＮａＣｌ及び4%のマンニトールを含む貯蔵バッファー，pH6.8中で25mlのG25 Superfine（Pharmacia）を用いて脱塩し、－８０℃で貯蔵した。

タンパク質のイムノアドヘシン（Ｆｃ含有）作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、20mMのリン酸ナトリウムバッファー，pH6.8で平衡化した5mlのプロテインＡカラム（Pharmacia）に負荷した。負荷後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、100mMのクエン酸，pH3.5で溶離した。溶離したタンパク質は、1mlの画分を275mLの1Mトリスバッファー，pH9を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Ｈｉｓタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。ＰＲＯポリペプチドの均一性はＳＤＳポリアクリルアミドゲル及びエドマン(Edman)分解によるＮ-末端アミノ酸配列決定及び所望又は必要に応じて他の分析手法により評価できる。

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ１７６０は、ｈｉｇｈ５細胞で上記の方法により発現された。

【０１５２】

実施例２５

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７に結合する抗体の調製

この実施例は、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、Ｐ

ＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７に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、上掲のGodingに記載されている。用いられ得る免疫原は、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７を含む精製ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７融合タンパク質、細胞表面に組換えＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７をコードする遺伝子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なすことができる。

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に１－１００マイクログラムで注入したＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７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, Hamilton, MT）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-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７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。

【０１５３】

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「ポジティブ」な動物に、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７の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細胞系に融合させた。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。

ハイブリドーマ細胞は、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７に対する反応性についてのＥＬＩＳＡでスクリーニングされる。所望のＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２３８、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ８４４、ＰＲＯ８４６、ＰＲＯ１７６０、ＰＲＯ２０５、ＰＲＯ３２１、ＰＲＯ３３３、ＰＲＯ８４０、ＰＲＯ８７７、ＰＲＯ８７８、ＰＲＯ８７９、ＰＲＯ８８２、ＰＲＯ８８５又はＰＲＯ８８７に対するモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

ポジティブ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-ＰＲＯ１７９、抗-ＰＲＯ２３８、抗-ＰＲＯ３６４、抗-ＰＲＯ８４４、抗-ＰＲＯ８４６、抗-ＰＲＯ１７６０、抗-ＰＲＯ２０５、抗-ＰＲＯ３２１、抗-ＰＲＯ３３３、抗-ＰＲＯ８４０、抗-ＰＲＯ８７７、抗-ＰＲＯ８７８、抗-ＰＲＯ８７９、抗-ＰＲＯ８８２、抗-ＰＲＯ８８５又は抗-ＰＲＯ８８７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ー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ーを用いることもできる。

【０１５４】

材料の寄託

次の細胞系をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション,10801　ユニバーシティブールバール、マナッサス、ＶＡ20110-2209、米国(ATCC)に寄託した：

| 材料 | ATCC寄託番号 | 寄託日 |
|---|---|---|
| DNA16451-1388 | 209776 | 1998年4月14日 |
| DNA35600-1162 | 209370 | 1997年10月16日 |
| DNA47365-1206 | 209436 | 1997年11月7日 |
| DNA59838-1462 | 209976 | 1998年6月16日 |
| DNA44196-1353 | 209847 | 1998年5月6日 |
| DNA76532-1702 | 203473 | 1998年11月17日 |
| DNA34433 | 209719 | 1998年3月31日 |
| DNA53987 | 209858 | 1998年5月12日 |

この寄託は、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、寄託の生存可能な培養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、どれが最初であろうとも、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３７ＣＦＲ第１．１４条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

本出願の譲受人は、寄託した培養物が、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即座に取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの物質の寄託は、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、本発明を様々に改変することは、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】

【Ｆｉｇ1】　天然配列ＰＲＯ１７９ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１
）を示す図であり、配列番号：１は、ここで「ＤＮＡ１６４５１-１３８８」と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ2】　Ｆｉｇ１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）を示す図である。

【Ｆｉｇ3】　天然配列ＰＲＯ２３８ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：３）を示す図であり、配列番号：３は、ここで「ＤＮＡ３５６００-１１６２」と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ4】　Ｆｉｇ３に示した配列番号：３のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：４）を示す図である。

【Ｆｉｇ5】　天然配列ＰＲＯ３６４ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：５）を示す図であり、配列番号：５は、ここで「ＤＮＡ４７３６５-１２０６」と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ６】　Ｆｉｇ５に示した配列番号：５のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：６）を示す図である。

【Ｆｉｇ７】　天然配列ＰＲＯ８４４ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：７）を示す図であり、配列番号：７は、ここで「ＤＮＡ５９８３８-１４６２」と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ８】　Ｆｉｇ７に示した配列番号：７のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：８）を示す図である。

【Ｆｉｇ９】　天然配列ＰＲＯ８４６ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：９）を示す図であり、配列番号：９は、ここで「ＤＮＡ４４１９６-１３５３」と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ１０】　Ｆｉｇ９に示した配列番号：９のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１０）を示す図である。

【Ｆｉｇ１１】　天然配列ＰＲＯ１７６０ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１１）を示す図であり、配列番号：１１は、ここで「ＤＮＡ７６５３２-１７０２」と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ１２】　Ｆｉｇ１１に示した配列番号：１１のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１２）を示す図である。

【Ｆｉｇ１３】　天然配列ＰＲＯ２０５ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１３）を示す図であり、配列番号：１３は、ここで「ＤＮＡ３０８６８」と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ１４】　Ｆｉｇ１３に示した配列番号：１３のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１４）を示す図である。

【Ｆｉｇ１５】　天然配列ＰＲＯ３２１ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１５）を示す図であり、配列番号：１５は、ここで「ＤＮＡ３４４３３」と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ１６】　Ｆｉｇ１５に示した配列番号：１５のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１６）を示す図である。

【Ｆｉｇ１７】　天然配列ＰＲＯ３３３ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１７）を示す図であり、配列番号：１７は、ここで「ＤＮＡ４１３７４」

と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ１８】　Ｆｉｇ１７に示した配列番号：１７のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１８）を示す図である。

【Ｆｉｇ１９】　天然配列ＰＲＯ８４０ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１９）を示す図であり、配列番号：１９は、ここで「ＤＮＡ５３９８７」と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ２０】　Ｆｉｇ１９に示した配列番号：１９のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２０）を示す図である。

【Ｆｉｇ２１】　天然配列ＰＲＯ８７７ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：２１）を示す図であり、配列番号：２１は、ここで「ＤＮＡ５８１２０」と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ２２】　Ｆｉｇ２１に示した配列番号：２１のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２２）を示す図である。

【Ｆｉｇ２３】　天然配列ＰＲＯ８７８ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：２３）を示す図であり、配列番号：２３は、ここで「ＤＮＡ５８１２１」と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ２４】　Ｆｉｇ２３に示した配列番号：２３のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２４）を示す図である。

【Ｆｉｇ２５】　天然配列ＰＲＯ８７９ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：２５）を示す図であり、配列番号：２５は、ここで「ＤＮＡ５８１２２」と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ２６】　Ｆｉｇ２５に示した配列番号：２５のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２６）を示す図である。

【Ｆｉｇ２７】　天然配列ＰＲＯ８８２ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：２７）を示す図であり、配列番号：２７は、ここで「ＤＮＡ５８１２５」と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ２８】　Ｆｉｇ２７に示した配列番号：２７のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２８）を示す図である。

【Ｆｉｇ２９】　天然配列ＰＲＯ８８５ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列

番号：２９）を示す図であり、配列番号：２９は、ここで「ＤＮＡ５８１２８」と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ３０】　Ｆｉｇ２９に示した配列番号：２９のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：３０）を示す図である。

【Ｆｉｇ３１】　天然配列ＰＲＯ８８７ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：３１）を示す図であり、配列番号：３１は、ここで「ＤＮＡ５８１３０」と命名されるクローンである。

【Ｆｉｇ３２】　Ｆｉｇ３１に示した配列番号：３１のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：３２）を示す図である。

【図１】

GCGGACGCGTGGGTGAAATTGAAAATCAAGATAAAA**ATG**TTCACAATTAAGCTCCTTCTTTTTATTGTTCCTCTA
GTTATTTCCTCCAGAATTGATCAAGACAATTCATCATTTGATTCTCTATCTCCAGAGCCAAAATCAAGATTTGCT
ATGTTAGACGATGTAAAAATTTTAGCCAATGGCCTCCTTCAGTTGGGACATGGTCTTAAAGACTTTGTCCATAAG
ACGAAGGGCCAAATTAATGACATATTTCAAAAACTCAACATATTTGATCAGTCTTTTTATGATCTATCGCTGCAA
ACCAGTGAAATCAAAGAAGAAGAAAAGGAACTGAGAAGAACTACATATAAACTACAAGTCAAAAATGAAGAGGTA
AAGAATATGTCACTTGAACTCAACTCAAAACTTGAAAGCCTCCTAGAAGAAAAAATTCTACTTCAACAAAAAGTG
AAATATTTAGAAGAGCAACTAACTAACTTAATTCAAAATCAACCTGAAACTCCAGAACACCCAGAAGTAACTTCA
CTTAAAACTTTTGTAGAAAAACAAGATAATAGCATCAAAGACCTTCTCCAGACCGTGGAAGACCAATATAAACAA
TTAAACCAACAGCATAGTCAAATAAAAGAAATAGAAAATCAGCTCAGAAGGACTAGTATTCAAGAACCCACAGAA
ATTTCTCTATCTTCCAAGCCAAGAGCACCAAGAACTACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAA
CATGATGGCATTCCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGA
CCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGA
ATAGATGGATCACAAAACTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTT
TGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGG
AAAGACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTT
GCGATTACTGGCAATGTCCCCAATGCAATCCCGGAAAACAAAGATTTGGTGTTTTCTACTTGGGATCACAAAGCA
AAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTA
AATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCAAAATCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAGTCTCAAAAT
GGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAGATTCAGAAAGCTTTGAA**TGA**ACTGAG
GCAATTTAAAGGCATATTTAACCATTAACTCATTCCAAGTTAATGTGGTCTAATAATCTGGTATAAATCCTTAAG
AGAAAGCTTGAGAAATAGATTTTTTTTATCTTAAAGTCACTGTCTATTTAAGATTAAACATACAATCACATAACC
TTAAAGAATACCGTTTACATTTCTCAATCAAAATTCTTATAATACTATTTGTTTTAAATTTTGTGATGTGGGAATC
AATTTTAGATGGTCACAATCTAGATTATAATCAATAGGTGAACTTATTAAATAACTTTTCTAAATAAAAAATTTA
GAGACTTTTATTTTAAAAGGCATCATATGAGCTAATATCACAACTTTCCCAGTTTAAAAAACTAGTACTCTTGTT
AAAACTCTAAACTTGACTAAATACAGAGGACTGGTAATTGTACAGTTCTTAAATGTTGTAGTATTAATTTCAAAA
CTAAAAATCGTCAGCACAGAGTATGTGTAAAAATCTGTAATACAAATTTTTAAACTGATGCTTCATTTTGCTACA
AAATAATTTGGAGTAAATGTTTGATATGATTTATTTATGAAACCTAATGAAGCAGAATTAAATACTGTATTAAAA
TAAGTTCGCTGTCTTT

【図２】

MFTIKLLLFIVPLVISSRIDQDNSSFDSLSPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKL
NIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLLEEKILLQQKVKYLEEQLTNLIQ
NQPETPEHPEVTSLKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRT
TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWE
NYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPE
NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKML
IHPTDSESFE

| | | |
|---|---|---|
| シグナルペプチド | アミノ酸 | 1-16 |
| ロイシンジッパーパターン | アミノ酸 | 120-142;127-149 |
| N-グリコシル化部位 | アミノ酸 | 23-27;115-119;296-300;<br>357-361 |
| フィブリノーゲンβ及びγ鎖C-末端ドメイン | アミノ酸 | 271-310;312-322;331-369;<br>393-424 |

【図３】

ACTGCACTCGGTTCTATCGATTGAATTCCCCGGGGATCCTCTAGAGATCCCTCGACCTCGACCCACGCGTCCGCG
GACGCGTGGGCGGACGCGTGGGCCGGCTACCAGGAAGAGTCTGCCGAAGGTGAAGGCC**ATG**GACTTCATCACCTC
CACAGCCATCCTGCCCCTGCTGTTCGGCTGCCTGGGCGTCTTCGGCCTCTTCCGGCTGCTGCAGTGGGTGCGCGG
GAAGGCCTACCTGCGGAATGCTGTGGTGGTGATCACAGGCGCCACCTCAGGGCTGGGCAAAGAATGTGCAAAAGT
CTTCTATGCTGCGGGTGCTAAACTGGTGCTCTGTGGCCGGAATGGTGGGGCCCTAGAAGAGCTCATCAGAGAACT
TACCGCTTCTCATGCCACCAAGGTGCAGACACACAAGCCTTACTTGGTGACCTTCGACCTCACAGACTCTGGGGC
CATAGTTGCAGCAGCAGCTGAGATCCTGCAGTGCTTTGGCTATGTCGACATACTTGTCAACAATGCTGGGATCAG
CTACCGTGGTACCATCATGGACACCACAGTGGATGTGGACAAGAGGGTCATGGAGACAAACTACTTTGGCCCAGT
TGCTCTAACGAAAGCACTCCTGCCCTCCATGATCAAGAGGAGGCAAGGCCACATTGTCGCCATCAGCAGCATCCA
GGGCAAGATGAGCATTCCTTTTCGATCAGCATATGCAGCCTCCAAGCACGCAACCCAGGCTTTCTTTGACTGTCT
GCGTGCCGAGATGGAACAGTATGAAATTGAGGTGACCGTCATCAGCCCCGGCTACATCCACACCAACCTCTCTGT
AAATGCCATCACCGCGGATGGATCTAGGTATGGAGTTATGGACACCACCACAGCCCAGGGCCGAAGCCCTGTGGA
GGTGGCCCAGGATGTTCTTGCTGCTGTGGGGAAGAAGAAGAAAAGATGTGATCCTGGCTGACTTACTGCCTTCCTT
GGCTGTTTATCTTCGAACTCTGGCTCCTGGGCTCTTCTTCAGCCTCATGGCCTCCAGGGCCAGAAAAGAGCGGAA
ATCCAAGAACTCC**TAG**TACTCTGACCAGCCAGGGCCAGGGCAGAGAAGCAGCACTCTTAGGCTTGCTTACTCTAC
AAGGGACAGTTGCATTTGTTGAGACTTTAATGGAGATTTGTCTCACAAGTGGGAAAGACTGAAGAAACACATCTC
GTGCAGATCTGCTGGCAGAGGACAATCAAAAACGACAACAAGCTTCTTCCCAGGGTGAGGGGAAACACTTAAGGA
ATAAATATGGAGCTGGGGTTTAACACTAAAAACTAGAAATAAACATCTCAAACAGTAAAAAAAAAAAAAAAGGGC
GGCCGCGACTCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTAC

【図４】

MDFITSTAILPLLFGCLGVFGLFRLLQWVRGKAYLRNAVVVITGATSGLGKECAKVFYAAGAKLVLCGRNGGALE
ELIRELTASHATKVQTHKPYLVTFDLTDSGAIVAAAAEILQCFGYVDILVNNAGISYRGTIMDTTVDVDKRVMET
NYFGPVALTKALLPSMIKRRQGHIVAISSIQGKMSIPFRSAYAASKHATQAFFDCLRAEMEQYEIEVTVISPGYI
HTNLSVNAITADGSRYGVMDTTTAQGRSPVEVAQDVLAAVGKKKKDVILADLLPSLAVYLRTLAPGLFFSLMASR
ARKERKSKNS

| | | |
|---|---|---|
| シグナル配列 | アミノ酸 | 1-21 |
| 膜貫通ドメイン | アミノ酸 | 102-119;278-292 |
| N-グリコシル化部位 | アミノ酸 | 228-232 |
| グリコサミノグリカン付着部位 | アミノ酸 | 47-51 |
| チロシンキナーゼリン酸化部位 | アミノ酸 | 145-153 |
| N-ミリストイル化部位 | アミノ酸 | 44-50;105-111;238-244;<br>242-248;291-297 |
| アミド化部位 | アミノ酸 | 265-269 |
| 原核生物膜リポタンパク質脂質付着部位 | アミノ酸 | 6-17 |

【図５】

CACGCACTTCACCTGGGTCGGGATTCTCAGGTCATGAACGGTCCCAGCCACCTCCGGGGCAGGGCGGGTGAGGACG
GGGACGGGGCGTGTCCAACTGGCTGTGGGCTCTTGAAACCCGAGC**ATG**GCACAGCACGGGGCGATGGGCGCGTTT
CGGGCCCTGTGCGGCCTGGCGCTGCTGTGCGCGCTCAGCCTGGGTCAGCGCCCCACCGGGGGTCCCGGGTGCGGC
CCTGGGCGCCTCCTGCTTGGGACGGGAACGGACGCGCGCTGCTGCCGGGTTCACACGACGCGCTGCTGCCGCGAT
TACCCGGGCGAGGAGTGCTGTTCCGAGTGGGACTGCATGTGTGTCCAGCCTGAATTCCACTGCGGAGACCCTTGC
TGCACGACCTGCCGGCACCACCCTTGTCCCCCAGGCCAGGGGGTACAGTCCCAGGGGAAATTCAGTTTTGGCTTC
CAGTGTATCGACTGTGCCTCGGGGACCTTCTCCGGGGGCCACGAAGGCCACTGCAAACCTTGGACAGACTGCACC
CAGTTCGGGTTTCTCACTGTGTTCCCTGGGAACAAGACCCACAACGCTGTGTGCGTCCCAGGGTCCCCGCCGGCA
GAGCCGCTTGGGTGGCTGACCGTCGTCCTCCTGGCCGTGGCCGCCTGCGTCCTCCTCCTGACCTCGGCCCAGCTT
GGACTGCACATCTGGCAGCTGAGGAGTCAGTGCATGTGGCCCCGAGAGACCCAGCTGCTGCTGGAGGTGCCGCCGTC
GACCGAAGACGCCAGAAGCTGCCAGTTCCCCGAGGAAGAGCGGGGCGAGCGATCGGCAGAGGAGAAGGGGCGGCT
GGGAGACCTGTGGGTG**TGA**GCCTGGCCGTCCTCCGGGGCCACCGACCGCAGCCAGCCCCTCCCCAGGAGCTCCCC
AGGCCGCAGGGGCTCTGCGTTCTGCTCTGGGCCGGGCCCTGCTCCCCTGGCAGCAGAAGTGGGTGCAGGAAGGTG
GCAGTGACCAGCGCCCTGGACCATGCAGTTC

【図６】

MAQHGAMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCV
QPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCTQFGFLTVFPGNKTHN
AVCVPGSPPAEPLGWLTVVLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPEEER
GERSAEEKGRLGDLWV

| | | |
|---|---|---|
| シグナル配列 | アミノ酸 | 1-25 |
| 潜在的な膜貫通ドメイン | アミノ酸 | 162-180 |
| N-グリコシル化部位 | アミノ酸 | 146-150 |
| N-ミリストイル化部位 | アミノ酸 | 5-11;8-14;25-31;30-36;<br>33-39;118-124;122-128;156-162 |
| 原核生物膜リポタンパク質脂質付着部位 | アミノ酸 | 166-177 |
| ロイシンジッパーパターン | アミノ酸 | 171-193 |

【図７】

CAACATGGGGTCCAGCAGCTTCTTGGTCCTCATGGTGTCTCTCGTTCTTGTGACCCTGGTGGCTGTGGAAGGAGT
TAAAGAGGGTATAGAGAAAGCAGGGGTTTGCCCAGCTGACAACGTACGCTGCTTCAAGTCCGATCCTCCCCAGTG
TCACACAGACCAGGACTGTCTGGGGGAAAGGAAGTGTTGTTACCTGCACTGTGGCTTCAAGTGTGTGATTCCTGT
GAAGGAACTGGAAGAAGGAGGAAACAAGGATGAAGATGTGTCAAGGCCATACCCTGAGCCAGGATGGGAGGCCAAG
TGTCCAGGCTCCTCCTCTACCAGGTGTCCTCAGAAATGATGCTGGGTCCTTTCTACCTCTGGGGGTCACTCTCAC
TTGGCACCTGCCCCTGAGGGTCCTGAGACTTGGAATATGGAAGAAGCAATACCCAACCCCACCAAAGAAAACCTG
AGCTTGAAGTCCTTTTCCCCAAAAAGAGGGAAGAGTCACAAAAAGTCCAGACCCCAGGGACGGTACTTTCCCTCT
CTACCTGGTGCTCCTCCCTAATGCTCATGAATGGACCCCTCATGAATGAAACCAGTGCCCTTATAAGAGACCCCA
AAGAGCTGCCTTGCCCTTCTGCAATGTGTGATCACAGCTAGAAGGCACTGTCAGAGAAGAGAAACTGGTCCTCAC
CAGATGCTGAATCTGCTGGTGCCTTGATCTTGGACTTCCCAGCCTCTAGAACTGTAAGAAATAAATATTTGCTGT
TTATAATCCAA

【図８】

MGSSSFLVLMVSLVLVTLVAVEGVKEGIEKAGVCPADNVRCFKSDPPQCHTDQDCLGERKCCYLHCGFKCVIPVK
ELEEGGNKDEDVSRPYPEPGWEAKCPGSSSTRCPQK

| | | |
|---|---|---|
| シグナル配列 | アミノ酸 | 1-19 |
| N-ミリストイル化部位 | アミノ酸 | 23-29;27-33;32-38;102-108 |
| WAP-型「4-ジスルフィドコア」ドメインシグネチャー | アミノ酸 | 49-63 |

【図９】

CTCCCACGGTGTCCAGCGCCCAGAATGCGGCTTCTGGTCCTGCTATGGGGTTGCCTGCTGCTCCCAGGTTATGAA
GCCCTGGAGGGCCCAGAGGAAATCAGCGGGTTCGAAGGGGACACTGTGTCCCTGCAGTGCACCTACAGGGAAGAG
CTGAGGGACCACCGGAAGTACTGGTGCAGGAAGGGTGGGATCCTCTTCTCTCGCTGCTCTGGCACCATCTATGCA
GAAGAAGAAGGCCAGGAGACAATGAAGGGCAGGGTGTCCATCCGTGACAGCCGCCAGGAGCTCTCGCTCATTGTG
ACCCTGTGGAACCTCACCCTGCAAGACGCTGGGGAGTACTGGTGTGGGGTCGAAAAACGGGGCCCCGATGAGTCT
TTACTGATCTCTCTGTTCGTCTTTCCAGGACCCTGCTGTCCTCCCTCCCCTTCTCCCACCTTCCAGCCTCTGGCT
ACAACACGCCTGCAGCCCAAGGCAAAAGCTCAGCAAACCCAGCCCCCAGGATTGACTTCTCCTGGGCTCTACCCG
GCAGCCACCACAGCCAAGCAGGGGAAGACAGGGGCTGAGGCCCCTCCATTGCCAGGGACTTCCCAGTACGGGCAC
GAAAGGACTTCTCAGTACACAGGAACCTCTCCTCACCCAGCGACCTCTCCTCCTGCAGGGAGCTCCCGCCCCCCC
ATGCAGCTGGACTCCACCTCAGCAGAGGACACCAGTCCAGCTCTCAGCAGTGGCAGCTCTAAGCCCAGGGTGTCC
ATCCCGATGGTCCGCATACTGGCCCCAGTCCTGGTGCTGCTGAGCCTTCTGTCAGCCGCAGGCCTGATCGCCTTC
TGCAGCCACCTGCTCCTGTGGAGAAAGGAAGCTCAACAGGCCACGGAGACACAGAGGAACGAGAAGTTCTGGCTC
TCACGCTTGACTGCGGAGGAAAAGGAAGCCCCTTCCCAGGCCCCTGAGGGGGACGTGATCTCGATGCCTCCCCTC
CACACATCTGAGGAGGAGCTGGGCTTCTCGAAGTTTGTCTCAGCGTAGGGCAGGAGGCCCTCCTGGCCAGGCCAG
CAGTGAAGCAGTATGGCTGGCTGGATCAGCACCGATTCCCGAAAGCTTTCCACCTCAGCCTCAGAGTCCAGCTGC
CCGGACTCCAGGGCTCTCCCCACCCTCCCCAGGCTCTCCTCTTGCATGTTCCAGCCTGACCTAGAAGCGTTTGTC
AGCCCTGGAGCCCAGAGCGGTGGCCTTGCTCTTCCGGCTGGAGACTGGGACATCCCTGATAGGTTCACATCCCTG
GGCAGAGTACCAGGCTGCTGACCCTCAGCAGGGCCAGACAAGGCTCAGTGGATCTGGTCTGAGTTTCAATCTGCC
AGGAACTCCTGGGCCTCATGCCCAGTGTCGGACCCTGCCTTCCTCCCACTCCAGACCCCACCTTGTCTTCCCTCC
CTGGCGTCCTCAGACTTAGTCCCACGGTCTCCTGCATCAGCTGGTGATGAAGAGGAGCATGCTGGGGTGAGACTG
GGATTCTGGCTTCTCTTTGAACCACCTGCATCCAGCCCTTCAGGAAGCCTGTGAAAAACGTGATTCCTGGCCCCA
CCAAGACCCACCAAAACCATCTCTGGGCTTGGTGCAGGACTCTGAATTCTAACAATGCCCAGTGACTGTCGCACT
TGAGTTTGAGGGCCAGTGGGCCTGATGAACGCTCACACCCCTTCAGCTTAGAGTCTGCATTTGGGCTGTGACGTC
TCCACCTGCCCCAATAGATCTGCTCTGTCTGCGACACCAGATCCACGTGGGGACTCCCCTGAGGCCTGCTAAGTC
CAGGCCTTGGTCAGGTCAGGTGCACATTGCAGGATAAGCCCAGGACCGGCACAGAAGTGGTTGCCTTTNCCATTT
GCCCTCCCTGGNCCATGCCTTCTTGCCTTTGGAAAAAATGATGAAGAAAACCTTGGCTCCTTCCTTGTCTGGAAA
GGGTTACTTGCCTATGGGTTCTGGTGGCTAGAGAGAAAAGTAGAAAACCAGAGTGCACGTAGGTGTCTAACACAG
AGGAGAGTAGGAACAGGGCGGATACCTGAAGGTGACTCCGAGTCCAGCCCCCTGGAGAAGGGGTCGGGGGTGGTG
GTAAAGTAGCACAACTACTATTTTTTTTCTTTTTCCATTATTATTGTTTTTTAAGACAGAATCTCGTGCTGCTGC
CCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACGATCTGCAAACTCCGCCTCCTGGGTTCAAGTGATTCTTCTGCCTCAGCCTCCC
GAGTAGCTGGGATTACAGGCACGCACCACCACACCTGGCTAATTTTTGTACTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACC
ATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAACTCCTGACCTCAAATGAGCCTCCTGCTTCAGTCTCCCAAATTGCCGGGATTA
CAGGCATGAGCCACTGTGTCTGGCCCTATTTCCTTTAAAAAGTGAAATTAAGAGTTGTTCAGTATGCAAAACTTG
GAAAGATGGAGGAGAAAAAGAAAAGGAAGAAAAAAATGTCACCCATAGTCTCACCAGAGACTATCATTATTTCGT
TTTGTTGTACTTCCTTCCACTCTTTTCTTCTTCACATAATTTGCCGGTGTTCTTTTTACAGAGCAATTATCTTGT
ATATACAACTTTGTATCCTGCCTTTTCCACCTTATCGTTCCATCACTTTATTCCAGCACTTCTCTGTGTTTTACA
GACCTTTTTATAAATAAAATGTTCATCAGCTGCATAAAAAAAAAAAAAA

【図１０】

MRLLVLLWGCLLLPGYEALEGPEEISGFEGDTVSLQCTYREELRDHRKYWCRKGGILFSRCSGTIYAEEEGQETM
KGRVSIRDSRQELSLIVTLWNLTLQDAGEYWCGVEKRGPDESLLISLFVFPGPCCPPSPSPTFQPLATTRLQPKA
KAQQTQPPGLTSPGLYPAATTAKQGKTGAEAPPLPGTSQYGHERTSQYTGTSPHPATSPPAGSSRPPMQLDSTSA
EDTSPALSSGSSKPRVSIPMVRILAPVLVLLSLLSAAGLIAFCSHLLLWRKEAQQATETQRNEKFWLSRLTAEEK
EAPSQAPEGDVISMPPLHTSEEELGFSKFVSA

| | | |
|---|---|---|
| シグナル配列 | アミノ酸 | 1-17 |
| 膜貫通ドメイン | アミノ酸 | 248-269 |
| N-グリコシル化部位 | アミノ酸 | 96-100 |
| フィブリノーゲンβ及びγ鎖C-末端ドメイン | アミノ酸 | 104-114 |
| Ig様V-型ドメイン | アミノ酸 | 13-128 |

【図１１】

GCGACGCGCGGCGGGGCGGCGAGAGGAAACGCGGCGCCGGGCCGGGCCCGGCCCTGGAG**ATG**GTCCCCGGCGCCG
CGGGCTGGTGTTGTCTCGTGCTCTGGCTCCCCGCGTGCGTCGCGGCCCACGGCTTCCGTATCCATGATTATTTGT
ACTTTCAAGTGCTGAGTCCTGGGGACATTCGATACATCTTCACAGCCACACCTGCCAAGGACTTTGGTGGTATCT
TTCACACAAGGTATGAGCAGATTCACCTTGTCCCCGCTGAACCTCCAGAGGCCTGCGGGGAACTCAGCAACGGTT
TCTTCATCCAGGACCAGATTGCTCTGGTGGAGAGGGGGGGCTGCTCCTTCCTCTCCAAGACTCGGGTGGTCCAGG
AGCACGGCGGGCGGGCGGTGATCATCTCTGACAACGCAGTTGACAATGACAGCTTCTACGTGGAGATGATCCAGG
ACAGTACCCAGCGCACAGCTGACATCCCCGCCCTCTTCCTGCTCGGCCGAGACGGCTACATGATCCGCCGCTCTC
TGGAACAGCATGGGCTGCCATGGGCCATCATTTCCATCCCAGTCAATGTCACCAGCATCCCCACCTTTGAGCTGC
TGCAACCGCCCTGGACCTTCTGG**TAG**AAGAGTTTGTCCCACATTCCAGCCATAAGTGACTCTGAGCTGGGAAGGG
GAAACCCAGGAATTTTGCTACTTGGAATTTGGAGATAGCATCTGGGGACAAGTGGAGCCAGGTAGAGGAAAAGGG
TTTGGGCGTTGCTAGGCTGAAAGGGAAGCCACACCACTGGCCTTCCCTTCCCCAGGGCCCCCAAGGGTGTCTCAT
GCTACAAGAAGAGGCAAGAGACAGGCCCCAGGGCTTCTGGCTAGAACCCGAAACAAAAGGAGCTGAAGGCAGGTG
GCCTGAGAGCCATCTGTGACCTGTCACACTCACCTGGCTCCAGCCTCCCCTACCCAGGGTCTCTGCACAGTGACC
TTCACAGCAGTTGTTGGAGTGGTTTAAAGAGCTGGTGTTTGGGGACTCAATAAACCCTCACTGACTTTTTAGCAA
TAAAGCTTCTCATCAGGGTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図１２】

MVPGAAGWCCLVLWLPACVAAHGFRIHDYLYFQVLSPGDIRYIFTATPAKDFGGIFHTRYEQIHLVPAEPPEACG
ELSNGFFIQDQIALVERGGCSFLSKTRVVQEHGGRAVIISDNAVDNDSFYVEMIQDSTQRTADIPALFLLGRDGY
MIRRSLEQHGLPWAIISIPVNVTSIPTFELLQPPWTFW

| | | |
|---|---|---|
| シグナルペプチド | アミノ酸 | 1-20 |
| N-グリコシル化部位 | アミノ酸 | 121-125;171-175 |
| チロシンキナーゼリン酸化部位 | アミノ酸 | 25-32 |
| N-ミリストイル化部位 | アミノ酸 | 54-60;160-166 |

【図１３】

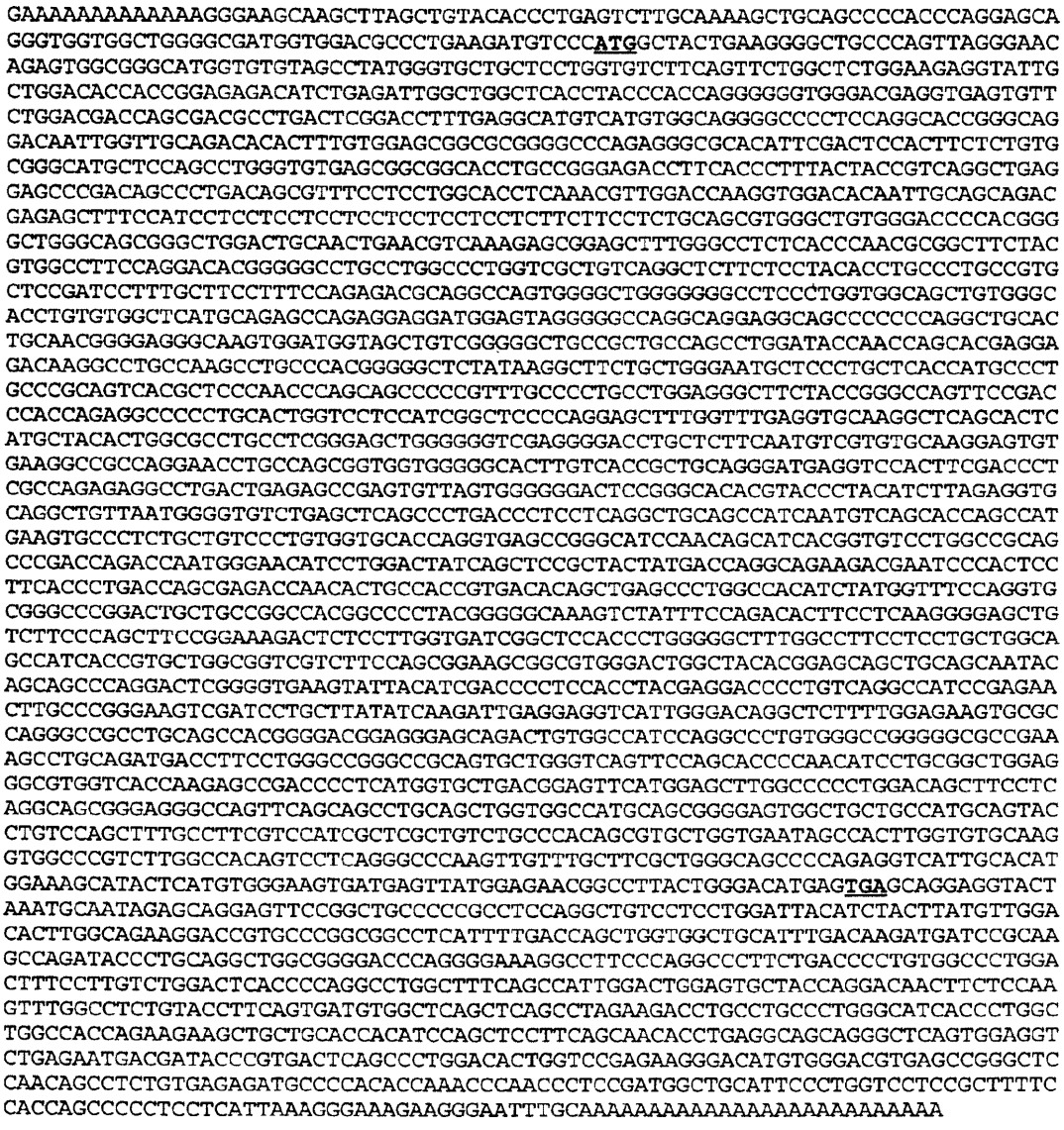
CCCACGCGTCCGGACAAACTGGAGGTGAAAGGAGCTGGTACTGTCCACTGTGCTGTCGGTGCTGAACCTGAGACG
CGAGCGGACCAGTTGCTCCAGCACCTGAAGGCAACGCCCTCTTGCACCCTCTGTGCCCTGTGGGACCCGCTTCAC
CAACAGGACCCATATCAACTTGACAAAGGAGTGTGGTATCGGACGTGGGAGAGAGTCCTCTGTTTGCCACCTGGG
CGCTCATTCAGGCGTGACTTTGGAGATTTCTATAGTTTTAGACCAAACTATTTTTTTTTCCCCAGCTAAGACGAT
CTTTTGAGAGTTTTTTTTTTTATTGTGATTTATATTTCCACAGCGTTTAGGAATCTTTCTGGGGGACTTTTGTGA
CTGTTAAAATAAGGTGAAAAGCAATAAGG**ATG**TTTAAGTGCTGGTCAGTTGTCTTGGTTCTCGGATTCATTTTTC
TGGAGTCGGAAGGAAGGCCAACCAAAGAAGGAGGATATGGCCTTAAATCCTATCAGCCTCTAATGAGATTGCGAC
ATAAGCAGGAAAAAAATCAAGAAAGTTCAAGAGTCAAAGGATTTATGATTCAGGATGGCCCTTTTGGATCTTGTG
AAAATAAGTACTGTGGTTTGGGAAGACACTGTGTTACCAGCAGAGAGACAGGGCAAGCAGAATGTGCCTGTATGG
ACCTTTGCAAACGTCACTACAAACCTGTGTGTGGATCTGACGGAGAATTCTATGAAAACCACTGTGAAGTGCACA
GAGCTGCTTGCCTGAAAAAACAAAAGATTACCATTGTTCACAATGAAGACTGCTTCTTTAAAGGAGATAAGTGCA
AGACTACTGAATACAGCAAGATGAAAAATATGCTATTAGATTTACAAAATCAAAAATATATTATGCAAGAAAATG
AAAATCCTAATGGCGACGACATATCTCGGAAGAAGCTATTGGTGGATCAAATGTTTAAATATTTTGATGCAGACA
GTAATGGACTTGTAGATATTAATGAACTAACTCAGGTGATAAAACAGGAAGAACTTGGCAAGGATCTCTTTGATT
GTACTTTGTATGTTCTATTGAAATATGATGATTTTAATGCTGACAAGCACCTGGCTCTTGAAGAATTTTATAGAG
CATTCCAAGTGATCCAGTTGAGTCTGCCAGAAGATCAGAAACTAAGCATCACTGCAGCAACTGTGGGACAAAGTG
CTGTTCTGAGCTGTGCCATTCAAGGAACCCTGAGACCTCCCATTATCTGGAAAAGGAACAATATTATTCTAAATA
ATTTAGATTTGGAAGACATCAATGACTTTGGAGATGATGGGTCCTTGTATATTACTAAGGTTACCACAACTCACG
TTGGCAATTACACCTGCTATGCAGATGGCTATGAACAAGTCTATCAGACTCACATCTTCCAAGTGAATGTTCCTC
CAGTCATCC

【図１４】

MFKCWSVVLVLGFIFLESEGRPTKEGGYGLKSYQPLMRLRHKQEKNQESSRVKGFMIQDGPFGSCENKYCGLGRH
CVTSRETGQAECACMDLCKRHYKPVCGSDGEFYENHCEVHRAACLKKQKITIVHNEDCFFKGDKCKTTEYSKMKN
MLLDLQNQKYIMQENENPNGDDISRKKLLVDQMFKYFDADSNGLVDINELTQVIKQEELGKDLFDCTLYVLLKYD
DFNADKHLALEEFYRAFQVIQLSLPEDQKLSITAATVGQSAVLSCAIQGTLRPPIIWKRNNIILNNLDLEDINDF
GDDGSLYITKVTTTHVGNYTCYADGYEQVYQTHIFQVNVPPVI

| | | |
|---|---|---|
| シグナル配列 | アミノ酸 | 1-20 |
| N-グリコシル化部位 | アミノ酸 | 318-322 |
| チロシンキナーゼリン酸化部位 | アミノ酸 | 21-29;211-220 |
| N-ミリストイル化部位 | アミノ酸 | 63-69;83-89;317-323 |
| 原核生物膜リポタンパク質脂質付着部位 | アミノ酸 | 260-271 |

【図１５】


GAAAAAAAAAAAAAGGGAAGCAAGCTTAGCTGTACACCCTGAGTCTTGCAAAAGCTGCAGCCCCACCCAGGAGCA
GGGTGGTGGCTGGGGCGATGGTGGACGCCCTGAAGATGTCCCATGGCTACTGAAGGGGCTGCCCAGTTAGGGAAC
AGAGTGGCGGGCATGGTGTGTAGCCTATGGGTGCTGCTCCTGGTGTCTTCAGTTCTGGCTCTGGAAGAGGTATTG
CTGGACACCACCGGAGAGACATCTGAGATTGGCTGGCTCACCTACCCACCAGGGGGGTGGGACGAGGTGAGTGTT
CTGGACGACCAGCGACGCCTGACTCGGACCTTTGAGGCATGTCATGTGGCAGGGGCCCCTCCAGGCACCGGGCAG
GACAATTGGTTGCAGACACACTTTGTGGAGCGGCGCGGGGCCCAGAGGGCGCACATTCGACTCCACTTCTCTGTG
CGGGCATGCTCCAGCCTGGGTGTGAGCGGCGGCACCTGCCGGGAGACCTTCACCCTTTACTACCGTCAGGCTGAG
GAGCCCGACAGCCCTGACAGCGTTTCCTCCTGGCACCTCAAACGTTGGACCAAGGTGGACACAATTGCAGCAGAC
GAGAGCTTTCCATCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCTTCTTCCTCTGCAGCGTGGGCTGTGGGACCCCACGGG
GCTGGGCAGCGGGCTGGACTGCAACTGAACGTCAAAGAGCGGAGCTTTGGGCCTCTCACCCAACGCGGCTTCTAC
GTGGCCTTCCAGGACACGGGGGCCTGCCTGGCCCTGGTCGCTGTCAGGCTCTTCTCCTACACCTGCCCTGCCGTG
CTCCGATCCTTTGCTTCCTTTCCAGAGACGCAGGCCAGTGGGGCTGGGGGGGCCTCCCTGGTGGCAGCTGTGGGC
ACCTGTGTGGCTCATGCAGAGCCAGAGGAGGATGGAGTAGGGGGCCAGGCAGGAGGCAGCCCCCCCAGGCTGCAC
TGCAACGGGGAGGGCAAGTGGATGGTAGCTGTCGGGGGCTGCCGCTGCCAGCCTGGATACCAACCAGCACGAGGA
GACAAGGCCTGCCAAGCCTGCCCACGGGGGCTCTATAAGGCTTCTGCTGGGAATGCTCCCTGCTCACCATGCCCT
GCCCGCAGTCACGCTCCCAACCCAGCAGCCCCCGTTTGCCCCTGCCTGGAGGGCTTCTACCGGGCCAGTTCCGAC
CCACCAGAGGCCCCCTGCACTGGTCCTCCATCGGCTCCCCAGGAGCTTTGGTTTGAGGTGCAAGGCTCAGCACTC
ATGCTACACTGGCGCCTGCCTCGGGAGCTGGGGGGTCGAGGGGACCTGCTCTTCAATGTCGTGTGCAAGGAGTGT
GAAGGCCGCCAGGAACCTGCCAGCGGTGGTGGGGGCACTTGTCACCGCTGCAGGGATGAGGTCCACTTCGACCCT
CGCCAGAGAGGCCTGACTGAGAGCCGAGTGTTAGTGGGGGGACTCCGGGCACACGTACCCTACATCTTAGAGGTG
CAGGCTGTTAATGGGGTGTCTGAGCTCAGCCCTGACCCTCCTCAGGCTGCAGCCATCAATGTCAGCACCAGCCAT
GAAGTGCCCTCTGCTGTCCCTGTGGTGCACCAGGTGAGCCGGGCATCCAACAGCATCACGGTGTCCTGGCCGCAG
CCCGACCAGACCAATGGGAACATCCTGGACTATCAGCTCCGCTACTATGACCAGGCAGAAGACGAATCCCACTCC
TTCACCCTGACCAGCGAGACCAACACTGCCACCGTGACACAGCTGAGCCCTGGCCACATCTATGGTTTCCAGGTG
CGGGCCCGGACTGCTGCCGGCCACGGCCCCTACGGGGGCAAAGTCTATTTCCAGACACTTCCTCAAGGGGAGCTG
TCTTCCCAGCTTCCGGAAAGACTCTCCTTGGTGATCGGCTCCACCCTGGGGGCTTTGGCCTTCCTCCTGCTGGCA
GCCATCACCGTGCTGGCGGTCGTCTTCCAGCGGAAGCGGCGTGGGACTGGCTACACGGAGCAGCTGCAGCAATAC
AGCAGCCCAGGACTCGGGGTGAAGTATTACATCGACCCCTCCACCTACGAGGACCCCTGTCAGGCCATCCGAGAA
CTTGCCCGGGAAGTCGATCCTGCTTATATCAAGATTGAGGAGGTCATTGGGACAGGCTCTTTTGGAGAAGTGCGC
CAGGGCCGCCTGCAGCCACGGGGACGGAGGGAGCAGACTGTGGCCATCCAGGCCCTGTGGGCCGGGGGCGCCGAA
AGCCTGCAGATGACCTTCCTGGGCCGGGCCGCAGTGCTGGGTCAGTTCCAGCACCCCAACATCCTGCGGCTGGAG
GGCGTGGTCACCAAGAGCCGACCCCTCATGGTGCTGACGGAGTTCATGGAGCTTGGCCCCCTGGACAGCTTCCTC
AGGCAGCGGGAGGGCCAGTTCAGCAGCCTGCAGCTGGTGGCCATGCAGCGGGGAGTGGCTGCTGCCATGCAGTAC
CTGTCCAGCTTTGCCTTCGTCCATCGCTCGCTGTCTGCCCACAGCGTGCTGGTGAATAGCCACTTGGTGTGCAAG
GTGGCCCGTCTTGGCCACAGTCCTCAGGGCCCAAGTTGTTTGCTTCGCTGGGCAGCCCCAGAGGTCATTGCACAT
GGAAAGCATACTCATGTGGGAAGTGATGAGTTATGGAGAACGGCCTTACTGGGACATGAGTGAGCAGGAGGTACT
AAATGCAATAGAGCAGGAGTTCCGGCTGCCCCCGCCTCCAGGCTGTCCTCCTGGATTACATCTACTTATGTTGGA
CACTTGGCAGAAGGACCGTGCCCGGCGGCCTCATTTTGACCAGCTGGTGGCTGCATTTGACAAGATGATCCGCAA
GCCAGATACCCTGCAGGCTGGCGGGGACCCAGGGGAAAGGCCTTCCCAGGCCCTTCTGACCCCTGTGGCCCTGGA
CTTTCCTTGTCTGGACTCACCCCAGGCCTGGCTTTCAGCCATTGGACTGGAGTGCTACCAGGACAACTTCTCCAA
GTTTGGCCTCTGTACCTTCAGTGATGTGGCTCAGCTCAGCCTAGAAGACCTGCCTGCCCTGGGCATCACCCTGGC
TGGCCACCAGAAGAAGCTGCTGCACCACATCCAGCTCCTTCAGCAACACCTGAGGCAGCAGGGCTCAGTGGAGGT
CTGAGAATGACGATACCCGTGACTCAGCCCTGGACACTGGTCCGAGAAGGGACATGTGGGACGTGAGCCGGGCTC
CAACAGCCTCTGTGAGAGATGCCCCACACCAAACCCAACCCTCCGATGGCTGCATTCCCTGGTCCTCCGCTTTTC
CACCAGCCCCCTCCTCATTAAAGGGAAAGAAGGGAATTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図１６】

MATEGAAQLGNRVAGMVCSLWVLLLVSSVLALEEVLLDTTGETSEIGWLTYPPGGWDEVSVLDDQRRLTRTFEAC
HVAGAPPGTGQDNWLQTHFVERRGAQRAHIRLHFSVRACSSLGVSGGTCRETFTLYYRQAEEPDSPDSVSSWHLK
RWTKVDTIAADESFPSSSSSSSSSSSSAAWAVGPHGAGQRAGLQLNVKERSFGPLTQRGFYVAFQDTGACLALVA
VRLFSYTCPAVLRSFASFPETQASGAGGASLVAAVGTCVAHAEPEEDGVGGQAGGSPPRLHCNGEGKWMVAVGGC
RCQPGYQPARGDKACQACPRGLYKASAGNAPCSPCPARSHAPNPAAPVCPCLEGFYRASSDPPEAPCTGPPSAPQ
ELWFEVQGSALMLHWRLPRELGGRGDLLFNVVCKECEGRQEPASGGGGTCHRCRDEVHFDPRQRGLTESRVLVGG
LRAHVPYILEVQAVNGVSELSPDPPQAAAINVSTSHEVPSAVPVVHQVSRASNSITVSWPQPDQTNGNILDYQLR
YYDQAEDESHSFTLTSETNTATVTQLSPGHIYGFQVRARTAAGHGPYGGKVYFQTLPQGELSSQLPERLSLVIGS
TLGALAFLLLAAITVLAVVFQRKRRGTGYTEQLQQYSSPGLGVKYYIDPSTYEDPCQAIRELAREVDPAYIKIEE
VIGTGSFGEVRQGRLQPRGRREQTVAIQALWAGGAESLQMTFLGRAAVLGQFQHPNILRLEGVVTKSRPLMVLTE
FMELGPLDSFLRQREGQFSSLQLVAMQRGVAAAMQYLSSFAFVHRSLSAHSVLVNSHLVCKVARLGHSPQGPSCL
LRWAAPEVIAHGKHTHVGSDELWRTALLGHE

| | | |
|---|---|---|
| シグナル配列 | アミノ酸 | 1-31 |
| 膜貫通ドメイン | アミノ酸 | 217-234;598-618 |
| N-グリコシル化部位 | アミノ酸 | 481-485 |
| グリコサミノグリカン付着部位 | アミノ酸 | 249-253;419-423 |
| cAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位 | アミノ酸 | 66-70;150-154;624-628 |
| チロシンキナーゼリン酸化部位 | アミノ酸 | 644-673;664-671 |
| N-ミリストイル化部位 | アミノ酸 | 10-16;15-21;79-85;99-105;<br>118-124;188-194;192-198;218-224;250-256;<br>261-267;275-281;276-282;298-304;321-327;<br>328-334;420-426;421-427;440-446;449-455;<br>599-605;626-632;708-714;766-772;779-785 |
| アミド化部位 | アミノ酸 | 693-697 |
| 細胞付着配列 | アミノ酸 | 310-313;399-402 |

【図１７】

TGCCCCTGCTGCTGCTGCCCCTGCTGTGGGGGGGGTCCCTGCAGGAGAAGCCAGTGTACGAGCTGCAAGTGCAGA
AGTCGGTGACGGTGCAGGAGGGCCTGTGCGTCCTTGTGCCCTGCTCCTTCTCTTACCCCTGGAGATCCTGGTATT
CCTCTCCCCCCACTCTACGTCTACTGGTTCCGGGACGGGGAGATCCCATACTACGCTGAGGTTGTGGCCACAAACA
ACCCAGACAGAAGAGTGAAGCCAGAGACCCAGGGCCGATTCCGCCTCCTTGGGGATGTCCAGAAGAAGAACTGCTCC
CTGAGCATCGGAGATGCCAGAATGGAGGACACGGGAAGCTATTTCTTCCGCGTGGAGAGAGGAAGGGATGTAAAA
TATAGCTACCAACAGAATAAGCTGAACTTGGAGGTGACAGCCCTGATAGAGAAACCCGACATCCACTTTCTGGAG
CCTCTGGAGTCCGGCCGCCCCACAAGGCTGAGCTGCAGCCTTCCAGGATCCTGTGAAGCGGGACCACCTCTCACA
TTCTCCTGGACGGGGAATGCCCTCAGCCCCCTGGACCCTGAGACCACCCGCTCCTCGGAGCTCACCCTCACCCCC
AGGCCCGAGGACCATGGCACCAACCTCACCTGTCAGGTGAAACGCCAAGGAGCTCAGGTGACCACGGAGAGAACT
GTCCAGCTCAATGTCTCCTATGCTCCACAGAACCTCGCCATCAGCATCTTCTTCAGAAATGGCACAGGCACAGCC
CTGCGGATCCTGAGCAATGGCATGTCGGTGCCCATCCAGGAGGGCCAGTCCCTGTTCCTCGCCTGCACAGTTGAC
AGCAACCCCCCTGCCTCACTGAGCTGGTTCCGGGAGGGAAAAGCCCTCAATCCTTCCCAGACCTCAATGTCTGGG
ACCCTGGAGCTGCCTAACATAGGAGCTAGAGAGGGAGGGGAATTCACCTGCCGGGTTCAGCATCCGCTGGGCTCC
CAGCACCTGTCCTTCATCCTTTCTGTGCAGAGAAGCTCCTCTTCCTGCATATGTGTAACTGAGAAACAGCAGGGT
TCCTGGCCCCTCGTCCTCACCCTGATCAGGGGGGCTCTCATGGGGGCTGGCTTCCTCCTCACCTATGGCCTCACC
TGGATCTACTATACCAGGTGTGGAGGCCCCCAGCAGAGCAGGGCTGAGAGGCCTGGC**TGA**GCCCCTCCCGCTCAA
GACAGAATTGAGGTGTGGACACTTAGCCCTGTGGGACACATGCAGGACATCACTGTCAGCTTCTTTCTGGAAGCT
CACATCCCACTGACTACCCCTCTTTTCCTTCCTGCCCCATACCCCTTCTACTTATTCCCCTCTGCTTGTGAGTCT
TGCCCCANCACACCTGCATCCCCATCTGCANCCCATCCCCTCTCCANCTGCCCTTCTCTTCCCTCTCCATCCANC
ATCTCCAGCCCTGTGAAGGGAATGTACTTTCGGTCCTATACCCCATTACCATTACCAAAAGTTACCTTTTTTTTT
TTTTT

【図１８】

PLLLLPLLWGGSLQEKPVYELQVQKSVTVQEGLCVLVPCSFSYPWRSWYSSPPLYVYWFRDGEIPYYAEVVATNN
PDRRVKPETQGRFRLLGDVQKKNCSLSIGDARMEDTGSYFFRVERGRDVKYSYQQNKLNLEVTALIEKPDIHFLE
PLESGRPTRLSCSLPGSCEAGPPLTFSWTGNALSPLDPETTRSSELTLTPRPEDHGTNLTCQVKRQGAQVTTERT
VQLNVSYAPQNLAISIFFRNGTGTALRILSNGMSVPIQEGQSLFLACTVDSNPPASLSWFREGKALNPSQTSMSG
TLELPNIGAREGGEFTCRVQHPLGSQHLSFILSVQRSSSSCICVTEKQQGSWPLVLTLIRGALMGAGFLLTYGLT
WIYYTRCGGPQQSRAERPG

| | | |
|---|---|---|
| シグナル配列 | アミノ酸 | 1-14 |
| 膜貫通ドメイン | アミノ酸 | 359-376 |
| N-グリコシル化部位 | アミノ酸 | 98-102;208-212;229-233;<br>245-249 |
| チロシンキナーゼリン酸化部位 | アミノ酸 | 60-68;107-115;120-127 |
| N-ミリストイル化部位 | アミノ酸 | 166-172;206-212;217-223;<br>246-252;308-314;312-318;361-367 |
| 免疫グロブリン及び組織主要組織適合複合体タンパク質シグネチャー | アミノ酸 | 315-323 |

【図１９】

GCCTAGCCAGGCCAAGA**ATG**CAATTGCCCCGGTGGTGGGAGCTGGGAGACCCCTGTGCTTGGACGGGACAGGGTCGG
GGGACACGCAGG**ATG**AGCCCCGCGACCACTGGCACATTCTTGCTGACAGTGTACAGTATTTTCTCCAAGGTACAC
TCCGATCGGAATGTATACCCATCAGCAGGTGTCCTCTTTGTTCATGTTTTGGAAAGAGAATATTTTAAGGGGGAA
TTTCCACCTTACCCAAAACCTGGCGAGATTAGTAATGATCCCATAACATTTAATACAAATTTAATGGGTTACCCA
GACCGACCTGGATGGCTTCGATATATCCAAAGGACACCATATAGTGATGGAGTCCTATATGGGTCCCCAACAGCT
GAAAATGTGGGGAAGCCAACAATCATTGAGATAACTGCCTACAACAGGCGCACCTTTGAGACTGCAAGGCATAAT
TTGATAATTAATATAATGTCTGCAGAAGACTTCCCGTTGCCATATCAAGCAGAATTCTTCATTAAGAATATGAAT
GTAGAAGAAATGTTGGCCAGTGAGGTTCTTGGAGACTTTCTTGGCGCAGTGAAAAATGTGTGGCAGCCAGAGCGC
CTGAACGCCATAAACATCACATCGGCCCTAGACAGGGGTGGCAGGGTGCCACTTCCCATTAATGACCTGAAGGAG
GGCGTTTATGTCATGGTTGGTGCAGATGTCCCGTTTTCTTCTTGTTTACGAGAAGTTGAAAATCCACAGAATCAA
TTGAGATGTAGTCAAGAAATGGAGCCTGTAATAACATGTGATAAAAAATTTCGTACTCAATTTTACATTGACTGG
TGCAAAATTTCATTGGTTGATAAAACAAAGCAAGTGTCCACCTATCAGGAAGTGATTCGTGGAGAGGGGATTTTA
CCTGATGGTGGAGAATACAAACCCCCTTCTGATTCTTTGAAAAGCAGAGACTATTACACGGATTTCCTAATTACA
CTGGCTGTGCCCTCGGCAGTGGCACTGGTCCTTTTTCTAATACTTGCTTATATCATGTGCTGCCGACGGGAAGGC
GTGGAAAAGAGAAACATGCAAACACCAGACATCCAACTGGTCCATCACAGTGCTATTCAGAAATCTACCAAGGAG
CTTCGAGACATGTCCAAGAATAGAGAGATAGCATGGCCCCTGTCAACGCTTCCTGTGTTCCACCCTGTGACTGGG
GAAATCATACCTCCTTTACACACAGACAACTATGATAGCACAAACATGCCATTGATGCAAACGCAGCAGAACTTG
CCACATCAGACTCAGATTCCCCAACAGCAGACTACAGGTAAATGGTATCCC**TGA**AGAAAGAAAACTGACTGAAGC
AATGAATTTATAATCAGACAATATAGCAGTTACATCACATTTCTTTTCTCTTCCAATAATGCATGAGCTTTTCTG
GCATATGTTATGCATGTTGGCAGTATTAAGTGTATACCAAATAATACAACATAACTTTCATTTTACTAATGTATT
TTTTTGTACTTAAAGCATTTTTGACAATTTGTAAAACATTGATGACTTTATATTTGTTACAATAAAAGTTGATCT
TTAAAATAAATATTATTAATGAAGCCTAAAAAAAAAAA

【図２０】

MQLPRWWELGDPCAWTGQGRGTRRMSPATTGTFLLTVYSIFSKVHSDRNVYPSAGVLFVHVLEREYFKGEFPPYP
KPGEISNDPITFNTNLMGYPDRPGWLRYIQRTPYSDGVLYGSPTAENVGKPTIIEITAYNRRTFETARHNLIINI
MSAEDFPLPYQAEFFIKNMNVEEMLASEVLGDFLGAVKNVWQPERLNAINITSALDRGGRVPLPINDLKEGVYVM
VGADVPFSSCLREVENPQNQLRCSQEMEPVITCDKKFRTQFYIDWCKISLVDKTKQVSTYQEVIRGEGILPDGGE
YKPPSDSLKSRDYYTDFLITLAVPSAVALVLFLILAYIMCCRREGVEKRNMQTPDIQLVHHSAIQKSTKELRDMS
KNREIAWPLSTLPVFHPVTGEIIPPLHTDNYDSTNMPLMQTQQNLPHQTQIPQQQTTGKWYP

| | | |
|---|---|---|
| シグナル配列 | アミノ酸 | 1-46 |
| 膜貫通ドメイン | アミノ酸 | 319-338 |
| N-グリコシル化部位 | アミノ酸 | 200-204 |
| cAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位 | アミノ酸 | 23-27 |
| チロシンキナーゼリン酸化部位 | アミノ酸 | 43-52 |
| N-ミリストイル化部位 | アミノ酸 | 17-23;112-118;116-122;185-191 |

【図２１】

AGCTCCAGCTGACCACCGGAATGGCCTGTTCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTCCCACCAGGCCAGCTCTCCTCCCA
CAACAGCTTCCCACAGC**ATG**AAGATCTCCGTGGCTGCCATTCCCTTCTTCCTCCTCATCACCATCGCCCTAGGGACC
AAGACTGAATCCTCCTCACGGGGACCTTACCACCCCTCAGAGTGCTGCTTCACCTACACTACCTACAAGATCCCG
CGTCAGCGGATTATGGATTACTATGAGACCAACAGCCAGTGCTCCAAGCCCGGAATTGTCTTCATCACCAAAAGGGG
CCATTCCGTCTGTACCAACCCCAGTGACAAGTGGGTCCAGGACTATATCAAGGACATGAAGGAGAAC**TGA**GTGAC
CCAGAAGGGGTGGCGAAGGCACAGCTCAGAGACATAAAGAGAAGATGCCAAGGCCCCCTCCTCCACCCACCGCTA
ACTCTCAGCCCCAGTCACCCTCTT

【図２２】

MKISVAAIPFFLLITIALGTKTESSSRGPYHPSECCFTYTTYKIPRQRIMDYYETNSQCSKPGIVFITKRGHSVC
TNPSDKWVQDYIKDMKEN

| | | |
|---|---|---|
| シグナル配列 | アミノ酸 | 1-22 |

【図２３】

**ATG**GCTCCGACATCTCTGTCGTGGCTGCTCCGCTTGGCCACCTTCTGCCATCTGACTGTCCTGCTGGCTGGACAG
CACCACGGTGTGACGAAATGCAACATCACGTGCAGCAAGATGACATCAAAGATACCTGTAGCTTTGCTCATCCAC
TATCAACAGAACCAGGCATCATGCGGCAAACGCGCAATCATCTTGGAGACGAGACAGCACAGGCTGTTCTGTGCC
GACCCGAAGGAGCAATGGGTCAAGGACGCGATGCAGCATCTGGACCGCCAGGCTGCTGCCCTAACTCGAAATGGC
GGCACCTTCGAGAAGCAGATCGGCGAGGTGAAGCCCAGGACCACCCCTGCCGCCGGGGGAATGGACGAGTCTGTG
GTCCTGGAGCCCGA

【図２４】

MAPTSLSWLLRLATFCHLTVLLAGQHHGVTKCNITCSKMTSKIPVALLIHYQQNQASCGKRAIILETRQHRLFCA
DPKEQWVKDAMQHLDRQAAALTRNGGTFEKQIGEVKPRTTPAAGGMDESVVLEP

| | | |
|---|---|---|
| シグナル配列 | アミノ酸 | 1-18 |
| N-グリコシル化部位 | アミノ酸 | 33-37 |
| N-ミリストイル化部位 | アミノ酸 | 24-30;28-34;120-126 |
| アミド化部位 | アミノ酸 | 58-62 |

【図２５】

CCCACAGGAGGAATGAAGGTCTCCGTGGCTGCCCTCTCCTGCCTCATGCTTGTTGCTGTCCTTGGATCCCAGGCC
CAGTTCACAAATGATGCAGAGACAGAGTTAATGATGTCAAAGCTTCCACTGGAAAATCCAGTAGTTCTGAACAGC
TTTCACTTTGCTGCTGACTGCTGCACCTCCTACATCTCACAAAGCATCCCGTGTTCACTCATGAAAAGTTATTTT
GAAACGAGCAGCGAGTGCTCCAAGCCAGGTGTCATCTTCCTCACCAAGAAGGGGCGGCAAGTCTGTGCCAAACCCA
GTGGTCCGGGAGTTCAGGATTGCATGAAAAAGCTGAAGCCCTACTCAATATAATAATAAAGAGACAAAGAGGCCA
GCCACCCACCTCCAACACCTCCTAGATCTGATC

【図２６】

MKVSVAALSCLMLVAVLGSQAQFTNDAETELMMSKLPLENPVVLNSFHFAADCCTSYISQSIPCSLMKSYFETSS
ECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDCMKKLKPYSI

| | | |
|---|---|---|
| シグナル配列 | アミノ酸 | 1-21 |
| グリコサミノグリカン付着部位 | アミノ酸 | 97-101 |
| N-ミリストイル化部位 | アミノ酸 | 100-106 |

【図２７】

GTGAAGGGAGCCGGGATCAGCCAGGGGCCAGCATGAGCCGGAGGGAGGGAAGTCTGGAAGACCCCCAGACTGATT
CCTCAGTCTCACTTCTTCCCCACTTGGAGGCCAAGATCCGTCAGACACACAGCCTTGCGCACCTCCTCACCAAATAC
GCTGAGCAGCTGCTCCAGGAATATGTGCAGCTCCAGGGAGACCCCTTCGGGCTGCCCAGCTTCTCGCCGCCGCGG
CTGCCGGTGGCCGGCCTGAGCGCCCCGGCTCCGAGCCACGCGGGGCTGCCAGTGCACGAGCGGCTGCGGCTGGAC
GCGGCGGCGCTGGCCGCGCTGCCCCCGCTGCTGGACGCAGTGTGTCGCCGCCAGGCCGAGCTGAACCCGCGCGCG
CCGCGCCTGCTGCGCCGCCTGGAGGACGCGGCGCGCCAGGCCCGGGCCCTGGGCGCCGCCGTGGAGGCCTTGCTG
GCCGCGCTGGGCGCCGCCAACCGCGGGCCCCGGGCCGAGCCCCCCGCCGCCACCGCCTCAGCCGCCTCCGCCACC
GGGGTCTTCCCCGCCAAGGTGCTGGGGCTCCGCGTTTGCGGCCTCTACCGCGAGTGGCTGAGCCGCACCGAGGGC
GACCTGGGCCAGCTGCTGCCCGGGGGCTCGGCCTGAGCGCCGCGGGGCAGCTCGCCCCGCCTCCTCCCGCTGGGT
TCCGTCTCTCCTTCCGCTTCTTTGTCTTTCTCTGCCGCTGTCGGTGTCTGTCTGTCTGCTCTTAGCTGTCTCCAT
TGCCTCGGCCTTCTTTGCTTTTTGTGGGGGAGAGGGGAGGGGACGGGCAGGGTCTCTGTCGCCCAGGCTGGGGTG
CAGTGGCGCGATCCCAGCACTGCAGCCTCAACCTCCTGGGCTCAAGCCATCCTTCCGCCTCAGCTTCCCCAGCAG
CTGGGACTACAGGCACGCGCCACCACAGCCGGCTAATTTTTTATTTAATTTTTTGTAGAGACGAGGTTTCGCCAT
GTTGCCCAGGCTGGTCTTGAACTCCGGGGCTCAAGCGATCCTCCCGCTTCAGCCTCCCTAAGTGCTGGGATTGCA
GGCGTGAGCCACTTTCCCAGCCTCTCTTTGCTTTGCCTGCCCCGTTCTCTTAACTCTTGGACCCTCCTCGTCTGC
ATGGTAACTCCGTCTGAGTCTACCATTTTCTTGCTCTCCCTCCTTCCTTGGGCCTGCCTCAGTTCCCTTTGGCCT
CCCCCTTTACCCAGCTCTTGGGGTGTCTCTGTTTTTTCCATCCCCACTTCCTGCCTTCTCGTGGCCCTGTGTGAG
CACATGTGTACATCTCAGCCTTATCTCAAGGAGGTGACACCTTCTCTCCTTGTCCCCATCTGGCCGTCTCTCTGT
GCTTCCCTGGCCAGGGGCGTGCCTGCTGGTCCTATGGGGGGAAGGCTACTCCGCATCTCAGCCACCTTCCTCAGG
CTCACTCCACCTACATCCCCAGTCTGCCACACCCCATCCCTTTGGGCCTCAGCCCTGTCCCTTTGATGTCCTCCT
TTCCTTCAGCCCCTCTGCCCTGTCCCTGCACACCTCC

【図２８】

MSRREGSLEDPQTDSSVSLLPHLEAKIRQTHSLAHLLTKYAEQLLQEYVQLQGDPFGLPSFSPPRLPVAGLSAPA
PSHAGLPVHERLRLDAAALAALPPLLDAVCRRQAELNPRAPRLLRRLEDAARQARALGAAVEALLAALGAANRGP
RAEPPAATASAASATGVFPAKVLGLRVCGLYREWLSRTEGDLGQLLPGGSA

| | | |
|---|---|---|
| N-ミリストイル化部位 | アミノ酸 | 166-172;174-180 |
| ロイシンジッパーパターン | アミノ酸 | 37-59 |

【図２９】

CCGCCG**ATG**GCGCTGAGGCGGAGCATGGGGCGGCCGGGGCTCCCGCCGCTGCCGCTGCCGCCGCCACCGCGGCTC
GGGCTGCTGCTGGCGGCTCTGGCTTCTCTGCTGCTCCCGGAGTCCGCCGCCGCAGGTCTGAAGCTCATGGGAGCC
CCGGTGAAGCTGACAGTGTCTCAGGGGCAGCCGGTGAAGCTCAACTGCAGTGTGGAGGGGATGGAGGAGCCTGAC
ATCCAGTGGGTGAAGGATGGGGCTGTGGTCCAGAACTTGGACCAGTTGTACATCCCAGTCAGCGAGCAGCACTGG
ATCGGCTTCCTCAGCCTGAAGTCAGTGGAGCGCTCTGACGCCGGCCGGTACTGGTGCCAGGTGGAGGATGGGGGT
GAAACCGAGATCTCCCAGCCAGTGTGGCTCACGGTAGAAGGTGTGCCATTTTTCACAGTGGAGCCAAAAGATCTG
GCAGTGCCACCCAATGCCCCTTTCCAACTGTCTTGTGAGGCTGTGGGTCCCCCTGAACCTGTTACCATTGTCTGG
TGGAGAGGAACTACGAAGATCGGGGGACCCGCTCCCTCTCCATCTGTTTTAAATGTAACAGGGGTGACCCAGAGC
ACCATGTTTTCCTGTGAAGCTCACAACCTAAAAGGCCTGGCCTCTTCTCGCACAGCCACTGTTCACCTTCAAGCA
CTGCCTGCAGCCCCCTTCAACATCACCGTGACAAAGCTTTCCAGCAGCAACGCTAGTGTGGCCTGGATGCCAGGT
GCTGATGGCCGAGCTCTGCTACAGTCCTGTACAGTTCAGGTGACACAGGCCCCAGGAGGCTGGGAAGTCCTGGCT
GTTGTGGTCCCTGTGCCCCCCTTTACCTGCCTGCTCCGGGACCTGGTGCCTGCCACCAACTACAGCCTCAGGGTG
CGCTGTGCCAATGCCTTGGGGCCCTCTCCCTATGCTGACTGGGTGCCCTTTCAGACCAAGGGTCTAGCCCCAGCC
AGCGCTCCCCAAAACCTCCATGCCATCCGCACAGATTCAGGCCTCATCTTGGAGTGGGAAGAAGTGATCCCCGAG
GCCCCTTTGGAAGGCCCCCTGGGACCCTACAAACTGTCCTGGGTTCAAGACAATGGAACCCAGGATGAGCTGACA
GTGGAGGGGACCAGGGCCAATTTGACAGGCTGGGATCCCCAAAAGGACCTGATCGTACGTGTGTGCGTCTCCAAT
GCAGTTGGCTGTGGACCCTGGAGTCAGCCACTGGTGGTCTCTTCTCATGACCGTGCAGGCCAGCAGGGCCCTCCT
CACAGCCGCACATCCTGGGTACCTGTGGTCCTTGGTGTGCTAACGGCCCTGGTGACGGCTGCTGCCCTGGCCCTC
ATCCTGCTTCGAAAGAGACGGAAAGAGACGCGGTTTGGGCAAGCCTTTGACAGTGTCATGGCCCGGGGAGAGCCA
GCCGTTCACTTCCGGGCAGCCCGGTCCTTCAATCGAGAAAGGCCCGAGCGCATCGAGGCCACATTGGACAGCTTG
GGCATCAGCGATGAACTAAAGGAAAAACTGGAGGATGTGCTCATCCCAGAGCAGCAGTTCACCCTGGGCCGGATG
TTGGGCAAAGGAGAGTTTGGTTCAGTGCGGGAGGCCCAGCTGAAGCAAGAGGATGGCTCCTTTGTGAAAGTGGCT
GTGAAGATGCTGAAAGCTGACATCATTGCCTCAAGCGACATTGAAGAGTTCCTCAGGGAAGCAGCTTGCATGAAG
GAGTTTGACCATCCACACGTGGCCAAACTTGTTGGGGTAAGCCTCCGGAGCAGGGCTAAAGGCCGTCTCCCCATC
CCCATGGTCATCTTGCCCTTCATGAAGCATGGGGACCTGCATGCCTTCCTGCTCGCCTCCCGGATTGGGGAGAAC
CCCTTTAACCTACCCCTCCAGACCCTGATCCGGTTCATGGTGGACATTGCCTGCGGCATGGAGTACCTGAGCTCT
CGGAACTTCATCCACCGAGACCTGGCTGCTCGGAATTGCATGCTGGCAGAGGACATGACAGTGTGTGTGGCTGAC
TTCGGACTCTCCCGGAAGATCTACAGTGGGGACTACTATCGTCAAGGCTGTGCCTCCAAACTGCCTGTCAAGTGG
CTGGCCCTGGAGAGCCTGGCCGACAACCTGTATACTGTGCAGAGTGACGTGTGGGCGTTCGGGGTGACCATGTGG
GAGATCATGACACGTGGGCAGACGCCATATGCTGGCATCGAAAACGCTGAGATTTACAACTACCTCATTGGCGGG
AACCGCCTGAAACAGCCTCCGGAGTGTATGGAGGACGTGTATGATCTCATGTACCAGTGCTGGAGTGCTGACCCC
AAGCAGCGCCCGAGCTTTACTTGTCTGCGAATGGAACTGGAGAACATCTTGGGCCAGCTGTCTGTGCTATCTGCC
AGCCAGGACCCCTTATACATCAACATCGAGAGAGCTGAGGAGCCCACTGCGGGAGGCAGCCTGGAGCTACCTGGC
AGGGATCAGCCCTACAGTGGGGCTGGGGATGGCAGTGGCATGGGGGCAGTGGGTGGCACTCCCAGTGACTGTCGG
TACATACTCACCCCCGGAGGGCTGGCTGAGCAGCCAGGGCAGGCAGAGCACCAGCCAGAGAGTCCCCTCAATGAG
ACACAGAGGCTTTTGCTGCTGCAGCAAGGGCTACTGCCACACAGTAGCTGT**TAG**CCCACAGGCAGAGGGCATCGG
GGCCATTTGGCCGGCTCTGGTGGCCACTGAGCTGGCTGACTAAGCCCCGTCTGACCCCAGCCCAGACAGCAAGGT
GTGGAGGCTCCTGTGGTAGTCCTCCCAAGCTGTGCTGGGAAGCCCGGACTGACCAAATCACCCAATCCCAGTTCT
TCCTGCAACCACTCTGTGGCCAGCCTGGCATCAGTTTAGGCCTTGGCTTGATGGAAGTGGGCCAGTCCTGGTTGT
CTGAACCCAGGCAGCTGGCAGGAGTGGGGTGGTTATGTTTCCATGGTTACCATGGGTGTGGATGGCAGTGTGGGG
AGGGCAGGTCCAGCTCTGTGGGCCCTACCCTCCTGCTGAGCTGCCCCTGCTGCTTAAGTGCATGCATTGAGCTGC
CTCCAGCCTGGTGGCCCAGCTATTACCACACTTGGGGTTTAAATATCCAGGTGTGCCCCTCCAAGTCACAAAGAG
ATGTCCTTGTAATATTCCCTTTTAGGTGAGGGTTGGTAAGGGGTTGGTATCTCAGGTCTGAATCTTCACCATCTT
TCTGATTCCGCACCCTGCCTACGCCAGGAGAAGTTGAGGGGAGCATGCTTCCCTGCAGCTGACCGGGTCACACAA
AGGCATGCTGGAGTACCCAGCCTATCAGGTGCCCCTCTTCCAAAGGCAGCGTGCCGAGCCAGCAAGAGGAAGGGG
TGCTGTGAGGCTTGCCCAGGAGCAAGTGAGGCCGGAGAGGAGTTCAGGAACCCTTCTCCATACCCACAATCTGAG
CACGCTACCAAATCTCAAAATATCCTAAGACTAACAAAGGCAGCTGTGTCTGAGCCCAACCCTTCTAAACGGTGA
CCTTTAGTGCCAACTTCCCCTCTAACTGGACAGCCTCTTCTGTCCCAAGTCTCCAGAGAGAAATCAGGCCTGATG
AGGGGGAATTC

【図３０】

MALRRSMGRPGLPPLPLPPPPRLGLLLAALASLLLPESAAAGLKLMGAPVKLTVSQGQPVKLNCSVEGMEEPDIQ
WVKDGAVVQNLDQLYIPVSEQHWIGFLSLKSVERSDAGRYWCQVEDGGETEISQPVWLTVEGVPFFTVEPKDLAV
PPNAPFQLSCEAVGPPEPVTIVWWRGTTKIGGPAPSPSVLNVTGVTQSTMFSCEAHNLKGLASSRTATVHLQALP
AAPFNITVTKLSSSNASVAWMPGADGRALLQSCTVQVTQAPGGWEVLAVVVPVPPFTCLLRDLVPATNYSLRVRC
ANALGPSPYADWVPFQTKGLAPASAPQNLHAIRTDSGLILEWEEVIPEAPLEGPLGPYKLSWVQDNGTQDELTVE
GTRANLTGWDPQKDLIVRVCVSNAVGCGPWSQPLVVSSHDRAGQQGPPHSRTSWVPVVLGVLTALVTAAALALIL
LRKRRKETRFGQAFDSVMARGEPAVHFRAARSFNRERPERIEATLDSLGISDELKEKLEDVLIPEQQFTLGRMLG
KGEFGSVREAQLKQEDGSFVKVAVKMLKADIIASSDIEEFLREAACMKEFDHPHVAKLVGVSLRSRAKGRLPIPM
VILPFMKHGDLHAFLLASRIGENPFNLPLQTLIRFMVDIACGMEYLSSRNFIHRDLAARNCMLAEDMTVCVADFG
LSRKIYSGDYYRQGCASKLPVKWLALESLADNLYTVQSDVWAFGVTMWEIMTRGQTPYAGIENAEIYNYLIGGNR
LKQPPECMEDVYDLMYQCWSADPKQRPSFTCLRMELENILGQLSVLSASQDPLYINIERAEEPTAGGSLELPGRD
QPYSGAGDGSGMGAVGGTPSDCRYILTPGGLAEQPGQAEHQPESPLNETQRLLLLQQGLLPHSSC

| | | |
|---|---|---|
| シグナル配列 | アミノ酸 | 1-40 |
| 膜貫通ドメイン | アミノ酸 | 271-285;430-449 |
| N-グリコシル化部位 | アミノ酸 | 63-67;191-195;230-234;240-244;293-297;366-370;380-384;872-876 |
| グリコサミノグリカン付着部位 | アミノ酸 | 829-833;835-839 |
| cAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位 | アミノ酸 | 455-459 |
| N-ミリストイル化部位 | アミノ酸 | 24-30;194-200;210-216;319-325;376-382;435-441;735-741;830-836;834-840;838-844;841-847 |
| 原核生物膜リポタンパク質脂質付着部位 | アミノ酸 | 193-204 |
| チロシンプロテインキナーゼ特異活性部位シグネチャー | アミノ酸 | 651-664 |

【図３１】

GAATTCGTGTCTCGGCACTCACTCCCGGCCGCCCGGACAGGGAGCTTTCGCTGGCGCGCTTGGCCGGCGACAGGA
CAGGTTCGGGACGTCCATCTGTCCATCCGTCCGGAGAGAAATTACAGATCCGCAGCCCCGGG**ATG**GGGCCGGCCC
CGCTGCCGCTGCTGCTGGGCCTCTTCCTCCCCGCGCTCTGGCGTAGAGCTATCACTGAGGCAAGGGAAGAAGCCA
AGCCTTACCCGCTATTCCCGGGACCTTTTCCAGGGAGCCTGCAAACTGACCACACACCGCTGTTATCCCTTCCTC
ACGCCAGTGGGTACCAGCCTGCCTTGATGTTTTCACCAACCCAGCCTGGAAGACCACATACAGGAAACGTAGCCATT
CCCCAGGTGACCTCTGTCGAATCAAAGCCCCTACCGCCTCTTGCCTTCAAACACACAGTTGGACACATAATACTT
TCTGAACATAAAGGTGTCAAATTTAATTGCTCAATCAATGTACCTAATATATACCAGGACACCACAATTTCTTGG
TGGAAAGATGGGAAGGAATTGCTTGGGGGACATCATCGAATTACACAGTTTTATCCAGATGATGAAGTTACAGCA
ATAATCGCTTCCTTCAGCATAACCAGTGTGCAGCGTTCAGACAATGGGTCGTATATCTGTAAGATGAAAATAAAC
AATGAAGAGATCGTGTCTGATCCCATCTACATCGAAGTACAAGGACTTCCTCACTTTACTAAGCAGCCTGAGAGC
ATGAATGTCACCAGAAACACAGCCTTCAACCTCACCTGTCAGGCTGTGGGCCCGCCTGAGCCCGTCAACATTTTC
TGGGTTCAAAACAGTAGCCGTGTTAACGAACAGCCTGAAAAATCCCCCGGCGTGCTAACTGTTCCAGGCCTGACG
GAGATGGCGGTCTTCAGTTGTGAGGCCCACAATGACAAAGGGCTGACCGTGTCCCAGGGAGTGCAGATCAACATC
AAAGCAATTCCCTCCCCACCAACTGAAGTCAGCATCCGTAACAGCACTGCACACAGCATTCTGATCTCCTGGGTT
CCTGGTTTTGATGGATACTCCCCGTTCAGGAATTGCAGCATTCAGGTCAAGGAAGCTGATCCGCTGGGTAATGGC
TCAGTCATGATTTTTAACACCTCTGCCTTACCACATCTGTACCAAATCAAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTAC
AGCATTGGTGTTTCCTGCATGAATGAAATAGGCTGGTCTGCAGTGAGCCCTTGGATTCTAGCAAGCACGACTGAA
GGAGCCCCATCAGTAGCACCTTTAAATGTCACTGTGTTTCTGAATGAATCTAGTGATAATGTGGACATCAGATGG
ATGAAGCCTCCGACTAAGCAGCAGGATGGAGAACTGGTGGGCTACCGGATATCCCACGTGTGGCAGAGTGCAGGG
ATTTCCAAAGAGCTCTTGGAGGAAGTTGGCCAGAATGGCAGCCGAGCTCGGATCTCTGTTCAAGTCCACAATGCT
ACGTGCACAGTGAGGATTGCAGCCGTCACCAGAGGGGGAGTTGGGCCCTTCAGTGATCCAGTGAAAATATTTATC
CCTGCACACGGTTGGGTAGATTATGCCCCCTCTTCAACTCCGGCGCCTGGCAACGCAGATCCTGTGCTCATCATC
TTTGGCTGCTTTTGTGGATTTATTTTGATTGGGTTGATTTTATACATCTCCTTGGCCATCAGAAAAAGAGTCCAG
GAGACAAAGTTTGGGAATGCATTCACAGAGGAGGATTCTGAATTAGTGGTGAATTATATAGCAAAGAAATCCTTC
TGTCGGCGAGCCATTGAACTTACCTTACATAGCTTGGGAGTCAGTGAGGAACTACAAAATAAACTAGAAGATGTT
GTGATTGACAGGAATCTTCTAATTCTTGGAAAAATTCTGGGTGAAGGAGAGTTTGGGTCTGTAATGGAAGGAAAT
CTTAAGCAGGAAGATGGGACCTCTCTGAAAGTGGCAGTGAAGACCATGAAGTTGGACAACTCTTCACATCGGGAG
ATCGAGGAGTTTCTCAGTGAGGCAGCGTGCATGAAAGACTTCAGCCACCCAAATGTCATTCGACTTCTAGGTGTG
TGTATAGAAATGAGCTCTCAAGGCATCCCAAAGCCCATGGTAATTTTACCCTTCATGAAATACGGGGACCTGCAT
ACTTACTTACTTTATTCCCGATTGGAGACAGGACCAAAGCATATTCCTCTGCAGACACTATTGAAGTTCATGGTG
GATATTGCCCTGGGAATGGAGTATCTGAGCAACAGGAATTTTCTTCATCGAGATTTAGCTGCTCGAAACTGCATG
TTGCGAGATGACATGACTGTCTGTGTTGCGGACTTCGGCCTCTCTAAGAAGATTTACAGTGGCGATTATTACCGC
CAAGGCCGCATTGCTAAGATGCCTGTTAAATGGATCGCCATAGAAAGTCTTGCAGACCGAGTCTACACAAGTAAA
AGTGATGTGTGGGCATTTGGCGTGACCATGTGGGAAATACGTACGCGGGGAATGACTCCCTATCCTGGGGTCCAG
AACCATGAGATGTATGACTATCTTCTCCATGGCCACAGGTTGAAGCAGCCCGAAGACTGCCTGGATGAACTGTAT
GAAATAATGTACTCTTGCTGGAGAACCGATCCCTTAGACCGCCCCACCTTTTCAGTATTGAGGCTGCAGCTAGAA
AAACTCTTAGAAAGTTTGCCTGACGTTCGGAACCAAGCAGACGTTATTTACGTCAATACACAGTTGCTGGAGAGC
TCTGAGGGCCTGGCCCAGGGCCCCACCCTTGCTCCACTGGACTTGAACATCGACCCTGACTCTATAATTGCCTCC
TGCACTCCCCGCGCTGCCATCAGTGTGGTCACAGCAGAAGTTCATGACAGCAAACCTCATGAAGGACGGTACATC
CTGAATGGGGGCAGTGAGGAATGGGAAGATCTGACTTCTGCCCCCTCTGCTGCAGTCACAGCTGAAAAGAACAGT
GTTTTACCGGGGGAGAGACTTGTTAGGAATGGGGTCTCCTGGTCCCATTCGAGCATGCTGCCCTTGGGAAGCTCA
TTGCCCGATGAACTTTTGTTTGCTGACGACTCCTCAGAAGGCTCAGAAGTCCTGATG**TGA**GGAGAGGTGCGGGGA
GACATTCCAAAAATCAAGCCAATTCTTCTGCTGTAGGAGAATCCAATTGTACCTGATGTTTTTGGTATTTGTCTT
CCTTACCAAGTGAACTCCATGGCCCCAAAGCACCAGATGAATGTTGTTAAGGAAGCTGTCATTAAAAATACATAA
TATATATTTATTTAAAGAGAAAAAATATGTGTATATCATGAAAAAGACAAGGATATTTTAATAAAACATTACTTA
TTTCATTTCACTTATCTTGCATATCTTAAAATTAAGCTTCAGCTGCTCCTTGATATTAACCTTTGTACAGAGTTG
AAGTTGTTTTTTCAACTTCTTTTCTTTTTCATTACTATTAAATGTAAAAATATTTGTAAAATGAAATGCCATATT
TGACTTGGCTTCTGGTCTTGATGTATTTGATAAGAATGATTAATTTTCTGATATGGCTTCCATAATAAAATTGAA
ATAGGA

【図３２】

MGPAPLPLLLGLFLPALWRRAITEAREEAKPYPLFPGPFPGSLQTDHTPLLSLPHASGYQPALMFSPTQPGRPHT
GNVAIPQVTSVESKPLPPLAFKHTVGHIILSEHKGVKFNCSINVPNIYQDTTISWWKDGKELLGGHHRITQFYPD
DEVTAIIASFSITSVQRSDNGSYICKMKINNEEIVSDPIYIEVQGLPHFTKQPESMNVTRNTAFNLTCQAVGPPE
PVNIFWVQNSSRVNEQPEKSPGVLTVPGLTEMAVFSCEAHNDKGLTVSQGVQINIKAIPSPPTEVSIRNSTAHSI
LISWVPGFDGYSPFRNCSIQVKEADPLGNGSVMIFNTSALPHLYQIKQLQALANYSIGVSCMNEIGWSAVSPWIL
ASTTEGAPSVAPLNVTVFLNESSDNVDIRWMKPPTKQQDGELVGYRISHVWQSAGISKELLEEVGQNGSRARISV
QVHNATCTVRIAAVTRGGVGPFSDPVKIFIPAHGWVDYAPSSTPAPGNADPVLIIFGCFCGFILIGLILYISLAI
RKRVQETKFGNAFTEEDSELVVNYIAKKSFCRRAIELTLHSLGVSEELQNKLEDVVIDRNLLILGKILGEGEFGS
VMEGNLKQEDGTSLKVAVKTMKLDNSSHREIEEFLSEAACMKDFSHPNVIRLLGVCIEMSSQGIPKPMVILPFMK
YGDLHTYLLYSRLETGPKHIPLQTLLKFMVDIALGMEYLSNRNFLHRDLAARNCMLRDDMTVCVADFGLSKKIYS
GDYYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWAFGVTMWEIRTRGMTPYPGVQNHEMYDYLLHGHRLKQPEDC
LDELYEIMYSCWRTDPLDRPTFSVLRLQLEKLLESLPDVRNQADVIYVNTQLLESSEGLAQGPTLAPLDLNIDPD
SIIASCTPRAAISVVTAEVHDSKPHEGRYILNGGSEEWEDLTSAPSAAVTAEKNSVLPGERLVRNGVSWSHSSML
PLGSSLPDELLFADDSSEGSEVLM

| | | |
|---|---|---|
| シグナル配列 | アミノ酸 | 1-18 |
| 膜貫通ドメイン | アミノ酸 | 501-520 |
| N-グリコシル化部位 | アミノ酸 | 114-118;170-174;207-211;215-219;234-238;294-298;316-320;329-333;336-340;354-358;389-393;395-399;442-446;454-458;625-629 |
| チロシンキナーゼリン酸化部位 | アミノ酸 | 675-683;865-873;923-930 |
| N-ミリストイル化部位 | アミノ酸 | 41-47;110-116;171-177;269-275;275-281;440-446;507-513;535-541;966-972 |
| 原核生物膜リポタンパク質脂質付着部位 | アミノ酸 | 351-362 |
| チロシンプロテインキナーゼ特異活性部位シグネチャー | アミノ酸 | 719-732 |

【国際調査報告】

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/05004

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 A61K38/17 G01N33/53 C12Q1/68
C12N15/62 C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C07K A61K G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | DATABASE EMBL - EMEST_HUM5 [Online]<br>Entry/Acc.no. AI373251,<br>13 January 1999 (1999-01-13)<br>STRAUSBERG, R.: "qz48c05.x1 NCI_CGAP_Kid11<br>Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2030120 3',<br>mRNA sequence"<br>XP002143880<br>the whole document<br>--- | 59-63,<br>65,67,<br>79,80 |
| A | WO 95 29242 A (CHILDRENS MEDICAL CENTER)<br>2 November 1995 (1995-11-02)<br>the whole document<br>--- | |
| A | EP 0 335 243 A (HARVARD COLLEGE)<br>4 October 1989 (1989-10-04)<br>the whole document<br>--- | |
| | -/-- | |

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 31 July 2000 | 08. 11. 00 |

| Name and mailing address of the ISA | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Smalt, R |

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/05004

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | KLAGSBRUN M: "REGULATORS OF ANGIOGENESIS: STIMULATORS, INHIBITORS, AND EXTRACELLULAR MATRIX" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY,US,LISS, NEW YORK, NY, vol. 47, no. 3, 1 November 1991 (1991-11-01), pages 199-200, XP000616588 ISSN: 0730-2312 the whole document | |
| P,X, L | WO 99 15654 A (FERRARA NAPOLEONE ;WILLIAMS P MICKEY (US); GENENTECH INC (US); FON) 1 April 1999 (1999-04-01) whole document, particularly passages relating to NL6, and the claims. | 1-10,17, 18, 21-24, 26-48, 50,51, 57-80 |
| P,X | WO 99 67382 A (SAVITSKY KINNERET ;COMPUGEN LTD (IL); MINTZ LIAT (IL)) 29 December 1999 (1999-12-29) the whole document | 1-15,17, 18, 21-48, 50,51, 57-80 |
| P,X | WO 99 58660 A (ENDRESS GREGORY A ;FLORENCE KIMBERLY (US); HUMAN GENOME SCIENCES I) 18 November 1999 (1999-11-18) whole document, particularly passages relating to gene 6, and the claims. | 1-15,17, 18, 21-24, 26-32, 34,36, 40-46, 50,51, 57-80 |
| P,X | EP 0 962 466 A (LILLY CO ELI) 8 December 1999 (1999-12-08) the whole document | 1-15,17, 18, 21-24, 26-32, 34,38, 42,45, 46,50, 51,57-80 |
| P,X | WO 99 55869 A (ZYMOGENETICS INC) 4 November 1999 (1999-11-04) the whole document | 1-10,18, 21,31, 32,42, 45,59-80 |

1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/05004

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

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

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 31-45 and 49-58 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [X] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [X] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1-48, 50, 51, 57-80, all partially.

Remark on Protest

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

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 00/05004

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

A meaningful search for the full scope of claims 1,2,5-7,10,17-19,31-39,42, and 46-54, referring to (ant)agonists of the claimed proteins and compounds inhibiting the expression thereof, could not be performed due to insufficient characterization of the (ant)agonists and/or expression inhibitors in the description (lack of discosure, support, clarity, and conciseness, PCT articles 5 & 6). It is clear from e.g. claims 3,4 and 20, however, that the claimed (ant)agonists could be agonistic antibodies against proteins defined in the application, and that the expression inhibiting compound could be an antisense molecule. The search for the above claims, in as far as they relate to (ant)agonists and expression inhibitors, was therefore limited to (ant)agonistic antibodies and antisense molecules only.

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 Application No. PCT/US 00/05004

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: Invention 1: claims 1-48,50,51,57-80, all partially

Composition comprising PRO320 polypeptide or (ant)agonist thereof, fusion proteins comprising a portion of said protein, antibody against said protein, method for identifying (ant)agonists of said protein or compounds which modulate the expression level or the activity of said protein, methods for modulating the activity of said protein using said (ant)agonists or modulators, methods for diagnosis comprising assessing the protein or expression levels of said polypeptide, retroviral particle encoding said protein or (ant)agonist, and producer cell of said protein or (ant)agonist comprising said retroviral particle, use of said protein, (ant)agonists thereof or nucleic acids encoding said protein in the manufacture of a composition for the treatment of angiogenesis or cardiovascularization related disorder.

2. Claims: Inventions 2-7: claims 1-80,
all partially and in as far as applicable

Inventions 2-16: Idem as subject 1 but limited to the respective proteins PRO179, PRO238, PRO364, PRO844, PRO846, PRO1760, PRO205, PRO321, PRO333, PRO840, PRO877, PRO878, PRO879, PRO882, PRO885, and PRO887.

For the sake of conciseness, the first subject matter is explicitly defined, the other subject matters are defined by analogy thereto.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/05004

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| WO 9529242 A | 02-11-1995 | US 5639725 A | 17-06-1997 |
| | | US 5792845 A | 11-08-1998 |
| | | AU 692865 B | 18-06-1998 |
| | | AU 2461795 A | 16-11-1995 |
| | | BR 9507479 A | 16-09-1997 |
| | | CA 2188813 A | 02-11-1995 |
| | | CN 1149319 A | 07-05-1997 |
| | | CZ 9603122 A | 14-05-1997 |
| | | EP 0758390 A | 19-02-1997 |
| | | HU 76095 A | 30-06-1997 |
| | | JP 9512173 T | 09-12-1997 |
| | | NZ 285501 A | 26-02-1998 |
| | | US 5885795 A | 23-03-1999 |
| | | US 5733876 A | 31-03-1998 |
| | | US 5776704 A | 07-07-1998 |
| | | ZA 9503419 A | 11-01-1996 |
| EP 0335243 A | 04-10-1989 | US 4900673 A | 13-02-1990 |
| | | AT 96844 T | 15-11-1993 |
| | | AU 621358 B | 12-03-1992 |
| | | AU 3433189 A | 16-10-1989 |
| | | CA 1331356 A | 09-08-1994 |
| | | DE 68910354 D | 09-12-1993 |
| | | DE 68910354 T | 03-03-1994 |
| | | DK 233390 A | 26-11-1990 |
| | | JP 3503641 T | 15-08-1991 |
| | | PT 90129 A | 10-11-1989 |
| | | WO 8909277 A | 05-10-1989 |
| | | ZA 8902270 A | 24-12-1991 |
| WO 9915654 A | 01-04-1999 | US 6030831 A | 29-02-2000 |
| | | AU 9388198 A | 12-04-1999 |
| | | EP 1015586 A | 05-07-2000 |
| | | US 6074873 A | 13-06-2000 |
| WO 9967382 A | 29-12-1999 | AU 4643699 A | 10-01-2000 |
| WO 9958660 A | 18-11-1999 | AU 3881999 A | 29-11-1999 |
| EP 0962466 A | 08-12-1999 | AU 4227799 A | 20-12-1999 |
| | | WO 9962956 A | 09-12-1999 |
| WO 9955869 A | 04-11-1999 | AU 3661199 A | 16-11-1999 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl.[7] | 識別記号 | FI | | ﾃｰﾏｺｰﾄﾞ(参考) |
|---|---|---|---|---|
| Ａ６１Ｋ 48/00 | | Ａ６１Ｐ | 9/04 | ４Ｃ０８４ |
| Ａ６１Ｐ 9/04 | | | 9/10 | ４Ｃ０８５ |
| 9/10 | | | 17/02 | ４Ｃ０８６ |
| 17/02 | | | 27/02 | ４Ｈ０４５ |
| 27/02 | | Ｃ０７Ｋ | 14/47 | |
| Ｃ０７Ｋ 14/47 | | | 16/18 | |
| 16/18 | | | 19/00 | |
| 19/00 | | Ｃ１２Ｎ | 1/19 | |
| Ｃ１２Ｎ 1/19 | | | 1/21 | |
| 1/21 | | | 7/00 | |
| 5/10 | | Ｃ１２Ｐ | 21/02 | Ｃ |
| 7/00 | | Ｃ１２Ｑ | 1/02 | |
| 15/09 | ＺＮＡ | Ｇ０１Ｎ | 33/15 | Ｚ |
| Ｃ１２Ｐ 21/02 | | | 33/50 | Ｚ |
| Ｃ１２Ｑ 1/02 | | | 33/53 | Ｄ |
| Ｇ０１Ｎ 33/15 | | | | Ｍ |
| 33/50 | | Ｃ１２Ｐ | 21/08 | |
| 33/53 | | Ａ６１Ｋ | 37/02 | |
| | | Ｃ１２Ｎ | 15/00 | ＺＮＡＡ |
| // Ｃ１２Ｐ 21/08 | | | 5/00 | Ｂ |

(31)優先権主張番号　ＵＳ９９１２２５２
(32)優先日　平成11年６月２日(1999．6．2)
(33)優先権主張国　米国（ＵＳ）
(31)優先権主張番号　６０／１４４，７５８
(32)優先日　平成11年７月20日(1999．7．20)
(33)優先権主張国　米国（ＵＳ）
(31)優先権主張番号　６０／１４５，６９８
(32)優先日　平成11年７月26日(1999．7．26)
(33)優先権主張国　米国（ＵＳ）
(31)優先権主張番号　ＵＳ９９２０１１１
(32)優先日　平成11年９月１日(1999．9．1)
(33)優先権主張国　米国（ＵＳ）
(31)優先権主張番号　ＵＳ９９２１０９０
(32)優先日　平成11年９月15日(1999．9．15)
(33)優先権主張国　米国（ＵＳ）
(31)優先権主張番号　ＵＳ９９２８３１３
(32)優先日　平成11年11月30日(1999．11．30)
(33)優先権主張国　米国（ＵＳ）
(31)優先権主張番号　ＵＳ９９２８４０９
(32)優先日　平成11年11月30日(1999．11．30)
(33)優先権主張国　米国（ＵＳ）
(31)優先権主張番号　ＵＳ９９２８５６５
(32)優先日　平成11年12月２日(1999．12．2)
(33)優先権主張国　米国（ＵＳ）

(31)優先権主張番号　ＵＳ００００２１９
(32)優先日　　平成12年１月５日(2000．1．5)
(33)優先権主張国　　米国（ＵＳ）
(31)優先権主張番号　ＵＳ０００４３４１
(32)優先日　　平成12年２月18日(2000．2．18)
(33)優先権主張国　　米国（ＵＳ）
(31)優先権主張番号　ＵＳ０００４３４２
(32)優先日　　平成12年２月18日(2000．2．18)
(33)優先権主張国　　米国（ＵＳ）
(31)優先権主張番号　ＵＳ０００４４１４
(32)優先日　　平成12年２月22日(2000．2．22)
(33)優先権主張国　　米国（ＵＳ）
(81)指定国　　ＥＰ(ＡＴ，ＢＥ，ＣＨ，ＣＹ，ＤＥ，ＤＫ，ＥＳ，ＦＩ，ＦＲ，ＧＢ，ＧＲ，ＩＥ，ＩＴ，ＬＵ，ＭＣ，ＮＬ，ＰＴ，ＳＥ)，ＯＡ(ＢＦ，ＢＪ，ＣＦ，ＣＧ，ＣＩ，ＣＭ，ＧＡ，ＧＮ，ＧＷ，ＭＬ，ＭＲ，ＮＥ，ＳＮ，ＴＤ，ＴＧ)，ＡＰ(ＧＨ，ＧＭ，ＫＥ，ＬＳ，ＭＷ，ＳＤ，ＳＬ，ＳＺ，ＴＺ，ＵＧ，ＺＷ)，ＥＡ(ＡＭ，ＡＺ，ＢＹ，ＫＧ，ＫＺ，ＭＤ，ＲＵ，ＴＪ，ＴＭ)，ＡＥ，ＡＬ，ＡＭ，ＡＴ，ＡＵ，ＡＺ，ＢＡ，ＢＢ，ＢＧ，ＢＲ，ＢＹ，ＣＡ，ＣＨ，ＣＮ，ＣＲ，ＣＵ，ＣＺ，ＤＥ，ＤＫ，ＤＭ，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，ＮＯ，ＮＺ，ＰＬ，ＰＴ，ＲＯ，ＲＵ，ＳＤ，ＳＥ，ＳＧ，ＳＩ，ＳＫ，ＳＬ，ＴＪ，ＴＭ，ＴＲ，ＴＴ，ＴＺ，ＵＡ，ＵＧ，ＵＳ，ＵＺ，ＶＮ，ＹＵ，ＺＡ，ＺＷ
(72)発明者　ベーカー，ケヴィン，ピー．
アメリカ合衆国　メリーランド　20878，ダーンズタウン，インディアン　ラン　ドライブ　14006
(72)発明者　フェララ，ナポレオン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94109，サン　フランシスコ，パシフィック　アヴェニュー　2090，704号室
(72)発明者　ゲルバー，ハンスピーター
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94107，サン　フランシスコ，テネシー　ストリート1121，５号室
(72)発明者　ゲリッツェン，マリー，イー．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94402，サン　マテオ，パロット　ドライブ　541
(72)発明者　ゴダード，オードリー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94131，サン　フランシスコ，コンゴ　ストリート

(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　ヒラン，ケネス，ジェー．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94114，サン　フランシスコ，セワード　ストリート　64
(72)発明者　マースタース，スコット，エー．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94070，サン　カルロス，　チェリー　ストリート　990
(72)発明者　パオニ，ニコラス，エフ．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94002，ベルモント，テラス　ドライブ　1756
(72)発明者　ピッティ，ロバート，エム．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94530，エル　セリト，リバティ　ストリート　1110
(72)発明者　ワタナベ，コリン，ケー．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94556，モラガ，コーリス　ドライブ　128
(72)発明者　ウィリアムズ，ピー．，ミッキー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94019，ハーフ　ムーン　ベイ，アルト　アヴェニュー　509
(72)発明者　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，ヒルズ　バラ，サウスダウン　コート　35

Ｆターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB10 BB14 BB20
BB24 BB41 BB46 BB48 BB50
BB51 CB01 DA13 DA36 FA18
FB02 FB03 FB07
4B024 AA01 AA11 BA53 BA80 CA04
DA02 DA03 DA06 DA12 EA04
GA13 GA14 HA11 HA17
4B063 QA05 QQ08 QQ79 QQ91 QR51
QR77 QS31 QX10
4B064 AG27 BJ12 CA02 CA06 CA10
CA19 CA20 CC24 DA03 DA05
DA13
4B065 AA26X AA72X AA90X AA90Y
AA97X AB01 AC15 AC16
BA05 CA23 CA25 CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 AA07 AA16 MA02
NA14 ZA36 ZA40 ZB26
4C085 AA13 AA14 EE03
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA02
NA14 ZA40 ZB26
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41
BA54 CA40 DA75 DA76 EA28
EA34 EA51 FA72 FA73 FA74
GA26

| | | | |
|---|---|---|---|
| 专利名称(译) | 促进或抑制血管生成和心血管化 | | |
| 公开(公告)号 | JP2003531811A | 公开(公告)日 | 2003-10-28 |
| 申请号 | JP2000603378 | 申请日 | 2000-02-24 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 健泰科生物技术公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Genentech公司 | | |
| [标]发明人 | アシュケナジアヴィジェイ<br>ベーカーケヴィンピー<br>フェララナポレオン<br>ゲルバーハンスピーター<br>ゲリッツェンマリーイー<br>ゴダードオードリー<br>ガーニーオースティンエル<br>ヒランケネスジェー<br>マースタースコットエー<br>パオニニコラスエフ<br>ピッティロバートエム<br>ワタナベコリンケー<br>ウィリアムズピーミッキー<br>ウッドウィリアムアイ | | |
| 发明人 | アシュケナジ,アヴィ,ジェイ.<br>ベーカー,ケヴィン,ピー.<br>フェララ,ナポレオン<br>ゲルバー,ハンスピーター<br>ゲリッツェン,マリー,イー.<br>ゴダード,オードリー<br>ガーニー,オースティン,エル.<br>ヒラン,ケネス,ジェー.<br>マースタース,スコット,エー.<br>パオニ,ニコラス,エフ.<br>ピッティ,ロバート,エム.<br>ワタナベ,コリン,ケー.<br>ウィリアムズ,ピー.,ミッキー<br>ウッド,ウィリアム,アイ. | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K45/00 A61K45/06 A61K48/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P17/00 A61P17/02 A61P27/02 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/62 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | A61K38/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P27/02 C07K14/47 C07K14/4703 C07K14/70578 C07K16/18 C07K2317/24 C07K2319/00 C12N2799/026 C12N2799/027 G01N2800/32 | | |
| FI分类号 | A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P17/02 A61P27/02 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M C12P21/08 A61K37/02 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB41 2G045/BB46 2G045/BB48 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA18 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024 | | |

| | |
|---|---|
| | /CA04 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/GA14 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR51 4B063/QR77 4B063/QS31 4B063/QX10 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA03 4B064/DA05 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA97X 4B065/AB01 4B065/AC15 4B065/AC16 4B065/BA05 4B065/CA23 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA16 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA36 4C084/ZA40 4C084/ZB26 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/EE03 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA02 4C086/NA14 4C086/ZA40 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA54 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA34 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74 4H045/GA26 |
| 优先权 | 09/905028 1999-03-08 US<br>60/123957 1999-03-12 US<br>09/912252 1999-06-02 US<br>60/144758 1999-07-20 US<br>60/145698 1999-07-26 US<br>09/920111 1999-09-01 US<br>09/921090 1999-09-15 US<br>09/928313 1999-11-30 US<br>09/928409 1999-11-30 US<br>09/928565 1999-12-02 US<br>0000219 2000-01-05 US<br>0004341 2000-02-18 US<br>0004342 2000-02-18 US<br>0004414 2000-02-22 US |
| 其他公开文献 | JP2003531811A5 |
| 外部链接 | Espacenet |


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。 所述药物组合物基于针对这些用途中的一种或多种鉴定的多肽或其拮抗剂。 用本文的组合物诊断，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。 此外，本发明涉及新型多肽和编码这些多肽的核酸分子。 此外，此处，包含这些核酸序列的载体和宿主细胞，包含与异源多肽融合的本发明的多肽的嵌合多肽分子，与本发明的多肽结合的抗体和本发明的多肽还提供了制造方法。