

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-154140

(P2004-154140A)

(43) 公開日 平成16年6月3日(2004.6.3)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088		4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	N	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 45/00		4 B O 6 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/06		4 B O 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 74 O L (全 135 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-420475 (P2003-420475)	(71) 出願人	596168317
(22) 出願日	平成15年12月18日 (2003.12.18)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願2000-603378 (P2000-603378) の分割		GENENTECH, INC.
原出願日	平成12年2月24日 (2000.2.24)		アメリカ合衆国カリフォルニア・94080-4990・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(31) 優先権主張番号	US99/05028	(74) 代理人	100109726
(32) 優先日	平成11年3月8日 (1999.3.8)		弁理士 園田 吉隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100101199
(31) 優先権主張番号	60/123,957		弁理士 小林 義教
(32) 優先日	平成11年3月12日 (1999.3.12)	(72) 発明者	アシケナジ, アヴィ, ジェイ.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94402, サン マテオ, テリータウン ストリート 1456
(31) 優先権主張番号	US99/12252		
(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)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管形成及び心血管新生の促進又は阻害

(57) 【要約】

【課題】 ヒトを含む哺乳動物における血管新生及び/又は心血管形成を刺激又は阻害するための組成物及び方法を開示する。

【解決手段】 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製薬組成物を提供する。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化する核酸分子を提供する。また、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。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

PRO840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む組成物。

【請求項 2】

治療的有効量の前記ポリペプチド、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-PRO840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-PRO840抗体である請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

心血管、内皮、血管形成の薬剤又はアンジオスタティック剤をさらに含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

PRO840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む請求項 1 に記載の組成物の調製方法。

【請求項 7】

(1) (a) PRO840ポリペプチド、(b) PRO840ポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PRO840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、を含む製造品。

【請求項 8】

前記アゴニストが、抗-PRO840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-PRO840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、治療的有効量の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を、前記の製薬的に許容される担体と混合して含む請求項 7 に記載の製造品。

【請求項 11】

PRO840ポリペプチドのアゴニストを同定する方法であって：

(a) 細胞及びスクリーニングすべき試験化合物を、PRO840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ること；及び

(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み、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】

PRO840ポリペプチドの活性を阻害する化合物を同定する方法であって、試験化合物と前記ポリペプチドとを、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ること、及び前記ポリペプチドの活性が阻害されるか否かを決定することを含む方法。

【請求項 14】

PRO840ポリペプチドの活性を阻害する化合物を同定する方法であって：

(a) 細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、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る工

10

20

30

40

50

程；及び

(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を決定する工程を含む方法。

【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】

当該ポリペプチドを通常発現する細胞において P R O 8 4 0 ポリペプチドの発現を阻害する化合物を同定する方法において、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ること、及び前記ポリペプチドの発現が阻害される

10

【請求項 17】

P R O 8 4 0 ポリペプチドのアゴニスト。

【請求項 18】

P R O 8 4 0 ポリペプチドのアンタゴニスト。

【請求項 19】

P R O 8 4 0 ポリペプチドの発現を、前記ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞において阻害する化合物。

【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。

20

【請求項 21】

P R O 8 4 0 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】

P R O 8 4 0 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であって、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決定することを含み、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。

30

【請求項 26】

哺乳動物における心血管、内皮又は血管形成の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) 同じ細胞型の既知の正常組織細胞の対照試料における、P R O 8 4 0 ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを分析することを含み、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血管、内皮又は血管形成の疾患の存在を示す方法。

【請求項 27】

哺乳動物における心血管、内皮又は血管形成の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 P R O 8 4 0 ポリペプチドの有無を検出することを含み、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血管、内皮又は血管形成の疾患の存在を示す方法。

40

【請求項 28】

哺乳動物における心血管、内皮又は血管形成の疾患を診断する方法であって、(a) 前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料を抗-P R O 8 4 0 抗体と接触させること、及び(b) 試験試料中での前記抗体と P R O 8 4 0 ポリペプチドとの複合体形成を検出することを含み、前記複合体の形成が前記哺乳動物における心血管、内皮又は血管形成の疾患の存在を示す方法。

50

【請求項 29】

試料中の P R O 8 4 0 ポリペプチドの存在を決定する方法であって、前記ポリペプチドを含有すると推測される試料を抗-P R O 8 4 0 抗体と接触させること、及び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む方法。

【請求項 30】

抗-P R O 8 4 0 抗体と担体とを適切な包装内に具備してなる心血管、内皮又は血管形成の疾患の診断キット。

【請求項 31】

哺乳動物における心血管、内皮又は血管形成の疾患を治療するための薬剤であって、治療的有効量の P R O 8 4 0 ポリペプチド、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを含む薬剤。

10

【請求項 32】

哺乳動物がヒトである請求項 31 に記載の薬剤。

【請求項 33】

ヒトが心筋梗塞に罹患している請求項 32 に記載の薬剤。

【請求項 34】

ヒトが心肥大、外傷、癌、又は加齢性黄斑変性を有する請求項 32 に記載の薬剤。

【請求項 35】

心肥大が P G F₂ のレベル上昇の存在によって特徴づけられる請求項 34 に記載の薬剤。

20

【請求項 36】

P R O 8 4 0 ポリペプチドを含み、心血管、内皮又は血管形成剤と共に投与される請求項 31 に記載の薬剤。

【請求項 37】

P R O 8 4 0 ポリペプチドを含み、一次血管形成術に続いて投与される請求項 34 に記載の薬剤。

【請求項 38】

心血管、内皮又は血管形成の疾患が癌である請求項 31 に記載の薬剤。

【請求項 39】

P R O 8 4 0 ポリペプチドを含み、化学治療剤、成長阻害剤又は細胞障害剤と組み合わせて投与される請求項 38 に記載の薬剤。

30

【請求項 40】

前記アゴニストが抗-P R O 8 4 0 抗体である請求項 31 に記載の薬剤。

【請求項 41】

前記アンタゴニストが抗-P R O 8 4 0 抗体である請求項 31 に記載の薬剤。

【請求項 42】

哺乳動物における心血管、内皮又は血管形成の疾患を治療するための薬剤であって、P R O 8 4 0 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含む薬剤。

【請求項 43】

前記アゴニストが抗-P R O 8 4 0 抗体である請求項 42 に記載の薬剤。

40

【請求項 44】

前記アンタゴニストが抗-P R O 8 4 0 抗体である請求項 42 に記載の薬剤。

【請求項 45】

哺乳動物がヒトである請求項 42 に記載の薬剤。

【請求項 46】

エキソピボ遺伝子治療を介して投与される請求項 42 に記載の薬剤。

【請求項 47】

本質的に(1)プロモーター、(2)P R O 8 4 0 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

50

シグナル配列からなる、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、本質的に(1)プロモーター、(2)PRO840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なる、レトロウイルスベクターを含む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含み、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の刺激剤であって、PRO840ポリペプチド又はそのアゴニストを含む刺激剤。 10

【請求項 50】

哺乳動物における内皮細胞成長の阻害剤であって、PRO840ポリペプチドのアンタゴニストを含む阻害剤。

【請求項 51】

哺乳動物におけるPRO840ポリペプチドによって誘発される血管形成の阻害剤であって、治療的有効量の抗-PRO840抗体を含む薬剤。

【請求項 52】

哺乳動物におけるPRO840ポリペプチドによって誘発される血管形成の刺激剤であって、治療的有効量の前記ポリペプチドを含む刺激剤。 20

【請求項 53】

図20(配列番号:20)に示す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 54】

図19(配列番号:19)に示す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 55】

図19(配列番号:19)に示すヌクレオチド配列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 56】

ATCC登録番号209858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。 30

【請求項 57】

請求項53から56のいずれか一項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 58】

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57に記載のベクター。

【請求項 59】

請求項57に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 60】

前記細胞がCHO細胞である請求項59に記載の宿主細胞。 40

【請求項 61】

前記細胞が大腸菌である請求項59に記載の宿主細胞。

【請求項 62】

前記細胞が酵母菌細胞である請求項59に記載の宿主細胞。

【請求項 63】

前記細胞がバキュロウイルス感染昆虫細胞である請求項59に記載の宿主細胞。

【請求項 64】

PRO840ポリペプチドの製造方法であって、請求項59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すること、及び前記ポリペプチドを培養培地から 50

回収することを含む方法。

【請求項 65】

図 20 (配列番号: 20) に示す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 66】

図 20 (配列番号: 20) に示す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 67】

A T C C 登録番号 209858 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

10

【請求項 68】

異種アミノ酸配列に融合した請求項 65 から 67 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 69】

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 68 に記載のキメラ分子。

【請求項 70】

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 68 に記載のキメラ分子

【請求項 71】

請求項 65 から 67 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。

20

【請求項 72】

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 71 に記載の抗体。

【請求項 73】

(a) 図 20 に示すポリペプチドであって、その関連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;

(b) 図 20 (配列番号: 20) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連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) 図 20 (配列番号: 20) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連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。

30

【請求項 74】

(a) 図 20 (配列番号: 20) に示すポリペプチドであって、その関連シグナルペプチドを欠くもの;

(b) 図 20 (配列番号: 20) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連シグナルペプチドを有するもの; 又は

(c) 図 20 (配列番号: 20) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであって、その関連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。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、そのような生物学的効果を必要とする哺乳動物において血管形成及び/又は心血管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、心血管障害並びに発癌性疾患の診断及び治療を含む。

【背景技術】

【0002】

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

50

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疾患の管理の最近の進歩の結果として、いずれ慢性心不全を発症しうる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)の入院は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種の主要な代償的メカニズムが心不全の場合に活性化されて、心拍出量が増大する。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たと脈拍、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 及び 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)を促進することで心臓に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肥大であり、心臓の拡大は力学的及びホルモンの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。ホルモンの、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おけ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肥大の発達に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, *Endocrine Reviews*, 12: 208-217(1991); Inoue等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2863-2867(1989); Yanagisawa and Masaki, *Trends Pharm. Sci.*, 10: 374-378(1989); 米国特許第5573762(1996年11月12日公開)。心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。

現在、心肥大の治療は根底にある心臓疾患によって異なる。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、タータロロール(*tertalolol*)、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール、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陰性変力特性によって症状を和らげるのに使用される。Pollick, *N. Engl. J. Med.*, 307: 997-999(1982)。しかしながら、多くの患者において、初期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で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(*methylchlorothiazide*)、ベンズチアジド、ジクロロフェナミド、アセタゾラミド、及びインダパミド；及びカルシウムチャンネル阻害剤、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、圧負荷心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、短期間で心拍出量を改善させるので

、心不全を持つ患者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。臨床試験による証拠は、心臓機能の改善が死亡率を増加させずに達成されることを示唆するが、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の使用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号を参照のこと。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。

10

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、血管収縮作用を示し、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。

20

心不全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I

30

IIの心不全を有する。さらに、機能的な能力及び運動時間の改善はほんのわずかであり、死亡率は減少するものの高いままである。The CONSENSUS Trial Study Group, *N. Engl. J. Med.*, 316(23): 1429-1453(1987); The SOLVD Investigators, *N. Engl. J. Med.*, 325(5): 293-302(1991); Cohn等, *N. Engl. J. Med.*, 325(5): 303-310(1991); The Captopril-Digoxin Multicenter Research Group, *JAMA*, 259(4): 539-544(1988)。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%までに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Brown及びVaughan参照。

40

【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示される。臨床研究では、心血管及び腎臓の疾患の治療において、これら2つの様相の影響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、この役割での活性化主要経路ではないことを示唆する。経路の個々の成分を試験するためにマウス遺伝子「ノックアウト」モデルが作成されている。あるそのようなモデルで、AngIIに対する主要な心臓受容体、ATsub1Aを遺伝学的に欠失させると；これらのマウスでは、AngIIが実験的に与えられたとき、肥大が進行しない(AngIIの二次的な肥大の除去においてモデル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

50

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)に罹り、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時間に渡って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)。最も高い開存率は、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)AAAAt-PA変異体、Keyt等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 3670-3674(1994))は特にボ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、コントロール細胞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, *J. Cell. Biochem.*, 47:211 (1991); Ferrara等, *Endocrine Reviews*, 13:18(1992); Keck等, *Science*, 246: 1309(1989); Connolly等, *J. Biol. Chem.*, 264: 20017(1989); 1990年5月30日に公開された欧州特許第370989号。

既存の内皮からの新しい血管の形成に関する血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、現在では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、血管形成は過形成から腫瘍形成への変化、及び固形腫瘍の成長用

10

20

30

40

50

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)。

血管形成の正の制御因子を探求することで、aFGF、bFGF、TGF- β 、TGF- α 、HGF、TNF- α 、アンジオゲニン、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。これまでに同定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)。

10

【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、血管浸透及び血管形成を誘発するという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)。たった一つのVEGF対立遺伝子であっても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いてこの因子が担っている代替でき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)。

20

また、眼の流体中のVEGF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。

30

【0009】

ある種の細胞により発現され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、新規なタンパク質の合成と無関係に、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、及び創傷治癒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)。

40

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(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

50

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)(W096/17931)、及び通常は成人腎臓細胞に静止され、骨髄芽球-関連-ウイルスI型誘発腎芽細胞腫において過剰発現することが見出されているnovが含まれる。Jolait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、及び細胞増殖が一般的に行われる創傷治癒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)との複合体として、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れる。さらに、特定の側面では、心肥大の治療に一般的に適用できる治療法がないため、心臓ミオサイト肥大を防止又は低減することができる因子を同定することは、病態生理学的な心臓成長を抑制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。

【発明の開示】

【0011】

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、タンパク質は、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、心肥大の阻害及び心肥大の刺激のような効果が望まれる疾患の診断及び/又は治療(予防を含む)、例えば鬱血性心不全の治療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、心血管、内皮又は血管形成の薬剤又はアンジオスタティック(angiostatic)剤、好ましくは血管形成剤又はアンジオスタティック剤を含有する。好ましくは組成物は無菌である。PROポリペプチドは、液状の医薬製剤の形態で投与されてもよく、これは、長期の貯蔵安定性が達成されるように保存されうる。保存された液状の医薬製剤は複数回用量のPROポリペプチドを含有していてもよく、よって繰り返しの使用に適しうる。

【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ポリペプチドとを混合して含有する、心血管、内皮又は血管形成の疾患の治療に有用

10

20

30

40

50

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、P R O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、心血管、内皮又は血管形成の薬剤又はアンジオスタティック剤、好ましくは血管形成剤又はアンジオスタティック剤を含有する。好ましくは組成物は無菌である。P R Oポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストは、液状の医薬製剤の形態で投与してもよく、長期の貯蔵安定性が達成されるように保存されうる。保存された液状の医薬製剤は複数回用量のP R O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、よって繰り返しの使用に適しうる。

10

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、治療的に有効量のP R Oポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストとを混合して含有する、心血管、内皮又は血管形成の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-P R O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、心血管、内皮又は血管形成の薬剤又はアンジオスタティック剤、好ましくは血管形成剤又はアンジオスタティック剤を含有する。好ましくは組成物は無菌である。組成物は、液状の医薬製剤の形態で投与してもよく、長期の貯蔵安定性が達成されるように保存されうる。保存された液状の医薬製剤は複数回用量の抗-P R O抗体を含有していてもよく、よって繰り返しの使用に適しうる。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。

20

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-P R O抗体とを混合して含有する、心血管、内皮又は血管形成の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) P R Oポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを含む物質の組成物；
- (b) 該組成物を収容する容器；及び
- (c) 心血管、内皮又は血管形成の疾患の治療における該P R O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使用を記した、該容器に添付されるラベル又は該容器に収納される添付文書を具備する製造品を提供し、該アゴニスト又はアンタゴニストはP R Oポリペプチドに結合する抗体でありうる。組成物は、治療的有効量のP R O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もよい。

30

他の実施態様において、本発明は、P R O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、P R O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ること；及び

(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により前記試験化合物が有効なアゴニストであることを示す。

40

他の実施態様において、本発明は、P R O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、P R O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ること；及び

(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、細胞増殖の刺激により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P R Oポリペプチドの活性を阻害する化合物の同定方法を

50

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る工程；及び

(b) 前記細胞性反応の誘発を測定して、試験化合物が有効なアンタゴニストであるか否かを決定する工程を含む。

10

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る工程；及び

(b) 前記細胞の増殖を測定して、試験化合物が有効なアンタゴニストであるか否かを決定する工程を含む。

他の実施態様では、本発明は、通常PROポリペプチドを発現する細胞における該PROポリペプチドの発現を阻害する化合物の同定方法を提供し、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決定することを含む。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る工程；及び

20

(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、上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、PROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストに関し、任意には上記の方法により同定されてもよい。

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つの型は抗体である。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。

30

また更なる実施態様では、本発明は、PROポリペプチドコード化核酸配列における突然変異に関連する疾患又は疾患に対する感受性を診断する方法であって、PROポリペプチド核酸配列の前記突然変異の存否を決定することを含み、前記突然変異の存否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を提供する。

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血管、内皮又は血管形成の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血管、内皮又は血管形成の疾患の存在を示す。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。

40

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血管、内皮又は血管形成の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PRO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PROポリペプチドの有無が前記哺乳動物における心血管、内皮又は血管形成の疾患の存在

50

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血管、内皮又は血管形成の疾患を診断する方法を提供し、それは、(a)哺乳動物から得た組織細胞の試験試料を抗-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血管、内皮又は血管形成の疾患の存在を示す。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、心血管、内皮又は血管形成の疾患を持つと推定される個体から得られる。

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血管、内皮又は血管形成の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、心血管、内皮又は血管形成の疾患は癌である。

さらに他の実施態様では、本発明は、哺乳動物における心血管、内皮又は血管形成の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、疾患は心肥大、創傷又は火傷などの外傷、又はあるタイプの癌である。さらなる態様では、心血管、内皮又は血管形成の疾患があるタイプの癌であるならば、哺乳動物は、血管形成術、又は心血管、内皮又は血管形成の疾患を治療するための薬剤、例えばACEインヒビター、又は化学療法剤にさらに曝される。好ましくは哺乳動物はヒト、好ましくは心肥大になる危険性のあるヒト、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、心肥大は、PGF₂レベルの上昇があることにより特徴付けられる。あるいは、心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、心筋梗塞の後、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、心血管、内皮又は血管形成の疾患は心肥大であり、前記PROポリペプチドは心血管、内皮又は血管形成の薬剤と共に投与される。この目的のために好ましい心血管、内皮又は血管形成の薬剤は、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ゲン活性化因子である。

他の好ましい態様において、心血管、内皮又は血管形成の疾患は心肥大であり、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血管、内皮又は血管形成の薬剤にさらに曝される。

他の好ましい実施態様において、心血管、内皮又は血管形成の疾患は癌であり、PROポリペプチドは化学療法剤、成長阻害剤又は細胞障害剤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、哺乳動物の心血管、内皮又は血管形成疾患の治

10

20

30

40

50

療方法に関し、それは、P R O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、心血管、内皮又は血管形成の疾患は心肥大、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、有効量の血管形成剤又はアンジオスタティック剤が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、哺乳動物の心血管、内皮又は血管形成疾患の治療方法に関し、それは、P R O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、心血管、内皮又は血管形成の疾患は心肥大、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、有効量の血管形成剤又はアンジオスタティック剤が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、哺乳動物の心血管、内皮又は血管形成疾患の治療方法に関し、それは、抗-P R O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、心血管、内皮又は血管形成の疾患は心肥大、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、有効量の血管形成剤又はアンジオスタティック剤が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、心血管、内皮又は血管形成の疾患を患っている哺乳動物の心血管、内皮又は血管形成疾患の治療方法を提供し、それは、(a) P R Oポリペプチド、(b) P R Oポリペプチドのアゴニスト、又は(c) P R O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-P R O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、エキソピ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、本質的に、プロモーター、(a) P R Oポリペプチド、(b) P R Oポリペプチドのアゴニストポリペプチド、又は(c) P R Oポリペプチドのアンタゴニストポリペプチドをコード化する核酸、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伴っている。好ましくは、シグナル配列は哺乳動物、例えば天然P R Oポリペプチド由来のものである。

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し、さらに、本質的にはプロモーター、(a) P R Oポリペプチド、(b) P R Oポリペプチドのアゴニストポリペプチド又は(c) P R O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なるレトロウイルスベクターを有する、核酸構造体を含むエキソピボ産生細胞(producer cell)を提供し、前記産生細胞は、構造タンパク質を伴うレトロウイルスベクターを含み、組換えレトロウイルス粒子を産生する。

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成長を阻害する方法であって、(a) P R Oポリペプチド、(b) P R Oポリペプチドのアゴニスト、又は(c) P R O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成長が阻害される方法を提供し、前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-P R O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成長を刺激する方法であって、(a) P R Oポリペプチド、(b) P R Oポリペプチドのアゴニスト、又は(c) P R O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る方法を提供し、前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-P R O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、哺乳動物の心肥大を阻害する方法であって、(a) P R Oポリペプチド、(b) P R Oポリペプチドのアゴニスト、又は(c) P R Oポリペ

10

20

30

40

50

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、前記哺乳動物の心肥大が阻害される方法を提供し、前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-P R O抗体であってよい。好ましくは、哺乳動物はヒトであり、心肥大は心筋梗塞によって誘発されたものである。

【 0 0 1 9 】

また他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の心肥大を刺激する方法であって、(a) P R Oポリペプチド、(b) P R Oポリペプチドのアゴニスト、又は(c) P R O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、前記哺乳動物の心肥大が刺激される方法を提供し、前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-P R O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P R O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-P R O抗体を投与することを含んでなる。好ましくは、哺乳動物はヒトであり、より好ましくは哺乳動物は腫瘍又は網膜疾患に罹ったヒトである。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物においてP R O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P R O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、哺乳動物における内皮細胞成長を抑制する方法であって、哺乳動物へのP R O 3 3 3、P R O 3 6 4、P R O 8 7 7、P R O 8 7 9、P R O 8 8 2又はP R O 8 8 5ポリペプチド又はそのアゴニストの投与を含んでなり、前記哺乳動物において内皮細胞成長が抑制される方法を提供する。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物における内皮細胞成長を刺激する方法であって、哺乳動物へのP R O 1 7 9、P R O 3 2 1、P R O 8 4 0、P R O 8 4 4、P R O 8 4 6、P R O 8 7 8又はP R O 8 7 9ポリペプチド又はそのアゴニストの投与を含んでなり、前記哺乳動物において内皮細胞成長が刺激される方法を提供する。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物における内皮細胞成長を抑制する方法であって、哺乳動物へのP R O 1 7 9、P R O 3 2 1、P R O 8 4 0、P R O 8 4 4、P R O 8 4 6、P R O 8 7 8又はP R O 8 7 9ポリペプチドのアンタゴニストの投与を含んでなり、前記哺乳動物において内皮細胞成長が抑制される方法を提供する。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物における内皮細胞成長を刺激する方法であって、哺乳動物へのP R O 3 3 3、P R O 3 6 4、P R O 8 7 7、P R O 8 7 9、P R O 8 8 2又はP R O 8 8 5ポリペプチドのアンタゴニストの投与を含んでなり、前記哺乳動物において内皮細胞成長が刺激される方法を提供する。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物における心肥大を誘発する方法であって、哺乳動物へのP R O 2 0 5、P R O 8 8 2またはP R O 8 8 7ポリペプチドまたはそのアゴニストの投与を含んでなり、前記哺乳動物において心肥大が誘発される方法を提供する。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物における心肥大を減少させる方法であって、哺乳動物へのP R O 2 3 8、P R O 8 7 8またはP R O 1 7 6 0ポリペプチドまたはそのアゴニストの投与を含んでなり、前記哺乳動物において心肥大が減少する方法を提供する。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物における心肥大を誘発する方法であって、哺乳動物へのP R O 2 3 8、P R O 8 7 8またはP R O 1 7 6 0ポリペプチドのアンタゴニストの投与を含んでなり、前記哺乳動物において心肥大が誘発される方法を提供する。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物における心肥大を減少させる方法であって、哺乳動物へのP R O 2 0 5、P R O 8 8 2またはP R O 8 8 7ポリペプチドのアンタゴニストの投与を含んでなり、前記哺乳動物において心肥大が減少する方法を提供する。

また他の実施態様では、本発明は、P R O 1 7 9、P R O 3 2 1、P R O 8 4 0、P R O 8 4 4、P R O 8 4 6、P R O 8 7 8又はP R O 8 7 9ポリペプチドにより誘発される

10

20

30

40

50

血管形成を抑制する方法であって、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り、前記血管形成が抑制される方法を提供する。

また他の実施態様では、本発明は、PRO179、PRO321、PRO840、PRO844、PRO846、PRO878又はPRO879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であって、哺乳動物に前記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り、前記血管形成が刺激される方法を提供する。

【0020】

B. さらになる実施態様

本発明の他の態様において、本発明は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。 10

一態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示されるような全長アミノ酸配列、ここに開示されるようなシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示されるようなシグナルペプチドを有する又は欠く膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示されるような全長アミノ酸配列の特に同定された他の断片を有する、PROポリペプチドをコードするDNA分子、あるいは(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して少なくとも約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、さらに、より好ましくは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。 20

他の態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示されるような全長PROポリペプチドcDNAコード化配列、ここに開示されるような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、ここに開示されるようなシグナルペプチドを有する又は欠く膜貫通PROポリペプチドの細胞外ドメインのコード化配列、又はここに開示されるような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有する、DNA分子、あるいは(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して少なくとも約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、さらに、より好ましくは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。 30 40

【0021】

さらになる態様では、本発明は(a)ここに開示されるようなATCCに寄託されたヒト 50

タンパク質 cDNA の任意のものにコード化されるものと同じ成熟ポリペプチドをコード化する DNA 分子、あるいは (b) (a) の DNA 分子の相補鎖に対して少なくとも約 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、さらに、より好ましくは少なくとも約 99% の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。

10

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。

20

他の実施態様は PRO ポリペプチドコード化配列の断片、又はその相補鎖に関し、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」という語の内容は基準とする長さのプラス又はマイナス 10% の基準ヌクレオチド配列長を意味する。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、日常的な手法で決定してもよい。このような PRO ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列が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

30

40

50

片も考慮される。

【0022】

他の実施態様では、本発明は、上記で同定された単離された核酸配列の任意のものにコードされる単離されたPROポリペプチドを提供する。

ある態様では、本発明は、ここに開示されるような全長アミノ酸配列、ここに開示されるようなシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示されるようなシグナルペプチドを有する又は欠く膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、あるいはここに開示されるような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、さらに、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化されるアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、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、さらに、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、ここに開示されるような全長アミノ酸配列、ここに開示されるようなシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示されるようなシグナルペプチドを有する又は欠く膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、あるいはここに開示されるような全長アミノ酸配列の特に同定された他の断片を持つ、PROポリペプチドのアミノ酸配列と比較したときに、少なくとも約80%ポジティブ、あるいは少なくとも約81%ポジティブ、あるいは少なくとも約82%ポジティブ、あるいは少なくとも約83%ポジティブ、あるいは少なくとも約84%ポジティブ、あるいは少なくとも約85%ポジティブ、あるいは少なくとも約86%ポジティブ、あるいは少なくとも約87%ポジティブ、あるいは少なくとも約88%ポジティブ、あるいは少なくとも約89%ポジティブ、あるいは少なくとも約90%ポジティブ、あるいは少なくとも約91%ポジティブ、あるいは

少なくとも約 92% ポジティブ、あるいは少なくとも約 93% ポジティブ、あるいは少なくとも約 94% ポジティブ、あるいは少なくとも約 95% ポジティブ、あるいは少なくとも約 96% ポジティブ、あるいは少なくとも約 97% ポジティブ、あるいは少なくとも約 98% ポジティブ、さらに、あるいは少なくとも約 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 P R O 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ノ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化するヌクレオチド配列によってコード化される、単離された P R O 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有する宿主細胞を、P R O 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 P R O ポリペプチドを回収することを含む。

10

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 P R O 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、P R O 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 P R O 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 P R O 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-P R O 抗体又は小分子である。

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

20

【0024】

またさらなる実施態様では、本発明は、P R O ポリペプチド、又はここに記載されるような P R O ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-P R O 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、P R O ポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニストあるいは抗-P R O 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、P R O ポリペプチド、上記したようなそのアゴニスト又はアンタゴニストあるいは抗-P R O 抗体の使用に関する。

30

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化する D N A 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 C H O 細胞、大腸菌、酵母、又はバキュロウイルス感染昆虫細胞であってよい。ここに記載する任意のポリペプチドの製造方法がさらに提供され、それは、宿主細胞を所望のポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培地から所望のポリペプチドを回収することを含む。

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、エピトプタグ配列又は免疫グロブリンの F c 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。

40

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 c D N A 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】

I. 定義

50

「心血管、内皮及び血管形成の疾患」、「心血管、内皮及び血管形成機能不全」、「心血管、内皮又は血管形成の疾患」及び「心血管、内皮又は血管形成機能不全」という言葉は互換可能に使用され、一つには血管に影響する全身性の疾患、例えば糖尿病、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を称する。これには、血管形成及び/又は心血管新生を刺激する徴候、及び血管形成及び/又は心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、及び他の組織損傷、移植固定、瘢痕化、虚血再灌流傷害、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、心肥大、及び心不全、例えばCHFも含まれる。

10

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、細胞分割を伴わない、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。心肥大の初期段階は、通常、ミオフィブリンとミトコンドリアのサイズの増加、並びにミトコンドリアと核の拡大により形態学的に特徴付けられる。この段階において、筋細胞は正常なものよりもより大きくなり、細胞の構成はほとんど維持される。心肥大の段階がさらに進行すると、特定のオルガネラ、例えばミトコンドリアの数及びサイズが優先的に増加し、新規の収縮エレメントは不規則な方法で、細胞の局在領域に添加される。長年にわたって肥大を被っている細胞は、隣接するミオフィブリンを置換して正常なZ膜レジストレーションの破壊を引き起こす高度分葉膜を有し、かなり拡大した核を含む、細胞組織化においてより明確な分裂を示す。「心肥大」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。従って、その用語は、心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。

20

30

【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。心不全は虚血性、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様々な徴候を有するが、一つの特徴的な症状は心室肥大である。CHFは多くの様々な心疾患の共通した終末的な結果である。

40

「心筋梗塞」は、しばしば多重冠動脈血栓症を伴う、冠動脈のアテローム性動脈硬化の結果であると一般的にされている。それは、心室壁の全厚みにわたって心筋壊死がある壁内梗塞、及び心室壁を通して心外膜に至る全ての経路に伸長することなく、壊死が内皮下層、心筋壁内、又はその両方にある副心内膜(非壁内)梗塞の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

50

じるDNA合成が刺激され、影響を受けていない心臓領域におけるコラーゲンの形成が増加する。

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った結果肥大した心室の特徴は、障害性の心拡張能である。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非正常にかかわらず、早期に本態性高血圧が検出された。Hartford等, Hypertension, 6: 329-338(1984)。しかし、血圧レベルと心肥大との間に密接な平行関係はない。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(プロプラノロール)、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)。

10

20

30

40

50

【0027】

心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。

これら全てと、心肥大を伴っていてもいなくてもよいが他の心血管、内皮及び血管形成の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称する又は説明する。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、その他上述した血管腫瘍に関するものである。

ここで用いられる「細胞障害剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は抑制し及び/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)、化学療法剤、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。

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学化合物である。化学療法剤の例には、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、ピンブラスチン、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、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ビノレルピン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラマイシン (米国特許第4,675,187号参照)、メルファラン及び関連するナイトロジェンマスタードを含む。また、タモキシフェン及びオナプリストン等の腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように機能するホルモン薬もこの定義に含まれる。

【0029】

「成長阻害剤」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、成長阻害剤は、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。成長阻害剤の例は、細胞周期の進行を (S相以外の位置で) 阻止する薬剤、例えば、G1停止及びM相停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM相ブロッカーは、ピンカス (ピンクリスチン及びピンブラスチン)、タキソール、及びトポII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W091/01753を参照されたい)、又はHER2レセプターに結合可能な抗体 (W089/06692)、例えば4D5抗体 (及びそれらの機能的等価物) (例えばW092/22653) が含まれる。

「治療」とは、心血管、内皮及び血管形成疾患の病的状態の進行又は変化の防止を意図して行われる処置である。治療の概念は最も広い意味に使用され、任意の段階の心血管、内皮及び血管形成疾患の抑制 (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、患者は肥大等の心血管、内皮及び血管形成の疾患を防止又は遅延化 (減少) 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、初期の治療効果を、例えば抗肥大効果を長時間に渡って維持するように、急性様式とは異なり連続的な様式での薬剤投与を称する。

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。

—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】

「心血管、内皮及び血管形成の薬剤」なる言葉は、一般的に、心血管、内皮及び血管形成の疾患の治療に作用する任意の薬剤を称する。心血管剤の例は、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-I I レセプターアンタゴニスト：エンドセリンレセプターアンタゴニスト、例えばBOSENTAN^T M^M 及びMOXONODIN^T M^M、インターフェロン-ガンマ(I F N-)；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-P A、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-P A変異体、TNK t-P A(T 1 0 3 N、N 1 1 7 Q、K H R R (296-299)A A A A t-P A変異体、Keyt等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3670-3674(1994))：強心薬又は昇圧薬、例えばジゴキシゲニン、及び -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(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、及びカルベジロール：アンジオテンシン転換酵素(A C E)インヒビター、例えばキナプリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル及びリシノプリル；ジウレティクス、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、メチルクロロチアジド、ベンズチアジド、ジクロルフェナミド、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。この種の好ましいカテゴリーの一つは、心肥大、又は心肥大の進行のきっかけとなる生理学的状態、例えば血圧の上昇、大動脈狭窄又は心筋梗塞の治療に使用される治療薬である。

「血管形成剤」及び「内皮薬」は、血管形成及び/又は内皮細胞の成長、又は適切であるならば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 (I G F - I)、V E G F、V I G F、P D G F、表皮成長因子(E G F)、C T G F及びそのファミリーのメンバー、F G F、及びT G F - 及びT G F - が含まれる。

「アンジオスタティック剤」は血管形成又は管形成を阻害、又は癌細胞の成長を阻害又は防止する活性剤である。例には、上述した血管形成剤の抗体又は他のアンタゴニスト、例えばV E G Fに対する抗体が含まれる。さらに、細胞治療薬、例えば細胞障害剤、化学療法剤、成長阻害剤、アポトーシス薬、及び癌を治療する他の薬剤、例えば抗-H E R - 2、抗-C D 2 0、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P R O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-P R O抗体の「治療的有效量」とは、哺乳動物の心血管、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P R O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-P R O抗体の「有効量」とは記載した目的の実行に有効な量を意図するものであり、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「P R Oポリペプチド」及び「P R O」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、P R O / 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「P R O / 数字ポリペプチド」及び「P R O / 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

10

20

30

40

50

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位置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ポリペプチドの細胞外ドメインは、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、本願明細書及び/又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配列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、ここに開示されるような全長天然配列PROポリペプチド配列、シグナルペプチドを欠くここに開示されるようなPROポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は欠くここに開示されるようなPROポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示されるような全長PROポリペプチド配列の他の断片と、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、ここに開示されるような全長天然配列PROポリペプチド配列、シグナルペプチドを欠くここに開示されるようなPROポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は欠くここに

開示されるようなPROポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示されるような全長PROポリペプチド配列の他の特に同定される断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有している。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。

10

20

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完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2A-2D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2A-2B)及び%核酸配列同一性(表2C-2D)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。

30

【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, 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, _M, 0, _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}
};

```

10

20

```

/*
*/
#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 DINSO       8       /* penalty for a gap */
#define DINS1       1       /* penalty per base */
#define PINSO       8       /* penalty for a gap */
#define PINS1       4       /* penalty per residue */

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

struct diag {
    int            score;     /* score at last jmp */
    long           offset;    /* offset of prev block */
    short          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();

```

10

20

30

40

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"
10

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

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

main(ac, av)
11
    int    ac;
    char   *av[];
12
{
    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;
13
    endgaps = 0;
    ofile = "align.out";
    nw();
    readjumps();
    print();
    cleanup(0);
14
}
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

```

```

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

    dx = (struct diag *)g_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;
        }
    }
}

```

10

20

30

40

...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
 */

```

...nw

```

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

```

10

20

30

40

```

/*
 *
 * 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"
```

10

```

#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();
}

```

20

30

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */

```

```

static

```

```

getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)

```

getmat

```

    int    lx, ly;                /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;    /* leading trailing overlap */

```

```

{

```

```

    int          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 (xbrn[*p0-'A']&xbrn[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].n[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0+];
            if (n1++ == pp[1].n[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);

```

10

20

30

40

```

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()
{
    int nn;          /* char count */
    int more;
    register i;

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

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

```

...getmat

10

20

pr_align

30

40

```

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

        more++;

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

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

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

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

```

...pr_align

10

20

30

dumpblock

40

...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 /= 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;

```

10

20

30

40

...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);
}

```

10

```

/*
 * 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] == ' ' && *(p0) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(p1) == ' '))
        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';
}

```

20

30

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */

```

```

static
stripname(pn)
    char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

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

```

stripname

40

50

```

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

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

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

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
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)
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';
}

```

cleanup

10

20

getseq

30

40

...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);
}

```

10

```

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

```

g_calloc

20

```

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

    if (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--)

```

readjmps

30

40

...readjumps

```

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

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

```

```

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

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

```

writejumps

10

【 0 0 3 4 】

表2A

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

20

% 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%

【 0 0 3 5 】

表2B

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

30

% 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%

【 0 0 3 6 】

表2C

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)

40

% 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%

【 0 0 3 7 】

50

表2D

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ = 12 ヌクレオチド)
比較DNA	NNNNLLLLVV	(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%

10

【0038】

ここで同定される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)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の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コンピュータプログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、表1に示したソースコードは米国著作権事務所、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プログラムはジェネンテック社、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(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

20

30

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数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。%アミノ酸配列同一性の計算の例として、表2A-2B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。

40

【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

50

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

分率 X/Y の100倍

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

さらに、%アミノ酸配列同一性は、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、以下に定義されるような活性なPROポリペプチドをコード化する核酸分子を意味し、ここに開示されるような全長天然配列PROポリペプチド配列、シグナルペプチドを欠くここに開示されるような全長天然配列PROポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は欠くここに開示されるようなPROポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示されるような全長PROポリペプチド配列の他の断片を、コード化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、ここに開示されるような全長天然配列PROポリペプチド配列、シグナルペプチドを欠くここに開示されるような全長天然配列PROポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は欠くここに開示されるようなPROポリペプチドの細胞外ドメイン、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、コード化する核酸配列と少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有している。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】

ここに同定される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、PROポリペプチドコード化核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegaAlign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の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コンピュータプログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、表1に示したソースコードは米国著作権事務所、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プログラムはジェネンテック社、South San Francisco, Californiaを通して公的に入手可能であり、また表1に与えられるソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

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の長さとは異なる場合、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2C-2D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://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードでき、その他Health, Bethesda, MDのNational Instituteから得ることができる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパスe-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62

10

20

30

40

50

を含む。

【0042】

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

分率W/Zの100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアの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の長さとは異なる場合、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。 10

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核酸分子の核酸配列と、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PRO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分子のヌクレオチドの総数で除した商によって決定される。例えば、「核酸配列Bに対して少なくとも80%の核酸配列同一性を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分子であり、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。 20

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化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、それぞれ図2(配列番号: 2)、図4(配列番号: 4)、図6(配列番号: 6)、図8(配列番号: 8)、図10(配列番号: 10)、図12(配列番号: 12)、図14(配列番号: 14)、図16(配列番号: 16)、図18(配列番号: 18)、図20(配列番号: 20)、図22(配列番号: 22)、図24(配列番号: 24)、図26(配列番号: 26)、図28(配列番号: 28)、図30(配列番号: 30)、及び図32(配列番号: 32)に示される全長PROポリペプチドをコード化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りうる。 30

【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類似した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3で特定するように)好ましい置換とされるものである。 40

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とすることもできる)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値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の長さとは異なる場合、AのBに対する% 50

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十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離されたポリペプチドには、PROの自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも1つの精製工程により調製される。

PROポリペプチドをコード化する「単離された」核酸分子、又は抗-PRO抗体をコード化する「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、自然に結合する全ての構成成分と結合していない。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化する単離された核酸分子、又は抗-PRO抗体をコード化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読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

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、Curre

10

20

30

40

50

nt Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

ここで定義される「緊縮性条件」又は「高度の緊縮性条件」は、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2)ハイブリッド形成中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42において50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；(3)42における50%ホルムアミド、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 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十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8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、年齢関連性斑变性、新血管新生緑内障、血管腫、甲状腺過形成(グレイブス病を含む)、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 P R O 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 P R O 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。

10

「小分子」とは、ここでは約 5 0 0 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「P R O ポリペプチドレセプター」なる用語は、P R O 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 P R O 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。

【 0 0 4 6 】

「抗体」(A b s)と「免疫グロブリン」(I g s)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。

20

「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 1 5 0 0 0 0 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。

30

「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(C D R)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(F R)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つの C D R により連結されたシート配置を主にとる4つの F R 領域をそれぞれ含んでいる。各鎖の C D R は、F R により近接して結合せしめられ、他の鎖の C D R と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している。Kabat等, NIH Publ. No.91-3242, Vol.1, 647-669頁[1991]を参照のこと。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害活性への抗体の関与を示す。

40

【 0 0 4 7 】

「抗体断片」には、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域が含まれる。抗体断片の例には、F a b、F a b'、F (a b')₂ 及び F v 断片；ダイアボディー(diabodies)；直鎖状抗体(Zapata等, Protein Eng. 8(10):1057-1062[1995])；単

50

鎖抗体分子；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。

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

「F v」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この配置において、各可変ドメインの3つのCDRは相互に作用してV_H-V_L二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つのCDRが抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つのCDRのみを含むF vの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

10

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

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

20

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには5つの主たるクラス：I g A、I g D、I g E、I g G及びI g Mがあり、それらのいくつかは更にサブクラス(アイソタイプ)、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3及びI g G 4、I g A及びI g A 2に分割される。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、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に対するものである。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。

30

40

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])。

50

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、対象とす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に由来する、PRIMATIZED™抗体を含む。

10

【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, Rosenberg及びMoore編(Springer-Verlag, New York, 1994)pp.269-315を参照されたい。

20

「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。

30

「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%を超える抗体、最も好ましくは99重量%を超えるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離された抗体には、抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイトの抗体が含まれる。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。

40

「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。

50

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

【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又はPRO887DNAに適切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、アミノ酸変化がPRO179、PRO238、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を理解するであろう。

天然全長配列PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PR

O 8 7 7、P R O 8 7 8、P R O 8 7 9、P R O 8 8 2、P R O 8 8 5 又は P R O 8 8 7
 又はここに記載した P R O 1 7 9、P R O 2 3 8、P R O 3 6 4、P R O 8 4 4、P R O
 8 4 6、P R O 1 7 6 0、P R O 2 0 5、P R O 3 2 1、P R O 3 3 3、P R O 8 4 0、
 P R O 8 7 7、P R O 8 7 8、P R O 8 7 9、P R O 8 8 2、P R O 8 8 5 又は P R O 8
 8 7 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 P R O 1 7 9、P R O 2 3 8、P R O 3 6 4、P R O 8 4 4、
 P R O 8 4 6、P R O 1 7 6 0、P R O 2 0 5、P R O 3 2 1、P R O 3 3 3、P R O 8
 4 0、P R O 8 7 7、P R O 8 7 8、P R O 8 7 9、P R O 8 8 2、P R O 8 8 5 又は P
 R O 8 8 7 と比較して P R O 1 7 9、P R O 2 3 8、P R O 3 6 4、P R O 8 4 4、P R
 O 8 4 6、P R O 1 7 6 0、P R O 2 0 5、P R O 3 2 1、P R O 3 3 3、P R O 8 4 0
 、P R O 8 7 7、P R O 8 7 8、P R O 8 7 9、P R O 8 8 2、P R O 8 8 5 又は P R O
 8 8 7 のアミノ酸配列が変化する P R O 1 7 9、P R O 2 3 8、P R O 3 6 4、P R O 8
 4 4、P R O 8 4 6、P R O 1 7 6 0、P R O 2 0 5、P R O 3 2 1、P R O 3 3 3、P
 R O 8 4 0、P R O 8 7 7、P R O 8 7 8、P R O 8 7 9、P R O 8 8 2、P R O 8 8 5
 又は P R O 8 8 7 をコード化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 P R O 1 7 9、P R O 2 3 8、P
 R O 3 6 4、P R O 8 4 4、P R O 8 4 6、P R O 1 7 6 0、P R O 2 0 5、P R O 3 2
 1、P R O 3 3 3、P R O 8 4 0、P R O 8 7 7、P R O 8 7 8、P R O 8 7 9、P R O
 8 8 2、P R O 8 8 5 又は P R O 8 8 7 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、P R O 1 7 9、P R O 2 3 8、P R O 3 6 4、P R O 8 4
 4、P R O 8 4 6、P R O 1 7 6 0、P R O 2 0 5、P R O 3 2 1、P R O 3 3 3、P R
 O 8 4 0、P R O 8 7 7、P R O 8 7 8、P R O 8 7 9、P R O 8 8 2、P R O 8 8 5 又
 は P R O 8 8 7 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。

【 0 0 5 2 】

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 3 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 3 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 3

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

10

PRO 179、PRO 238、PRO 364、PRO 844、PRO 846、PRO 1760、PRO 205、PRO 321、PRO 333、PRO 840、PRO 877、PRO 878、PRO 879、PRO 882、PRO 885又はPRO 887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。

20

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、PRO 179、PRO 238、PRO 364、PRO 844、PRO 846、PRO 1760、PRO 205、PRO 321、PRO 333、PRO 840、PRO 877、PRO 878、PRO 879、PRO 882、PRO 885又はPRO 887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。

30

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。

40

【0054】

B. PRO 179、PRO 238、PRO 364、PRO 844、PRO 846、PR

50

O1760、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つのタイプは、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、グルタミル及びアスパラギン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、プロリン及びリジ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、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の-N-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タイプには、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更が含まれる。「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、PRO846、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化する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化するコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)により、及びEdge等, Anal. Biochem., 118: 131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, Meth. Enzymol. 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

本発明の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(PEG)、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の容易な精製を可能にする。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)]; -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、PRO321、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化する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、同定され単離される。分離発現のラウンドで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DNA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
10
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」、
20
「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化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
30
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
40
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、P
50

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をコード化する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化するDNAは、PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887をコード化するmRNAを保有し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をコード化する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化する遺伝子は、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。PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887をコード化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、十分な長さで、疑陽性が最小化されるよう十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリ内のDNAとのハイブリッド形成時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、³²P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。中程度のストリンジエンシー及び高度のストリンジエンシー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ェアプログラム、例えばALIGN、D

10

20

30

40

50

NAstar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】

i i . 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載した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化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、CaPO₄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公開第WO89/05859号に記載されるように、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 (ATCC 27,325)及びK5772 (ATCC53,635)である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、*E. coli*、エンテロバクター、エルビニア(*Erwinia*)、クレブシエラ(*Klebsiella*)、プロテウス(*Proteus*)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス(*Serratia marcescans*)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバシリスプチリス(*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、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生産発酵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化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 ompTkan^rを有する大腸菌W3110株27C7 (ATCC 55,244)；完全な遺伝子型tonA prt3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7i1vGkan^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。

10

【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プ(Schizosaccharomyces pombe) (Beach及びNurse, Nature, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日発行のEP 139,383)；クリュイペロミセス宿主(Kluyveromyces hosts) (米国特許第4,943,529号；Fleer等, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991))、例えばクリュイペロミセス・ラクティス(K. lactis) (MW98-8C, CBS683, CBS4574；Lourencourt等, J. Bacteriol. 737 [1983])、クリュイペロミセス・フラギリス(K. fragilis) (ATCC 12,424)、クリュイペロミセス・ブルガリクス(K. bulgaricus) (ATCC 16,045)、クリュイペロミセス・ウイケラミイ(K. wickerhamii) (ATCC 24,178)、クリュイペロミセス・ワルチイ(K. waltii) (ATCC 56,500)、クリュイペロミセス・ドロソフィラルム(K. drosophilum) (ATCC 36,906；Van den Berg等, Bio/Technology, 8: 135 (1990))、クリュイペロミセス・テモトレランス(K. thermotolerans)及びクリュイペロミセス・マルキシアナス(K. marxianus)；ヤロウイア(yarrowia) (EP 402,226)；ピッチャパストリス(Pichia pastoris) (EP 183,070；Sreekrishna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、ニューロスボラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(Tolyocladium) (1991年1月10日発行のWO 91/00357)；及びコウジ菌、例えば偽巢性コウジ菌(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。

20

30

40

グリコシル化PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887をコード化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及びスポドプテラ(Spodoptera)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

50

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 80 65); 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】

i i i . 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をコード化する核酸(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ポリ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をコード化する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、酵母インペルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及びクレイペロマイシス(Kluyveromyces) 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリーダー、白体(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行の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

10

20

30

40

50

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化する。

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をコード化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); Kingsman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をコード化する核酸配列に作用可能に結合し、mRNA合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識される好適なプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 [Chang等, Nature, 275:615 (1978); Goeddel等, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776]、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーター [deBoer等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]を含む。細菌系で使用するプロモーターもまたPRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887をコード化するDNAと作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ(S.D.)配列を有する。

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

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

ウイルス(1989年7月5日公開のUK 2,211,504)、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及びサルウイルス40(SV40)のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

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をコード化する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、エラストラーゼ、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、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887をコード化する配列の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、真核生物又はウイルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887をコード化する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をコード化するDNAに融合し特異的抗体エピトープをコード化する外因性配列に対して調製され得る。

10

【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^{T M} 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ポリペプチドをコード化する核酸の発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。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質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ブ

20

30

40

【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

50

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ー結合アッセイ、機能活性が第2のメッセンジャーの細胞内レベルを測定することにより、Rat-I細胞内で測定されるイノシトールホスファート蓄積アッセイ、雄のニュージーランドウサギの内皮を使用するインビトロ(単離された管)研究において、添加化合物の、培養血管平滑筋内でのエンドセリン刺激アラキドン酸の放出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、及び雄SDラットを使用するインビボ研究が含まれる。

組織生成活性のアッセイには、限定するものではないが、W095/16035(骨、軟骨、腱)、
; W095/05846(神経、ニューロン)、及びW091/07491(皮膚、内皮)に記載されているものが
含まれる。 10

傷治癒活性のアッセイには、例えば、Eaglstein及びMertz, J. Invest. Dermatol., 7
1: 382-384(1978)の論文で改変されている、Winter, Epidermal Wound Healing, Maibach,
HI及びRovee, DT, 編(Year Book Medical Publishers. Inc., Chicago), pp71-112に記
載されているものが含まれる。

エンドセリン B_1 (ET B_1)レセプターポリペプチドに結合し、シグナル変換活性を調
節する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
コード化する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ことを含む。 20

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、「Adul
t ventricular rat heart muscle cells」, Cell Culture Techniques in Heart and Ve
ssel 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 (PG F_2)
は、これら成長細胞の転移反応を誘発することが示されている。ついで、種々の心肥大の
潜在的インヒビターによる、PG F_2 又はPG F_2 類似体(例えばフルプロステノー
ル)及びフェニレフリンにより誘発されるミオサイト伝播性の抑制を試験する。 30

【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(PG
 F_2 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PG F_2 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ポリペプチドの効果は、PROポリペプチドを受けていないフルプロス
テノール処理ラットに比較した、心臓、心室及び左心室の重量(体重によって規準化)を測
定することにより決定される。 40

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. Phys
iol., 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) 50

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での性質は、ヒト患者での反応を特に予測的にする。腫瘍及び癌(乳癌、結腸癌、前立腺癌、肺癌等)の動物モデルには、非組換え及び組換え(トランスジェニック)動物が含まれる。非組換え動物モデルには、例えば齧歯動物、例えばネズミモデルが含まれる。このようなモデルは標準的な技術、例えば皮下注射、尾静脈注射、脾臓移植、腹膜移植、腎嚢下移植、又はオルソピン(orthopin)移植、例えば結腸組織に移植された結腸癌細胞を使用し、同系のマウスに腫瘍細胞を移入することにより作成することができる。例えば、1997年9月18日に公開されたPCT公開番号W097/33551を参照されたい。おそらくは癌遺伝子の研究に最も頻繁に使用される動物種は、免疫欠損マウス、特にヌードマウスである。胸腺刺激/形成不全を有するヌードマウスがヒト腫瘍異種移植片用の宿主として成功裡に作用するという知見はこの目的への広範な使用に導いた。常染色体劣性nu遺伝子は、例えばASW、A/He、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. Wino grad. 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、上に列挙した任意の腫瘍細胞系のような周知の腫瘍/癌細胞、例えば、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)から、又は腫瘍及び癌から誘導可能である。腫瘍又は癌細胞のサンプルは、手術を受ける患者から得ることができ、凍結及び液体窒素での保管を含む標準的状态を用いる。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、

10

20

30

40

50

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

例えば、Meth A、CMS 4、CMS 5、CMS 2 1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、 10×10^6 から 10×10^7 細胞/mlの細胞密度でバッファーに懸濁させる。ついで、動物に10から100 μ lの細胞懸濁液を皮下注射すると、1から3週間で腫瘍が出現する。

さらに、最も詳細に研究されている試験用腫瘍の一つであるマウスのルイス肺(3LL)癌腫を研究用腫瘍モデルとして使用することができる。この腫瘍モデルの効力は、肺の小細胞癌腫(SCCL)と診断されたヒト患者における好ましい効果と相関している。この腫瘍は、病気になったマウス、又は培養されている細胞からの腫瘍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、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

10

20

30

40

50

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化する変更ゲノムDNAと、PROポリペプチドをコード化する内在性遺伝子との間の相対的組換えによって、ここで同定されるPROポリペプチドをコード化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化するcDNAは、確立された技術に従い、該ポリペプチドをコード化するゲノム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化するゲノム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化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)を数千ベース含む。例えば、相対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と相対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、期間において「ノックアウト」動物をつくり出す。胚細胞に相対的に組換えられた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対的に組換えられた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血管、内皮及び血管形成試験もここで適切である。

【0074】

i i . 組織分布

さらなる研究、例えば種々のヒト組織におけるmRNA発現を測定することにより、ここで心血管、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化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】

i i i . 抗体結合性の研究

心血管、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

10

20

30

40

50

種類のサンドイッチアッセイはE L I S A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】

i v . 細胞ベースの腫瘍アッセイ

心血管、内皮及び血管形成の疾患、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、P R O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、特定の心血管、内皮及び血管形成の疾患に係る周知の細胞種の細胞を、c D N Aを用いて形質移入し、これらのc D N A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。心血管、内皮及び血管形成の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B 1 0 4 - 1 - 1細胞系(n e u原腫瘍遺伝子で形質移入された安定N I H - 3 T 3細胞系)及びr a s -形質移入N I H - 3 T 3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(A D C C)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、心血管、内皮及び血管形成の疾患、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

ここでのP R O 1 7 9、P R O 2 3 8、P R O 3 6 4、P R O 8 4 4、P R O 8 4 6、P R O 1 7 6 0、P R O 2 0 5、P R O 3 2 1、P R O 3 3 3、P R O 8 4 0、P R O 8 7 7、P R O 8 7 8、P R O 8 7 9、P R O 8 8 2、P R O 8 8 5又はP R O 8 8 7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、このようなポリペプチドのインビボ発現によって本発明に従って使用することができ、しばしば遺伝子治療と呼ばれる。

核酸(場合によってはベクター内に含まれたもの)を患者の細胞に入れるために: インビボ及びエキソビボという2つの主要な方法がある。インビボ送達では、核酸は、通常はP R O 1 7 9、P R O 2 3 8、P R O 3 6 4、P R O 8 4 4、P R O 8 4 6、P R O 1 7 6 0、P R O 2 0 5、P R O 3 2 1、P R O 3 3 3、P R O 8 4 0、P R O 8 7 7、P R O 8 7 8、P R O 8 7 9、P R O 8 8 2、P R O 8 8 5又はP R O 8 8 7ポリペプチドが必要とされている部位、すなわちP R O 1 7 9、P R O 2 3 8、P R O 3 6 4、P R O 8 4 4、P R O 8 4 6、P R O 1 7 6 0、P R O 2 0 5、P R O 3 2 1、P R O 3 3 3、P R O 8 4 0、P R O 8 7 7、P R O 8 7 8、P R O 8 7 9、P R O 8 8 2、P R O 8 8 5又はP R O 8 8 7ポリペプチドの合成部位、もし知られているならばP R O 1 7 9、P R O 2 3 8、P R O 3 6 4、P R O 8 4 4、P R O 8 4 6、P R O 1 7 6 0、P R O 2 0 5、P R O 3 2 1、P R O 3 3 3、P R O 8 4 0、P R O 8 7 7、P R O 8 7 8、P R O 8 7 9、P R O 8 8 2、P R O 8 8 5又はP R O 8 8 7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

10

20

30

40

50

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。

10

【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、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887ポリペプチドをコード化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。

20

30

40

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

50

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。

【 0 0 7 9 】

v i . 診断法としての遺伝子の用途

また本発明は、診断法としての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化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ポリペプチドの突然変異は腫瘍の原因でありうるため、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、内皮及び血管形成の疾患、あるいは心血管、内皮及び血管形成の疾患、例えば腫瘍に対する感受性の診断を可能にする。 10

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化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化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化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化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。 20

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DN 30

A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のサザンプ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化する核酸の発現は、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む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングに使用する。プライマーに対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドのみが、増幅断片を作成するであろう。

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の染色体に特定のDNAを割り当てるための急速な手順である。同様のオリゴヌクレオチドプライマーを本発明で使用すると、サブ局所限定を、類似した方法で、大きなゲノムクローンのプール又は特定の染色体からの断片のパネルで達成することができる。同様に、その染色体へのマッピングに使用可能な他のマッピング方法には、インサイ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

10

20

30

40

50

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化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。

10

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)。

20

【0082】

i x . 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。

30

40

このアッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、免疫アッセイ、及び細胞ベースのアッセイで、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

50

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、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面を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.Nat. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)に開示されているようにして、(Fields及び共同研究者等 [Fields及びSong, Nature(London) 340, 245-246 (1989); Chien等, Proc.Nat. 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。GAL1-1lacZ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、-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化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³Hチミジンで標識し、ガラス繊維フィルター上に収集する(pH D; Cambridge Technology, Wattertown, MA)。3媒体の平均³H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³H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³H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化する遺伝子は、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化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化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。

心血管、内皮及び血管形成の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

10

20

30

40

50

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

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W0 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W0 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. 治療される心血管、内皮及び血管形成の疾患の型

ここで記載された心血管、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血管、内皮及び血管形成の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、虚血再灌流傷害、アンギナ、心筋梗塞、例えば急性心筋梗塞、慢性心疾患、心不全、例えば鬱血性心不全、及び骨粗鬆症等に使用される。

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。

10

20

30

40

50

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して、循環の間欠性異常欠陥により特徴付けられるものである。変更内皮細胞機能がこれらの病気において重要であることが示されている。

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

動脈再狭窄(動脈壁再狭窄)は、内皮及び血管平滑筋細胞の増殖及び機能の変更の結果によるもので、続いて血管形成を生じる。

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

良性及び悪性血管腫瘍のファミリーは、血管系の細胞エレメントの異常な増殖及び成長により特徴付けられる。例えば、リンパ管腫は、先天的で、しばしば膀胱のリンパ系の良性腫瘍、通常新生児に生じるリンパの奇形である。膀胱腫瘍は隣接した組織内で成長する傾向にある。膀胱腫瘍は、通常、子宮頸部及び腋窩領域に生じる。また、それらは四肢の軟組織でも生じる。主たる徴候は膨張であり、時折、網状に構造化されたリンパ及びリンパ球(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ュを害している。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、靭帯、及び/又は神経組

10

20

30

40

50

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、脾臓、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、線維性癒痕化を阻害又は調節して、正常な組織を再生することである。

【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(コラゲナーゼ活性、破骨細胞等)のプロセス又は炎症をブロックすることによる治療に有用である。

ここで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/靭帯形成である。組織が通常形成されない環境での腱/靭帯様組織又は他の組織形成を誘発するタンパク質は、ヒト及び他の動物の腱又は靭帯の裂け目、奇形、及びの腱又は靭帯の欠損の治療に適用される。このような調製物は、腱又は靭帯組織へのダメージの予防、並びに腱又は靭帯の骨又は他の組織への固定の改善、及び腱又は靭帯組織の欠損の修復において予防的に使用される。ここでの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/靭帯様組織形成は、先天的、外傷誘発性、又は他の由来による腱又は靭帯の欠損の修復に寄与し、また腱又は靭帯の取り付け又は修復のための美容形成外科においても有用である。ここでの組成物は、腱-又は靭帯-形成細胞を誘引、腱-又は靭帯-形成細胞の成長を刺激、腱-又は靭帯-形成細胞原種の分化を誘発、又はイクスピボでの回復インピボでの組織修復効果における腱/靭帯細胞又は原種の成長を誘発する環境で提供される。また、ここでの組成物は、腱炎、手根管症候群、及び他の腱又は靭帯欠損にも有用である。さらに組成物は、当該技術でよく知られている担体と同じ適切なマトリクス及び/又は金属イオン封鎖剤を含む。

【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

10

20

30

40

50

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、P R Oポリペプチド又はそれに対するアンタゴニストを使用しての治療が可能である。

虚血-再灌流傷害は他の徴候である。内皮細胞機能不全は虚血-再灌流傷害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、P R O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肥大(成人においては最大壁厚が35 mm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P R O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、子癩前症、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ことと示されている、ここで記載されたP R O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】

x i . 投与プロトコル、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。

P R Oポリペプチド又はアゴニスト又はアンタゴニストの治療用組成物は、適当な純度を持つ所望の分子を任意の製薬的に許容される担体、賦形剤、又は安定化剤(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A.編, (1980))と、凍結乾燥した製剤又は水溶液の形態で混合することにより調製することができる。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、好ましくは用いられる投与量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などのバッファー; アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤; 防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド; ヘキサメトニウムクロライド; ベンザルコニウムクロライド; ベンゼトニウムクロライド; フェノール、ブチル又はベンジルアルコール; メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン; カテコール; レゾルシノール; シクロヘキサノール; 3-ペンタノール; 及びm-クレゾール); 低分子量(約10残基未満)ポリペプチド; 血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質; ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー; グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸; グルコース、マンノース、又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物; E D T A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、Z n-タンパク質錯体); 及び/又はT W E E N^{T M}、P L U R O N I C S^{T M}又はポリエチレングリコール(P E G)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

10

20

30

40

50

ウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイダルシリカ、マグネシウムトリシリケート、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質、及びプロピレングリコールである。局所用の担体又はゲルベースの形態は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース又はメチルセルロース等の多糖類、ポリビニルピロリドン、ポリアクリレート、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロックコポリマー、ポリエチレングリコール、及びモクロウアルコールを含む。あらゆる投与について、従来のデポー形態が好適に用いられる。このような形態は、例えば、マイクロカプセル、ナノ-カプセル、リポソーム、硬膏剤、吸入形態、鼻スプレー、舌下錠剤、及び除放性製剤を含む。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。

10

【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、

20

- 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、攪拌誘発性集合体に対しポリペプチド又は分子を安定化させる洗浄剤/界面活性剤；
 - d) 等張剤；
 - e) フェノール、ベンジルアルコール及びベンゼトニウムハロゲン化物、例えば塩化物の群から選択される防腐剤；及び
 - f) 水；
- を含有し得る。

30

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^{T M} (TWEEN^{T M}) 20、80等)、ポロキサマー(例えば、POLOXAMER^{T M} 188等)であってよい。非イオン性界面活性剤を使用することにより、タンパク質の変性を引き起こすことなく、表面応力の剪断に調製物をさらすことができる。さらに、このような界面活性剤含有調製物は、エアゾール装置、例えば静脈投与、及びニードレスジェット注入ガンに使用されるものにおいて、使用され得る(例えば、EP257,956を参照されたい)。

等張剤は、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。

40

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。

50

【 0 0 9 4 】

治療用 P R O 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、P R O 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^{T M} (乳酸 - グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能な微小球)、及びポリ - D - (-) - 3 - ヒドロキシブチル酸 (EP 133,988) を含む。

エチレン - 酢酸ビニルや乳酸 - グリコール酸等の重合体は 1 0 0 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、3 7 で水分に曝されることで、変性又は凝集し、生理活性の喪失や免疫原性の変化のおそれがある。かかる機構によって安定性を得るための合理的な処置が考えられる。例えば、凝集機構がチオ - ジスルフィド交換による分子間 S - S 結合であることが分かれば、スルフヒドリル残基を変更し、酸性溶液から凍結乾燥し、水分量を調整し、適当な添加物を使用し、特定の重合体マトリクス化合物を開発することで安定性を保証することができる。

P R O 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 P R O ポリペプチドを含む。P R O 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 3 0 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 2 0 0 - 8 0 0 オングストローム) な単ラメラ状のものである。

【 0 0 9 5 】

P R O ポリペプチド又はそのアンタゴニストの治療的有効量は、当然のことながら、治療 (予防を含む) すべき病理学的状態、投与方法、治療に用いられる化合物の型、包含される任意の同時治療、患者の年齢、体重、一般的な医学的状态、医学的履歴などの要因によって変化し、それは担当する医師の技量の範囲内で良好に決定される。従って、治療者は、最大の治療効果が得られるように、投与量を滴定し投与経路を修正する必要がある。P R O 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 P R O ポリペプチド、より好ましくは天然配列ヒト P R O 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、P R O ポリペプチドを投与するであろう。例えば、目的が C H F の治療である場合、この病状に関連した進行性心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 P R O 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 . 0 0 1 から約 1 . 0 m g / k g、好ましくは約 0 . 0 1 - 1 . 0 m g / k g、最も好ましくは約 0 . 0 1 - 0 . 1 m g / k g の範囲内である。

成人の高血圧の治療における非経口用途では、注射の形態で、体重 1 k g 当たり約 0 .

10

20

30

40

50

0.1 から 50 mg、好ましくは約 0.05 から 20 mg、最も好ましくは 1 から 20 mg の 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 1 kg 当たり約 5 mg から 1 g、好ましくは約 10 から 100 mg、1 日に 1 から 3 回投与する。内毒素汚染物質、安全レベルの最小量、例えば 0.5 ng / mg タンパク質未満に保持すべきである。さらにヒト投与では、調製物は好ましくは滅菌され、発熱性であり、一般的に安全で、FDA Office and biologics standards で要求されるようにして精製される。

組織再生に使用される 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的に許容される塩類の例には、アルカリ金属塩(例えばナトリウム塩、カリウム塩)、アルカリ土類金属塩(例えばカルシウム塩、マグネシウム塩)、アンモニウム塩、有機塩基塩(例えばピリジン塩、トリエチルアミン塩)、無機酸塩(例えば塩酸、硫酸塩、硝酸塩)及び有機酸塩(例えば酢酸塩、シュウ酸塩、p-トルエンスルホン酸塩)が含まれる。

ここで記載され、骨、軟骨、腱、又は靭帯再生に有用な組成物における治療方法には、移植又は装置としての、局所的 (topically)、全身的又は局部的 (locally) な組成物の投与が含まれる。投与した場合、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

10

20

30

40

50

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】

x i i . 組合せ治療

当問題となる疾患の防止又は治療における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^{T M}及びMOXONODIN^{T M}；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-アスパラタート-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肥大の治療のためには、PROポリペプチドを、 α -アドレナリン様レセプターブロック剤、例えばプロプラノロール、チモロール、タータロロール、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロール、又はカーベジルロール；ACEインヒビター、例えばクイナピリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル又はリシノプリル；ジウレティクス、例えばクロロチアザイド、ヒドロクロロチアザイド、ヒドロフルメタザイド、メチルクロロチアザイド、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】

心肥大の治療における組合せ治療用の好ましい候補薬は、 α -アドレナリン様レセプターブロック剤(プロプラノロール、チモロール、タータロロール、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロール、又はカーベジルロール)、ベラパミル、ジフェジピン、又はジルチアゼムである。高血圧を伴う肥大の治療には、カルシウムチャンネルブロッカー、例えばジルチアゼム

10

20

30

40

50

、ニフェジピン、ベラパミル及びニカルジピン； α -アドレナリン様レセプターブロッカー；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、例えばクイナプリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル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- β 又はTGF- α 、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障害剤、化学療法剤又は成長阻害剤と組合せられる。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】

x i i i . 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、製薬的に許容されるバッファー、例えばリン酸緩衝塩水、リンガー液、及びデキストロース溶液を収容した第2の容器をさらに具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用説明書を備えた包装挿入物を含む、商業的及び使用者の立場から望ましい他の材料を具備してもよい。また、この製造品は、上述の他の活性剤を収容した第2又は第3の容器を具備してもよい。

【0101】

E . 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

10

20

30

40

50

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、PRO32

1、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培地が含まれる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として成長させることもできる。

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来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化する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化する遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に配することができる。これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髓腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより(米国特許第4,816,567号; Morrison等, 上掲)、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られている。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'、(Fab')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

10

20

30

40

50

、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. Opin. 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W0 93/08829、及びTraunecker等、EMBO J., 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロ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、C H 2 及び C H 3 領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C H 1)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコード化する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。

10

【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(W0 91/00360; W0 92/200373; EP 03089)提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されているものが含まれる。

20

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。

30

【0107】

vii. 免疫抱合体

本発明はまた、化学療法剤、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)などの細胞障害剤、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療法剤は上記した。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、アプリン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(mordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)を含む。様々な放射性ヌクレオチドが放射性抱合抗体の生成に利用可能である。例として、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹I

40

50

n、⁹⁰Y及び¹⁸⁶Reを含む。

抗体及び細胞障害剤の抱合体は、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(SPD P)、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H C 1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。

10

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、次に細胞障害剤(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。

v i i i . 免疫リポソーム

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

20

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、所定サイズの孔のフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体のFab'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。化学療法剤(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。

30

【0108】

i x . 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。

40

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

50

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、細胞障害剤、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、リボソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science, 上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ればならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。 10

持続放出製剤を調製してもよい。持続放出製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。持続放出性マトリクスの例は、ポリエステルヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸及び-D-エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商品名)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リ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°C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。 20

【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。 30

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

他の治療的養生法を例えば本発明の抗体の投与と組み合わせてもよい。例えば、抗体で癌の治療をする場合は、このような抗体で治療される患者は放射線治療を受けてもよい。あるいは、又はそれに加えて、患者に化学療法剤を投与してもよい。このような化学療法剤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。化学療法剤は、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EVISTTM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。 40

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 50

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

10

【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-V E G F)は、例えば腫瘍又は転移病巣の壊死がみられるように決定された治療的有効量で、腫瘍を有する患者に投与される。この治療は、好ましい効果が観察されるか、又は腫瘍又は任意の転移病巣の痕跡がなくなるまで続けられる。ついで、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(hegulin)、抗ヘレグリン抗体、D-因子、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、又は腫瘍中の微細血管凝固促進剤、例えば抗-プロテインC抗体、抗-プロテインS抗体、又はC4b結合プロテイン(1991年2月21日公開のW091/01753)。

20

補助剤はその有効性に依りて変わり、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。

30

心血管、内皮及び血管形成の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依りて、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $50 \text{mg}/\text{kg}$ (例えば、 $0.1 - 20 \text{mg}/\text{kg}$)の抗体が、例えば、1又はそれ以上の別々の投与あるいは連続注入のいずれにしても、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な1日の用量は、上記の要因に依りて、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $100 \text{mg}/\text{kg}$ 又はそれ以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に依りて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。この治療の進行は、従来技術及びアッセイ、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。

40

【0111】

x i . 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。

50

x i i . 抗体を使用する腫瘍の診断及び予知

抗体が使用される徴候が癌である場合、或る種の腫瘍で過剰発現される成長レセプター等の細胞表面タンパク質は候補薬剤又は腫瘍（例えば、癌）治療の優れた標的であるが、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化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。

【実施例1】

【0113】

新規なポリペプチド及びそれをコード化する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、EST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

10

20

30

40

50

を用いて伸長し、コンセンサス配列を上で議論した E S T 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、P C Rにより対象とする配列を含む c D N Aライブラリを同定するため、及び P R O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 P C R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 P C R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 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 D N Aを、Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biology, 上掲のように、P C Rプライマー対での P C R増幅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化するクローンの単離するのに使用した。

c D N Aクローンの単離に用いた c D N A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。c D N Aは、N o t I部位を含むオリゴ d Tでプライムし、平滑末端で S a l Iヘミキナーゼアダプターに結合させ、N o t I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 (p R K 5 B又は p R K 5 D等 ; p R K 5 Bは S f i I部位を含まない p R K 5 Dの前駆体である ; Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991)参照) に、独特の X h o I及び N o t I部位において、所定の方向でクローニングした。

【実施例 2】

【0114】

アミラーゼスクリーニングによる c D N Aクローンの単離

1. オリゴ d Tプライム c D N Aライブラリの調製

m R N A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ルを用いて単離した (Fast Track 2)。この R N Aを、Life Technologies, Gaithersburg, MD (Super Script Plasmid System)からの試薬及びプロトコルを用いるベクター p R K 5 Dにおけるオリゴ d Tプライムした c D N Aの生成に使用した。この方法において、二本鎖 c D N Aは 1000bpを越えるサイズで分類され、S a l I / N o t I結合 c D N Aを X h o I / N o t I切断ベクターにクローニングした。p R K 5 Dを、s p 6転写開始部位、それに続く S f i I制限酵素部位、さらに X h o I / N o t I c D N A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 c D N Aライブラリの調製

一次 c D N Aクローンの 5'末端を好ましく表すために二次 c D N Aライブラリを作成した。S p 6 R N Aを (上記の) 一次ライブラリから生成し、この R N Aを、ベクター p S S T - A M Y . 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ルを用いたランダムプライムした c D N Aライブラリの生成に使用した。この方法において、二本鎖 c D N Aを 500 - 1000bpにサイズ分類し、平滑末端で N o t Iアダプターに結合させ、S f i I部位で切断し、そして S f i I / N o t I切断ベクターにクローニングした。p S S T - A M Y . 0は、c D N A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ーを有し、さらに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) に続く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 c D N A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 D N Aを氷上で冷却し、それにエレクトロコンピテント D H 10 B細菌 (Life Technologies, 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 Technologies、1 ml) を添加し、この混合物を37°C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の標準150 mm LBプレートに蒔き、16時間インキュベートした(37°C)。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を実施した。

酵母法は3つのカテゴリーに分けられる：(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(100 ml)に播種し、30°C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(500 ml)中におよそ 2×10^6 細胞/ml(約OD₆₀₀ = 0.1)に希釈し、 1×10^7 細胞/ml(約OD₆₀₀ = 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50 ml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Li₂OOCCH₃)で続けて洗浄し、LiAc/TE(2.5ml)中に再懸濁させた。

マイクロチューブ内で、調製した細胞(100 µl)を新鮮な変性一本鎖サケ精子DNA(Lofstrand Labs, Gaithersburg, MD)及び形質転換DNA(1 µg. vol. < 10 µl)と混合することにより、形質転換を行った。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(600 µl, 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Li₂OOCCH₃, pH 7.5)を添加した。この混合物を緩やかに攪拌し、30°Cで攪拌しながら30分間インキュベートした。次いで細胞に42°Cで15分間熱衝撃を与え、反応容器をマイクロチューブ内で12,000rpmで5-10秒間遠心分離し、デカント及びTE(500 µl, 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(200 µl)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、複数の小さな反応ではなく、1回の大規模反応で形質転換を実施し、このとき試薬の量は適宜スケールアップさせた。

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して調製したウラシルを欠く合成完全デキストロス寒天(SCD-Ura)であった。形質転換体は30°Cで2-3日成長させた。

10

20

30

40

50

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 S C D - U r a 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 pH 7 . 0 に緩衝した(最終濃度50-100mM)。

ポジティブコロニーを選び、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 S C D - U r a 寒天への赤色団分の直接導入により検出した。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はっきりとした量(halo)を生じる能力により、ポジティブコロニーを決定した。

10

【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(30 μ l)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(5 μ l)を、0.5 μ lのKlentaq(Clontech, Palo Alto, CA); 4.0 μ lの10mM dNTP(Perkin Elmer-Cetus); 2.5 μ lのKentaqバッファー(Clontech); 0.25 μ lの正方向オリゴ1; 0.25 μ lの逆方向オリゴ2; 12.5 μ lの蒸留水を含有する25 μ l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'-TGTA AACGACGGCCAGTTAAATAGACCTGCAATTATTAATCT-3'

20

(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 | | |

30

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。

40

PCRに続いて、一定分量にした反応物(5 μ l)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。

【実施例3】

【0118】

シグナルアルゴリズム分析を用いたcDNAクローンの単離

50

種々のポリペプチド-コード化核酸配列は、ジェネンテック社 (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。

10

【実施例 4】

【0119】

ヒト PRO179 をコード化する 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同一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。

20

配列同一性に基づいて、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 2800 bp 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図 1 (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 (図 1)。予測されるポリペプチド前駆体は 460 アミノ酸長であり (図 2、配列番号: 2)、図 2 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。

30

図 2 (配列番号: 2) に示した全長 PRO179 配列の分析により、図 2 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 (図 2、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 115 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及び鎖 C 末端ドメインである。

40

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

50

タンパク質と有意な類似性を有し、よって P R O 1 7 9 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(バージョン35.45 Swiss Prot 35)の分析により、P R O 1 7 9 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: AF004326_1, P_R94605, HSU83508_1, P_R94603, P_R94317, AF025818_1, HSY16132_1, P_R65760, I37391及びHUMRSC192_1。

【実施例5】

【0120】

ヒト P R O 2 3 8 をコード化する c D N A クロンの単離

上記実施例1に記載したように、phrapを用いて他の E S T に対してコンセンサス D N A 配列を組み立てた。このコンセンサス配列を、ここで D N A 3 0 9 0 8 と命名する。D N A 3 0 9 0 8 コンセンサス配列に基づいて、1) P C R により対象とする配列を含む c D N A ライブラリを同定するため、及び2) P R O 2 3 8 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 D N A 3 0 9 0 8 配列から作成された。

10

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 D N A を上掲の Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology に従って、P C R プライマー対での P C R 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 P R O 2 3 8 遺伝子をコード化するクローンの単離に使用した。

20

P C R プライマー(正及び逆)を合成した:

正方向 P C R プライマー 1:

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

正方向 P C R プライマー 2:

5'-CAGGGCAAGA TGAGCATTCC-3'(配列番号: 36)

逆方向 P C R 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)

c D N A ライブラリの作成のための R N A はヒト胎児肝臓組織から単離した。c D N A クローンを単離するために用いた c D N A 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。c D N A は、N o t I 部位を含むオリゴ d T でプライムし、S a l I ヘミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、N o t I 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(p R K B 又は p R K D 等; p R K 5 B は、S f i I 部位を持たない p R K 5 D 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 X h o I 及び N o t I 部位においてクローン化した。

30

上述のようにして単離されたクローンの D N A 配列決定により、全長 P R O 2 3 8 に対する全長 D N A 配列[ここで D N A 3 5 6 0 0 - 1 1 6 2 と命名](図3、配列番号: 3)及びその P R O 2 3 8 に対する誘導タンパク質配列が得られた。

40

D N A 3 5 6 0 0 - 1 1 6 2 の全ヌクレオチド配列を図3(配列番号: 3)に示す。クローン D N A 3 5 6 0 0 - 1 1 6 2 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 1 3 4 - 1 3 6 に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置 1 0 6 4 - 1 0 6 6 の見かけの停止コドンを持つ(図3)。予測されるポリペプチド前駆体は 3 1 0 アミノ酸長であり(図4、配列番号: 4)、約 3 3 , 5 2 4 ダルトンの算定分子量及び約 9 . 5 5 の見積もり p I を持つ。

図4(配列番号: 4)に示した全長 P R O 2 3 8 配列の分析により、図4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 P R O 2 3 8 ポリペプチドの分析により(図4、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

50

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 248、及び約アミノ酸 291 から約アミノ酸 297 の N-ミリスチル化部位；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 DNA 35600-1162 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。

10

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ということが示された。

【実施例 6】

【0121】

ヒト PRO364 をコード化する 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。

20

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 DNA 44825 と呼ぶ。

DNA 44825 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 - 1000 bp 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 - 55 bp 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化するクローンの単離に使用した。

30

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'-GGCACAGCACGGGGCGATGGGCGGTTT-3' (配列番号 : 41)

逆方向 PCR プライマー (44825.r1) :

5'-CTGGTCACTGCCACCTTCTGCAC-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、DNA 44825 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

50

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'-AGCCTGGGTGAGCGCCCCACCGGGGGTCCCGGGTGC GGCC-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遺伝子をコード化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XhoI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図5(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(図5；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タンパク質を図6(配列番号：6)に示す。

【0122】

図6(配列番号：6)に示した全長PRO364配列の分析により、図6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(図6；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-ミリスチル化部位；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化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。

【実施例7】

【0123】

ヒトPRO844をコード化する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-LUNGUT09)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図7(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(図7;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タンパク質を図8(配列番号:8)に示す。

図8(配列番号:8)に示した全長PRO844配列の分析により、図8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(図8;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-ミリスチル化部位;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(バージョン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。

【実施例8】

【0124】

ヒトPRO846をコード化する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、P

C Rプライマー対でのP C R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P C Rプライマー対の一方を用いたP R O 8 4 6遺伝子をコード化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P C Rプライマー(39949.fl)：

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

逆方向P C R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D N A 3 9 9 4 9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)

c D N Aライブラリの構築のためのR N Aはヒト胎児腎臓組織(LIB227)から単離した。c D N Aクローンを単離するために用いたc D N A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。c D N Aは、N o t I部位でプライムし、S a l Iヘミキナーゼ化アダプターの平滑末端で結合させ、N o t I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(p R K B又はp R K D等；p R K 5 Bは、S f i I部位を持たないp R K 5 Dの前駆体である；Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991))に独特のX h o l及びN o t I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D N A配列決定により、P R O 8 4 6ポリペプチドの全長D N A配列[ここで、D N A 4 4 1 9 6 - 1 3 5 3と命名される](図9、配列番号：9)及びP R O 8 4 6ポリペプチドの誘導タンパク質配列が得られた。

D N A 4 4 1 9 6 - 1 3 5 3の完全長ヌクレオチド配列は図9(配列番号：9)に示される。クローンD N A 4 4 1 9 6 - 1 3 5 3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(図9)。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p Iを有する(図10、配列番号：10)。

図10(配列番号：10)に示された全長P R O 8 4 6配列の分析により、図10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P R O 8 4 6配列(図10；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のフィブロゲン及び鎖C-末端ドメイン；約アミノ酸13から約アミノ酸128のI g様V型ドメインである。クローンD N A 4 4 1 9 6 - 1 3 5 3は1998年5月6日にA T C Cに寄託され、A T C C寄託番号209847が付与された。

【実施例9】

【0125】

ヒトP R O 1 7 6 0をコード化するc D N A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E S Tクラスター配列を同定した。次いでこのE S T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E S T D N Aデータベース(LIFSEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(E S T)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E S T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

10

20

30

40

50

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DNA 58798と命名する。

DNA 58798配列とIncycyte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挿入物の配列を図11(配列番号:11)に示し、ここでDNA 76532-1702と命名する。

クローンDNA 76532-1702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(図11)。予測されるポリペプチド前駆体は188アミノ酸長である(図12、配列番号:12)。図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。

図12(配列番号:12)に示される全長PRO1760配列の分析により、図12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20のシグナルペプチド;約アミノ121から約アミノ125及び約アミノ171から約アミノ175のN-グリコシル化部位;約アミノ54から約アミノ60及び約アミノ160から約アミノ166のN-ミリスチル化部位である。クローンDNA 76532-1702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。

図12(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, SAPU_RCLUS_2及びAF041468_9との間の配列同一性が明らかにされた。

【実施例10】

【0126】

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(7.5×10^4 /mlで180 μ l、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(20 μ L/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(20 μ L/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、サイズの小さな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4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4

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

10

【実施例 1 1】

【0 1 2 7】

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つ、例えば腫瘍成長の抑制に有益な効果を与える。 20

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ATING 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/ml VEGF; (4) ACE 細胞 + 3ng/ml VEGF; (5) ACE 細胞 + 3ng/ml VEGF + 1ng/ml TGF-β; 及び (6) ACE 細胞 + 3ng/ml VEGF + 5ng/ml IL1β。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 °C / 5% CO₂ 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, pH 5.5, 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 °C 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。 30

PRO ポリペプチドの活性は、刺激なしの細胞に対する、(OD_{405nm}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-β は、VEGF-刺激 ACE 細胞増殖の 70-90% をブロックするため、TGF-β を 1ng/ml において活性対照として用いた。以下の表 5 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 5 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。 40

表5

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	10
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	20
PRO885	0.01%	100.0	
PRO885	0.10%	93.0	
PRO885	1.00%	64.0	

【実施例12】

【0128】

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、例えば創傷治癒などを含む、血管新生が有益であるような症状や疾患の治療上の処置に有効であると期待される(同様に、これらのPROポリペプチドのアゴニストもそうでありうる)。このアッセイで陽性と試験されたPROポリペプチドのアンタゴニスト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:NaHCO₃、1%グルタミン、10mMのHEPES、10%のFBS、10ng/mlのbFGF)中のヒト静脈の臍帯静脈内皮細胞(HUVEC, Cell Systems)を1x10⁴細胞/ウェルの細胞密度で96ウェルマイクロタイタープレートに蒔いた。蒔いた次の日、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%CO₂中で37°Cにおいて30分間インキュベートした。試料を取り出し、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。細胞を有する試験プレートをインキュベータから取り出し、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プローブを含

有する100 μ lの溶菌ハイブリッド形成バッファーをピペットで素早く添加した。ついで、プレートに15分間55 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。インキュベーターから取り出した時点で、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分間、#2の設定でボルテックスした。80 μ lの溶菌液を取り出し、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53 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。

【0129】

次の日に、bDNAキットプロトコルの第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出し、ベンチに置いて10分間冷却した。必要な添加の容積は製造者により提供される情報に基づいて計算した。ALハイブリッド形成バッファー中に1:100の希釈のアンプリファイア濃縮物 (Amplifier Concentrate) (20fm/ μ l) を作成することによりアンプリファイア作用液を調製した。ハイブリダイゼーション混合物をプレートから採取し、洗浄剤Aで2回洗浄した。50 μ lのアンプリファイア作用液をそれぞれのウェルに加え、該ウェルを53 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。ついで、プレートをインキュベーターから取り出して10分間冷却した。ALハイブリッド形成バッファー中に1:100希釈の標識濃縮物 (40pmoles/ μ l) とすることにより標識プローブ作用液を調製した。10分の冷却時間の後、アンプリファイアハイブリッド形成混合物を取り出し、プレートを洗浄剤Aで2回洗浄した。50 μ lの標識プローブ作用液を各ウェルに添加し、ウェルを53 $^{\circ}$ C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mlの基質それぞれに3 μ l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出し、プレートを洗浄剤Aで2回、洗浄剤Dで3回洗浄した。エンハンサーを含有する50 μ lの基質溶液を各ウェルに添加した。プレートを37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートし、RLUを適切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) 値に対する活性の増加倍率の測定は化学発光単位 (RLU) によって示した。結果を下記の表6に示し、PROポリペプチドがネガティブコントロールに対して少なくとも2倍の値を示す場合に陽性と考えた。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6
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

10

20

【実施例13】

【0131】

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(7.5x10⁴/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10⁻⁶M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さな増加を示す細胞を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。

40

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は実行しなかった。

50

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。

【実施例14】

【0132】

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、心肥大に関与する心疾患の治療上の処置での用途が見出される。

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/180 μ lウェル容積でプレATINGした。2日目にPROポリペプチドを含む試験試料（20 μ l）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。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、100 μ g/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、NaHCO₃、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。

10

20

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。

【実施例15】

【0133】

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試験は、血管疾患のような腫瘍の治療上の処置での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。）

30

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、RPNQ160、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 2×10^4 細胞の密度で全容量100 μ lでプレATINGした。試験するPROポリペプチド試料を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50 μ lを用いた。試験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を用いて測定され、アポトーシスを検出した。

40

0.2mlのアネキシンV-ビオチンのストック溶液（100 μ g/ml）を、4.6mlの $2 \times \text{Ca}^{2+}$ 結合バッファー及び2.5%BSA中に希釈した（1:25希釈）。50 μ lの希釈アネキシンV-ビオチン液を、1.0 μ g/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³⁵S-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

50

間インキュベートした。³⁵S-ストレプトアビジンは $2 \times \text{Ca}^{2+}$ 結合バッファー、2.5%BSA中に希釈し、最終濃度が 3×10^4 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7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7

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%

10

20

【実施例16】

【0134】

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であろう。

1日齢のHarlan Sprague Dawleyラットからの筋細胞(7.5×10^4 /mlで180 μ l、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20 μ l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。

30

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。

【実施例17】

【0135】

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ポリペプチドが外因性成長因子のない状態で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/又は接合形成の刺激が有益であることを含む内皮空胞及び/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。

40

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 6×10^5 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1 μ Mの6-FAM-FITC染料を補填したM199培地をウェル当たり50 μ lで蒔いた。細胞を37 $^{\circ}$ C/5%CO₂で48時間インキュベートし、室温で10分間3.7%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、4 μ MのDAPIで核染

50

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。

【実施例18】

【0136】

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。このアッセイでの陽性の結果は、例えば腫瘍成長の抑制を含む望ましくない内皮細胞成長に関連する任意の様々な症状を治療的に処置するためのPROポリペプチドの有用性を示す。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ウェルプレートのコーティングは、PBS溶液中の0.2%ゼラチン100 μ l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 2×10^4 細胞/mlの最終濃度 - ウェル当たり100 μ l容量でHUVEC細胞を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。

10

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100 μ l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50 μ l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。

20

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(200g); 高速回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、200 μ l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、20 μ l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。80 μ lの免疫試薬混合物を各ウェルで20 μ l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250 μ l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(100 μ l)、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。

30

PRO846及びPRO844ポリペプチドは、このアッセイにおいて陽性と試験された。

40

【実施例19】

【0137】

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³³P-標識リボプローブを用いて

50

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^{T M}核トラックエマルジョンに浸漬して4週間露出する。

^{33}P -リボプローブ合成

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

2.0 μl の5x転写バッファー

1.0 μl のDTT (100mM)

2.0 μl のNTP混合物 (2.5mM: 各10 μl の10mM GTP, CTP及びATP+10 μl のH₂O)

1.0 μl のUTP (50 μM)

1.0 μl のRNA sin

1.0 μl のDNAテンプレート (1 μg)

1.0 μl のH₂O

1.0 μl 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、1.0 μl のRQ1 DNaseを添加し、次いで37℃で15分間インキュベートした。総計90 μl のTE (10mMトリスpH7.6 / 1mMのEDTA pH8.0) を添加し、混合物をDE81紙にピペットした。残りの溶液をMicrocon-50^{T M}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、総計100 μl のTEを添加し、次いで1 μl の最終生成物をDE81紙にピペットし6mlのBIOFLUOR II (商品名) で数えた。

プローブをTBE / 尿素ゲル上で走らせた。1-3 μl のプローブ又は5 μl のRNA Marker IIIを3 μl 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。ゲルをプラスチックラップ (SARAN (商品名) ブランド) 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】

^{33}P -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10分間固定し、0.5xSSCで5分間室温で洗浄した (25ml 20xSSC + 975ml SQ H₂O)。0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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12.5 μl)、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 H₂O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20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプロテイナーゼK (250mlのRNase無しRNaseバッファー中10mg/mlを500 μl ; 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100 μl ; 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50 μl のハイブリッド形成バッファー (3.75gデキストラン硫酸 + 6ml SQ H₂O) 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20xSS

10

20

30

40

50

C及び9mlのS Q H₂O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 1.0×10^6 cpmのプロープ及び $1.0 \mu\text{l}$ 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 $48 \mu\text{l}$ 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、 $50 \mu\text{l}$ の³³P混合物をスライド上のプレハイブリッド $50 \mu\text{l}$ 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、 $V_f = 4\text{L}$)、次いでRNaseA処理を37で30分間行った(250ml RNaseAバッファー中10mg/mlを $500 \mu\text{l} = 20 \mu\text{g/ml}$)。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、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、EDTA(20mlの20xSSC+16mlのEDTA、 $V_f = 4\text{L}$)。 10

【0139】

F. オリゴヌクレオチド

ここに開示したDNA配列の3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) DNA 47365-1206 (PRO364) (TNF受容体相同体)

p1:

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCAACCCGAGCATGGCACAGCAC-3' (配列番号: 50) 20

p2:

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

(2) DNA 30868 (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) DNA 41374 (PRO333) (CD33相同体)

p1:

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCTCCACAGAACCTCGCCATCA-3' (配列番号: 54) 30

p2:

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

【0140】

G. 結果

ここに開示した上記の3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) DNA 47365-1206 (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。 40

(2) DNA 30868 (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、大血管、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) DNA 41374 (PRO333) (CD33相同体) 50

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。

10

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。

20

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ンプ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 (1 0 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)。

30

【実施例 20】

【0142】

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、PRO885又はPRO887をコード化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。

40

(それぞれ図 1, 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 に示されるような) 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

50

りの同種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化するもの等)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、5xSSC、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℃で実施される。

10

全長天然配列をコード化するDNAと所望の配列同一性を持つDNAは、次いで当分野で既知の標準的技術を用いて同定できる。

【実施例21】

【0143】

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をコード化する核酸の発現

20

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の調製を示す。

初めに、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)をコード化するDNA配列を、選択したPCRプライマーを用いて増幅した。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増幅した配列を、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遺伝子をコード化する配列を含む。

30

40

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大腸菌株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一晚増殖させる。オーバーナイト培地は、続いて大規模培地の播種に用いてもよい。次に細胞を所望の光学密度まで増殖させ、その間に発現プロモーターが作動する。

更に数時間の細胞培養の後、細胞を遠心分離によって回収することができる。遠心分離

50

で得られた細胞ペレットは当分野で周知の種々の試薬を用いて可溶化され、ついで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において可溶化PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887ポリペプチドを精製することができる。

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成功裏に発現された。

【実施例22】

【0144】

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をコード化する核酸の発現

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、PRO882、PRO885又はPRO887DNAを、選択制限酵素で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コード化するDNAを挿入させる。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コード化DNA)と呼ばれる。

一実施態様では、選択された宿主細胞は293細胞である。ヒト293細胞(ATCC CCL1573)は、組織培養プレートにおいて子ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び/又は抗生物質を添加したDMEMなどの培地でコンフルエンスまで増殖させた。約10 μ gのpRK5-(PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887コード化DNA)をVARNADNA遺伝子をコード化する約1 μ gのDNA[Thimmappaya等, Cell, 31:543 (1982)]と混合し、500 μ l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、500 μ lの50mMのHEPES(pH7.35)、280mMのNaCl、1.5mMのNaPO₄を添加し、25 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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200 μ Ci/mlの³⁵S-システイン及び200 μ Ci/mlの³⁵S-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、PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、P

10

20

30

40

50

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】

これに代わる技術では、PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887をコード化する遺伝子を、Somparyrac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、700 μ gのpRK5-(PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887コード化DNA)を添加する。細胞を、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄した。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、組織培地で洗浄し、組織培地、5 μ g/mlウシインシュリン及び0.1 μ g/mlウシトランスフェリンを含有する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ポリペプチドをコード化する発現遺伝子を含む試料を濃縮し、透析及び/又はカラムクロマトグラフィー等の任意の選択方法によって精製した。

他の実施態様では、PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887をコード化する遺伝子を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コード化DNA)核酸は、CaPO₄又はDEAE-デキストランなどの公知の試薬を用いてCHO細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートすることができ、培地を培養培地(単独)又は³⁵S-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換した。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、次いで条件培地を回収する。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

10

20

30

40

50

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をコード化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等の選択マーカを含むSV40誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、CHO細胞をSV40誘導ベクターで(上記のように)形質移入することができる。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。次いでポリ-Hisタグ-[PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887]をコード化する発現遺伝子を含む培地を濃縮し、Ni²⁺-キレートアフィニティクロマトグラフィー等の任意の選択方法により精製できる。

10

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細胞中で発現された。

【実施例23】

【0147】

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

20

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、PRO882、PRO885又はPRO887をコード化する遺伝子の組換え発現を記載する。

まず、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構築する。PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887をコード化するDNA及びプロモーターを、選択したプラスミドの適切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をコード化する遺伝子の細胞内発現させる。分泌のために、PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887をコード化するDNAを、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動物シグナルペプチドをコード化するDNA、又は、例えば酵母菌アルファ因子又はインベルターゼ分泌シグナル/リーダー配列、及び(必要ならば)PRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887コード化

30

40

50

遺伝子の発現のためのリンカー配列とともに、選択プラスミド中にクローニングすることができる。

次いで、酵母菌株 A B 1 1 0 等の酵母菌を上記の発現プラスミドで形質転換し、選択発酵培地中で培養されうる。形質転換した酵母菌上清を、10%トリクロロ酢酸での沈降及び SDS - PAGE による分離で分析し、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 PRO 1 7 9、PRO 2 3 8、PRO 3 6 4、PRO 8 4 4、PRO 8 4 6、PRO 1 7 6 0、PRO 2 0 5、PRO 3 2 1、PRO 3 3 3、PRO 8 4 0、PRO 8 7 7、PRO 8 7 8、PRO 8 7 9、PRO 8 8 2、PRO 8 8 5 又は PRO 8 8 7 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。PRO 1 7 9、PRO 2 3 8、PRO 3 6 4、PRO 8 4 4、PRO 8 4 6、PRO 1 7 6 0、PRO 2 0 5、PRO 3 2 1、PRO 3 3 3、PRO 8 4 0、PRO 8 7 7、PRO 8 7 8、PRO 8 7 9、PRO 8 8 2、PRO 8 8 5 又は PRO 8 8 7 を含む濃縮物は、選択カラムクロマトグラフィ樹脂を用いてさらに精製してもよい。

10

【実施例 2 4】

【0 1 4 8】

バキュロウイルス感染昆虫細胞での PRO 1 7 9、PRO 2 3 8、PRO 3 6 4、PRO 8 4 4、PRO 8 4 6、PRO 1 7 6 0、PRO 2 0 5、PRO 3 2 1、PRO 3 3 3、PRO 8 4 0、PRO 8 7 7、PRO 8 7 8、PRO 8 7 9、PRO 8 8 2、PRO 8 8 5 又は PRO 8 8 7 をコード化する核酸の発現

20

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中における組換え発現を記載する。

PRO 1 7 9、PRO 2 3 8、PRO 3 6 4、PRO 8 4 4、PRO 8 4 6、PRO 1 7 6 0、PRO 2 0 5、PRO 3 2 1、PRO 3 3 3、PRO 8 4 0、PRO 8 7 7、PRO 8 7 8、PRO 8 7 9、PRO 8 8 2、PRO 8 8 5 又は PRO 8 8 7 をコード化する配列は、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る。このようなエピトープタグは、ポリ-H i s タグ及び免疫グロブリンタグ (I g G の F c 領域など) を含む。p V L 1 3 9 3 (Novagen) 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。簡単に説明すると、PRO 1 7 9、PRO 2 3 8、PRO 3 6 4、PRO 8 4 4、PRO 8 4 6、PRO 1 7 6 0、PRO 2 0 5、PRO 3 2 1、PRO 3 3 3、PRO 8 4 0、PRO 8 7 7、PRO 8 7 8、PRO 8 7 9、PRO 8 8 2、PRO 8 8 5 のコード化配列又は PRO 8 8 7 又は PRO 1 7 9、PRO 2 3 8、PRO 3 6 4、PRO 8 4 4、PRO 8 4 6、PRO 1 7 6 0、PRO 2 0 5、PRO 3 2 1、PRO 3 3 3、PRO 8 4 0、PRO 8 7 7、PRO 8 7 8、PRO 8 7 9、PRO 8 8 2、PRO 8 8 5 又は PRO 8 8 7 のコード化配列の所望する部分 [膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコード化する配列又はタンパク質が細胞外である場合には成熟タンパク質をコードする配列など] が、5 ' 及び 3 ' 領域に相補的なプライマーでの PCR により増幅される。5 ' プライマーは、隣接する (選択された) 制限酵素部位を包含していてもよい。生成物は、次いで、それらの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。

30

40

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及び BaculoGold T M ウイルス DNA (Pharmingen) を、Spodoptera frugiperda (「 S f 9 」) 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。2 8 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-H i s タグ-[PRO 1 7 9、PRO 2 3 8、PRO 3 6 4、PRO 8 4 4、PRO 8 4 6、PRO 1 7 6 0、PRO 2 0 5、PRO 3 2 1、PRO 3 3 3、PRO 8 4 0、PRO 8 7 7、PRO 8 7 8、PRO 8 7 9、PRO 8 8 2、PR

50

0885又はPRO887]は、例えば、 Ni^{2+} -キレートアフィニティー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。簡単に説明すると、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー(25mlのHepes、pH7.9; 12.5mMのMgCl₂; 0.1mM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、300mM NaCl、10%のグリセロール、pH7.8)で50倍希釈し、0.45 μ m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]を含む分画をそれぞれプールし、負荷バッファーで透析した。

10

20

【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。

30

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タグタンパク質に対する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スポドプテラフルギペルダ(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pb.PH.His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)を追加したHinkのTNM-FM培地で成長させた。細胞は、28°Cで5日間インキュベートした。上清を回収し、続いて10%FBSを追加した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°C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。

40

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°C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分析を、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。

50

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-H i s タグ構築物については、Ni²⁺-NTAカラム (Qiagen) を用いてタンパク質構築物を精製した。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Ni²⁺-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に25mlのG25 Superfine (Pharmacia) カラムを用いて脱塩し、-80 で貯蔵した。

10

【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) に汲出した。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-H i s タグタンパク質について上記した貯蔵バッファーへ脱塩した。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昆虫細胞で成功裏に発現された。

20

あるいは、改変した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化するDNAは、Pfu (Stratagene) 等の適切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には、ポリ-H i s 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も含まれる。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、pIE1-1及びpIE1-2ベクターを設計する。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エンハンサーエレメントを含む。pIE1-1及びpIE1-2は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化する配列など) 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、pIE1-1の誘導体はヒトIgG (pb.PH.IgG) のFc領域又は所望する配列の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。

30

40

【0151】

High-5細胞は、27、CO₂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、配列を有するpIEベースベクター30µgを1mlのEx-細胞培地 (媒質: Ex-細胞401+1/100 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 (Cell FECTIN (Gibco BRL #10362-010) (ポルテックスで混合)) 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室室温で1時間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

50

クチンを除去した。30mlの新鮮なE x -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、バキュロウイルス発現ベクターでの配列の発現を、1mlの上清の25mlのヒスチジンタグタンパク質用のNi²⁺-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、配列を含むタンパク質をNi²⁺-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Ni²⁺-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%のマニトールを含む貯蔵バッファー, pH6.8中で25mlのG25 Superfine(Pharmacia)カラムを用いて脱塩し、-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)に汲出した。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。P配列の均一性は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。

【実施例25】

【0152】

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、PRO885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、当分野で周知であり、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、及び細胞表面に組換えPRO179、PRO238、PRO364、PRO844、PRO846、PRO1760、PRO205、PRO321、PRO333、PRO840、PRO877、PRO878、PRO879、PRO882、PRO885又はPRO887をコード化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することができる。

B a l b / 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 の量で注入した PRO 179、PRO 238、PRO 364、PRO 844、PRO 846、PRO 1760、PRO 205、PRO 321、PRO 333、PRO 840、PRO 877、PRO 878、PRO 879、PRO 882、PRO 885 又は PRO 887 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する。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 - PRO 179、抗 - PRO 238、抗 - PRO 364、抗 - PRO 844、抗 - PRO 846、抗 - PRO 1760、抗 - PRO 205、抗 - PRO 321、抗 - PRO 333、抗 - PRO 840、抗 - PRO 877、抗 - PRO 878、抗 - PRO 879、抗 - PRO 882、抗 - PRO 885 又は抗 - PRO 887 抗体の検出のために ELISA アッセイで試験するため、レトロオービタル出血によって血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

10

【0153】

適当な抗体価が検出された後、抗体に「ポジティブ」な動物に、PRO 179、PRO 238、PRO 364、PRO 844、PRO 846、PRO 1760、PRO 205、PRO 321、PRO 333、PRO 840、PRO 877、PRO 878、PRO 879、PRO 882、PRO 885 又は PRO 887 の静脈内注射の最後の注入がされる。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 CRL 1597 で入手可能な P3 X 63 AgU . 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 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。

20

ハイブリドーマ細胞は、PRO 179、PRO 238、PRO 364、PRO 844、PRO 846、PRO 1760、PRO 205、PRO 321、PRO 333、PRO 840、PRO 877、PRO 878、PRO 879、PRO 882、PRO 885 又は PRO 887 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 PRO 179、PRO 238、PRO 364、PRO 844、PRO 846、PRO 1760、PRO 205、PRO 321、PRO 333、PRO 840、PRO 877、PRO 878、PRO 879、PRO 882、PRO 885 又は PRO 887 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。

30

ポジティブハイブリドーマ細胞を同系の B a l b / c マウスに腹腔内注入し、抗 - PRO 179、抗 - PRO 238、抗 - PRO 364、抗 - PRO 844、抗 - PRO 846、抗 - PRO 1760、抗 - PRO 205、抗 - PRO 321、抗 - PRO 333、抗 - PRO 840、抗 - PRO 877、抗 - PRO 878、抗 - PRO 879、抗 - PRO 882、抗 - PRO 885 又は抗 - PRO 887 モノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィ - を用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテイン A 又はプロテイン G への結合に基づくアフィニティクロマトグラフィ - を用いることもできる。

40

【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 プールパール、マナッサス、VA 20110-2209、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

50

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、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、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。

10

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。

20

【図面の簡単な説明】

【0155】

30

【図1】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」と称されるクローンである。

【図2】図1に示した配列番号:1のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:2)を示す図である。

【図3】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」と称されるクローンである。

【図4】図3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。

40

【図5】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」と称されるクローンである。

【図6】図5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。

【図7】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」と称されるクローンである。

【図8】図7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。

50

【図 9】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」と称されるクローンである。

【図 10】図 9 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。

【図 11】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」と称されるクローンである。

【図 12】図 11 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。

10

【図 13】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」と称されるクローンである。

【図 14】図 13 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。

【図 15】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」と称されるクローンである。

【図 16】図 15 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。

【図 17】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」と称されるクローンである。

20

【図 18】図 17 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。

【図 19】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」と称されるクローンである。

【図 20】図 19 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。

【図 21】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」と称されるクローンである。

【図 22】図 21 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。

30

【図 23】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」と称されるクローンである。

【図 24】図 23 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。

【図 25】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」と称されるクローンである。

【図 26】図 25 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。

【図 27】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」と称されるクローンである。

40

【図 28】図 27 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。

【図 29】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」と称されるクローンである。

【図 30】図 29 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。

【図 31】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」と称されるクローンである。

【図 32】図 31 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。

50

【配列表】

2004154140000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/06	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/10	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 17/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 7/00	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 7/00	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	C 1 2 N 5/00	B
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

- (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 US99/20111
(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 US99/21090
(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 US99/28313
(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 US99/28409
(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 US99/28565
(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 US00/00219
(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 US00/04341
- (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 US00/04342
- (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 US00/04414
- (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)

- (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11
21, 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 11
0
- (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 6
4
- (72)発明者 マースターズ, 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 99
0
- (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 BB41 BB51 CB01 DA13 DA36 FB02 FB05
 4B024 AA01 BA44 BA80 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 EA02 EA04
 GA01 GA11 HA08 HA12
 4B063 QA01 QA17 QA18 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QQ61 QQ91 QR08
 QR14 QR32 QR36 QR42 QR48 QR50 QR55 QS34
 4B064 AG01 AG27 CA02 CA05 CA10 CA11 CA19 CA20 CC24 DA01

4B065 AA01X AA26X AA57X AA87X AA93Y AA95X AB01 AB02 BA01 BA08
CA24 CA25 CA44

4C084 AA02 AA13 AA17 AA19 AA20 BA01 BA02 NA14 ZA362 ZA892
ZB212 ZB262 ZC412

4C085 AA14

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA36 ZA89 ZB21 ZB26
ZC01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20
FA74

专利名称(译)	促进或抑制血管生成和心血管化		
公开(公告)号	JP2004154140A	公开(公告)日	2004-06-03
申请号	JP2003420475	申请日	2003-12-18
[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 ベーカーケヴィンピー フェララナポレオン ゲルバーハンスピーター ゲリッツェンマリーイー ゴダードオードリー ガーニーオースティンエル ヒランケネスジェー マースターズスコットエー パオニコラスエフ ピッティロバートエム ワタナベコリンケー ウィリアムズピーミッキー 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. ベーカー,ケヴィン,ピー. フェララ,ナポレオン ゲルバー,ハンスピーター ゲリッツェン,マリー,イー. ゴダード,オードリー ガーニー,オースティン,エル. ヒラン,ケネス,ジェー. マースターズ,スコット,エー. パオニ,ニコラス,エフ. ピッティ,ロバート,エム. ワタナベ,コリン,ケー. ウィリアムズ,ピー.,ミッキー 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	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.N A61K45/00 A61K45/06 A61K48/00 A61P9/00 A61P9 /10.103 A61P17/00 A61P17/02 A61P35/00 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1 /15 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12N5/00.B C12N5/00.A A61K37/02 A61K38/00 A61K38/02 C12N15/00.A C12N15/00. AZN.A C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12N5/12 C12N7/01		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB41 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045 /FB02 2G045/FB05 4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05		

4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ91 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AA95X 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084/AA20 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA892 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZC412 4C085/AA14 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA36 4C086/ZA89 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZC01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74

優先権	99/05028 1999-03-08 US 60/123957 1999-03-12 US 99/12252 1999-06-02 US 60/144758 1999-07-20 US 60/145698 1999-07-26 US 99/20111 1999-09-01 US 99/21090 1999-09-15 US 99/28313 1999-11-30 US 99/28409 1999-11-30 US 99/28565 1999-12-02 US 00/00219 2000-01-05 US 00/04341 2000-02-18 US 00/04342 2000-02-18 US 00/04414 2000-02-22 US
-----	---

外部リンク [Espacenet](#)

摘要(译)

要解决的问题：提供用于刺激或抑制哺乳动物（包括人）的血管生成和/或心血管成形的组合物和方法。解决方案：提供了基于多肽或其拮抗剂的药物组合物，其根据一种或多种这些用途进行鉴定。用组合物诊断，预防或治疗的疾病包括损伤，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，本发明提供了新的多肽和编码这些多肽的核酸分子。此外，提供了包含这些核酸序列的载体和宿主细胞，包含与不同种类多肽融合的这些多肽的嵌合多肽分子，与这些多肽结合的抗体，以及产生这些多肽的方法。 Z

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 %