

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-516227

(P2004-516227A)

(43) 公表日 平成16年6月3日(2004.6.3)

|                                    |                  |             |
|------------------------------------|------------------|-------------|
| (51) Int.Cl. <sup>7</sup>          | F I              | テーマコード (参考) |
| A 6 1 K 38/00                      | A 6 1 K 37/02    | 2 G 0 4 5   |
| A 6 1 K 39/395                     | A 6 1 K 39/395 D | 4 B 0 2 4   |
| A 6 1 K 45/00                      | A 6 1 K 39/395 N | 4 B 0 6 3   |
| A 6 1 P 1/16                       | A 6 1 K 45/00    | 4 B 0 6 4   |
| A 6 1 P 3/10                       | A 6 1 P 1/16     | 4 B 0 6 5   |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 497 頁) 最終頁に続く |                  |             |

|               |                              |          |                       |
|---------------|------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2000-603379 (P2000-603379) | (71) 出願人 | 596168317             |
| (86) (22) 出願日 | 平成12年3月2日 (2000.3.2)         |          | ジェネンテック・インコーポレーテッド    |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成13年9月10日 (2001.9.10)       |          | GENENTECH, INC.       |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2000/005841            |          | アメリカ合衆国カリフォルニア・9408   |
| (87) 国際公開番号   | W02000/053758                |          | 0-4990・サウス・サン・フランシス   |
| (87) 国際公開日    | 平成12年9月14日 (2000.9.14)       |          | コ・ディーエヌエー・ウェイ・1       |
| (31) 優先権主張番号  | US9905028                    | (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, 618                  |          | 弁理士 小林 義教             |
| (32) 優先日      | 平成11年3月10日 (1999.3.10)       | (72) 発明者 | アシュケナジ, 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 944   |
| (31) 優先権主張番号  | 60/123, 957                  |          | 02, サン マテオ, テリータウン スト |
| (32) 優先日      | 平成11年3月12日 (1999.3.12)       |          | リート 1456              |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | 最終頁に続く                |

(54) 【発明の名称】 免疫関連疾患を治療するための組成物と方法

(57) 【要約】

本発明は新規なタンパク質を含む組成物と免疫関連疾患の診断と治療の方法に関する。

MSLFGLLLTALAGQRQGTQAESNLSSKQFSSNKEQNGVDPQHERIITVSTNGSIHS  
PRFPHYPRNTVLVWRLVAVEENVWQLTFDERFGLEDPEDDICKYDFVEVEEPPSDGTIL  
GRWCGSGTVPKGQISKGNQIRIRFVSDEYFPEPGFCHYNIVMPOFTEAVSPSVLPSSA  
LPLDLLNNAITAFSTLEDLIRYLEPERWQLDLEDLYRPTWQLLGKAFVFGKSRVVDNL  
LITEEVRLYSTPRNFSVSIREELKRTDTJFWPGCLLVKRCGNGCACLHNCNECQCVPSK  
VTKKYHEVLQLRPKTGVRLHKSLLDVALEHHEECDCVCRGSTGG

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

免疫関連疾患の治療に有用な組成物において、

(a) その必要とする哺乳動物の組織への炎症細胞の浸潤を増大させ、

(b) その必要とする哺乳動物における免疫反応を刺激又は増強し、又は

(c) 抗原に反応してその必要とする哺乳動物におけるTーリンパ球の増殖を増加させる、特性を有し、PRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリペプチド、そのアゴニスト又は断片、及び担体又は賦形剤を含有する組成物。

10

## 【請求項2】

20

有効量のPRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリペプチド、そのアゴニスト、アンタゴニスト又は断片を含む請求項1に記載の組成物。

30

## 【請求項3】

成長阻害剤、細胞障害薬又は化学療法剤をさらに含有する請求項2に記載の組成物。

## 【請求項4】

(a) その必要とする哺乳動物の組織への炎症細胞の浸潤を増大させ、(b) その必要とする哺乳動物における免疫反応を刺激又は増強し、又は(c) 抗原に反応してその必要とする哺乳動物においてTーリンパ球の増殖を増加させる、

特性を有する組成物を調製するための、PRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO

40

50

1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリペプチド、そのアゴニスト又は断片の使用。

【請求項5】

有効量のPRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430、PRO5727ポリペプチド、そのアゴニスト、アンタゴニスト又は断片を含む請求項4に記載の使用。

【請求項6】

成長阻害剤、細胞障害薬又は化学療法剤をさらに含有する請求項2に記載の組成物。

【請求項7】

有効量のPRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリペプチド、そのアゴニスト抗体、そのアンタゴニスト抗体又は断片を哺乳動物に投与することを含み、その必要とする哺乳動物におけるT細胞媒介疾患などの免疫関連疾患の治療方法。

【請求項8】

疾患が、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ様関節炎、骨関節症、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症、特発性炎症ミオパシー、シェーグレン症候群、全身性血管炎症症、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少、甲状腺炎、真性糖尿病、免疫仲介腎疾患、多発性硬化症のような中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、特発性脱髄性多発神経障害又はギラン・バレー症候群、及び慢性炎症脱髄性多発神経障害、伝染性肝炎、自己免疫性慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、肉芽腫性肝炎等の肝疾患、硬化性胆管炎、炎症性腸疾患、グルテン過敏性腸疾患、ウィップル病、水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、乾癬、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹等のアレルギー性疾患、好球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎等の肺の免疫疾患、拒絶反応及び移植片対宿主疾患を含む移植関連疾患から選択される請求項7に記載の方法。

【請求項9】

アゴニスト又はアンタゴニストがモノクローナル抗体である請求項1ないし8のいずれか1項に記載の組成物又は使用。

【請求項10】

アゴニスト又はアンタゴニストが抗体断片又は単鎖抗体である請求項１ないし９のいずれか１項に記載の組成物又は使用。

【請求項１１】

抗体が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）酸基を有する請求項９又は１０に記載の組成物又は使用。

【請求項１２】

ポリペプチドを含有すると推測される細胞を、抗－PRO200、抗－PRO204、抗－PRO212、抗－PRO216、抗－PRO226、抗－PRO240、抗－PRO235、抗－PRO245、抗－PRO172、抗－PRO273、抗－PRO272、抗－PRO332、抗－PRO526、抗－PRO701、抗－PRO361、抗－PRO362、抗－PRO363、抗－PRO364、抗－PRO356、抗－PRO531、抗－PRO533、抗－PRO1083、抗－PRO865、抗－PRO770、抗－PRO769、抗－PRO788、抗－PRO1114、抗－PRO1007、抗－PRO1184、抗－PRO1031、抗－PRO1346、抗－PRO1155、抗－PRO1250、抗－PRO1312、抗－PRO1192、抗－PRO1246、抗－PRO1283、抗－PRO1195、抗－PRO1343、抗－PRO1418、抗－PRO1387、抗－PRO1410、抗－PRO1917、抗－PRO1868、抗－PRO205、抗－PRO21、抗－PRO269、抗－PRO344、抗－PRO333、抗－PRO381、抗－PRO720、抗－PRO866、抗－PRO840、抗－PRO982、抗－PRO836、抗－PRO1159、抗－PRO1358、抗－PRO1325、抗－PRO1338、抗－PRO1434、抗－PRO4333、抗－PRO4302、抗－PRO4430又はPRO5727抗体に暴露し、抗体の細胞への結合を測定することを含んでなる、PRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリペプチドの存在を決定する方法。

【請求項１３】

哺乳動物における免疫関連疾患の診断方法において、（a）哺乳動物から得た組織細胞の試験試料と、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いて、PRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリペプチドをコー



ドする遺伝子の発現レベルを検出することを含んでなり、対照と比較して試験試料の発現レベルが高いか低いと、試験組織細胞を得た哺乳動物に免疫関連疾患が存在することを示すものである診断方法。

【請求項 14】

哺乳動物における免疫関連疾患の診断方法において、(a) 抗-PRO200、抗-PRO204、抗-PRO212、抗-PRO216、抗-PRO226、抗-PRO240、抗-PRO235、抗-PRO245、抗-PRO172、抗-PRO273、抗-PRO272、抗-PRO332、抗-PRO526、抗-PRO701、抗-PRO361、抗-PRO362、抗-PRO363、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO531、抗-PRO533、抗-PRO1083、抗-PRO865、抗-PRO770、抗-PRO769、抗-PRO788、抗-PRO1114、抗-PRO1007、抗-PRO1184、抗-PRO1031、抗-PRO1346、抗-PRO1155、抗-PRO1250、抗-PRO1312、抗-PRO1192、抗-PRO1246、抗-PRO1283、抗-PRO1195、抗-PRO1343、抗-PRO1418、抗-PRO1387、抗-PRO1410、抗-PRO1917、抗-PRO1868、抗-PRO205、抗-PRO21、抗-PRO269、抗-PRO344、抗-PRO333、抗-PRO381、抗-PRO720、抗-PRO866、抗-PRO840、抗-PRO982、抗-PRO836、抗-PRO1159、抗-PRO1358、抗-PRO1325、抗-PRO1338、抗-PRO1434、抗-PRO4333、抗-PRO4302、抗-PRO4430又は抗-PRO5727抗体を哺乳動物から得た組織細胞の試験試料に接触させ、(b) 試験試料中でのポリペプチドと抗体との複合体形成を検出することを含んでなる方法。

【請求項 15】

適当なパッケージに、抗-PRO200、抗-PRO204、抗-PRO212、抗-PRO216、抗-PRO226、抗-PRO240、抗-PRO235、抗-PRO245、抗-PRO172、抗-PRO273、抗-PRO272、抗-PRO332、抗-PRO526、抗-PRO701、抗-PRO361、抗-PRO362、抗-PRO363、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO531、抗-PRO533、抗-PRO1083、抗-PRO865、抗-PRO770、抗-PRO769、抗-PRO788、抗-PRO1114、抗-PRO1007、抗-PRO1184、抗-PRO1031、抗-PRO1346、抗-PRO1155、抗-PRO1250、抗-PRO1312、抗-PRO1192、抗-PRO1246、抗-PRO1283、抗-PRO1195、抗-PRO1343、抗-PRO1418、抗-PRO1387、抗-PRO1410、抗-PRO1917、抗-PRO1868、抗-PRO205、抗-PRO21、抗-PRO269、抗-PRO344、抗-PRO333、抗-PRO381、抗-PRO720、抗-PRO866、抗-PRO840、抗-PRO982、抗-PRO836、抗-PRO1159、抗-PRO1358、抗-PRO1325、抗-PRO1338、抗-PRO1434、抗-PRO4333、抗-PRO4302、抗-PRO4430又は抗-PRO5727抗体又はその断片と担体を含有してなる免疫関連疾患診断キット。

【請求項 16】

PRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333

、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリペプチドを検出するために抗体を使用するための説明書をさらに含んでなる請求項15に記載のキット。

【請求項17】

容器；

容器上の説明書；及び

容器内に含まれる活性剤を含有する組成物；

を含んでなる製造品において、組成物が哺乳動物における免疫反応の阻害又は低減に効果があり、容器上の説明書が組成物が免疫関連疾患の治療に使用できることを示しており、組成物中の活性剤がPRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリペプチドの発現及び／又は活性を阻害する薬剤である製造品。

【請求項18】

前記活性剤が、抗-PRO200、抗-PRO204、抗-PRO212、抗-PRO216、抗-PRO226、抗-PRO240、抗-PRO235、抗-PRO245、抗-PRO172、抗-PRO273、抗-PRO272、抗-PRO332、抗-PRO526、抗-PRO701、抗-PRO361、抗-PRO362、抗-PRO363、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO531、抗-PRO533、抗-PRO1083、抗-PRO865、抗-PRO770、抗-PRO769、抗-PRO788、抗-PRO1114、抗-PRO1007、抗-PRO1184、抗-PRO1031、抗-PRO1346、抗-PRO1155、抗-PRO1250、抗-PRO1312、抗-PRO1192、抗-PRO1246、抗-PRO1283、抗-PRO1195、抗-PRO1343、抗-PRO1418、抗-PRO1387、抗-PRO1410、抗-PRO1917、抗-PRO1868、抗-PRO205、抗-PRO21、抗-PRO269、抗-PRO344、抗-PRO333、抗-PRO381、抗-PRO720、抗-PRO866、抗-PRO840、抗-PRO982、抗-PRO836、抗-PRO1159、抗-PRO1358、抗-PRO1325、抗-PRO1338、抗-PRO1434、抗-PRO4333、抗-PRO4302、抗-PRO4430又は抗-PRO5727抗体である請求項17に記載の製造品。

【請求項19】

PRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、P

PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリペプチドの発現又は活性を阻害可能な化合物を同定する方法において、該ポリペプチドに候補化合物を、これら2つの成分を互いに作用させるのに十分な時間と条件下で接触させることを含んでなる方法。

【請求項20】

候補化合物、又はPRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリペプチドが固体支持体上に固定されている請求項19に記載の方法。

【請求項21】

非固定成分が検出標識を有する請求項20に記載の方法。

【請求項22】

Fig1（配列番号：1）、Fig3（配列番号：11）、Fig5（配列番号：13）、Fig7（配列番号：18）、Fig9（配列番号：20）、Fig11（配列番号：25）、Fig13（配列番号：30）、Fig15（配列番号：35）、Fig17（配列番号：40）、Fig19（配列番号：45）、Fig21（配列番号：50）、Fig23（配列番号：56）、Fig25（配列番号：61）、Fig27（配列番号：66）、Fig29（配列番号：71）、Fig31（配列番号：79）、Fig33（配列番号：86）、Fig35（配列番号：91）、Fig37（配列番号：101）、Fig39（配列番号：106）、Fig41（配列番号：111）、Fig43（配列番号：116）、Fig45（配列番号：123）、Fig47（配列番号：133）、Fig49（配列番号：139）、Fig51（配列番号：141）、Fig53（配列番号：143）、Fig55（配列番号：145）、Fig57（配列番号：147）、Fig59（配列番号：149）、Fig61（配列番号：151）、Fig63（配列番号：156）、Fig65（配列番号：158）、Fig67（配列番号：160）、Fig69（配列番号：162）、Fig71（配列番号：167）、Fig73（配列番号：169）、Fig75（配列番号：177）、Fig77（配列番号：179）、Fig79（配列番号：184）、Fig81（配列番号：186）、Fig83（配列番号：188）、Fig85（配列番号：190）、Fig87（配列番号：192）、Fig89（配列番号：228）、Fig91（配列番号：230）、Fig93（配列番号：232）、Fig95（配列番号：240）、Fig97（配列番号：248）、Fig99（配列番号：250）、Fig101（配列番号：255）、Fig103（配列番号：257）、Fig105（配列番号：266）、Fig107（配列番号：268）、Fig109（配列番号：270）、Fig111（配列番号：272）、Fig113（配列番号：274）、Fig115（配列番号：276）、Fig117（配列番号：278）、Fig119（配列番号：280）、Fig121（配列番号：285）、Fig123（配列番号：292）、Fig125（配列番号：294）又はFig127（配列番号：296）に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配

列をコードするヌクレオチド配列と少なくとも８０％の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項２３】

F i g 1（配列番号：１）、F i g 3（配列番号：１１）、F i g 5（配列番号：１３）、  
F i g 7（配列番号：１８）、F i g 9（配列番号：２０）、F i g 11（配列番号：  
２５）、F i g 13（配列番号：３０）、F i g 15（配列番号：３５）、F i g 17（  
配列番号：４０）、F i g 19（配列番号：４５）、F i g 21（配列番号：５０）、F  
i g 23（配列番号：５６）、F i g 25（配列番号：６１）、F i g 27（配列番号：  
６６）、F i g 29（配列番号：７１）、F i g 31（配列番号：７９）、F i g 33（  
配列番号：８６）、F i g 35（配列番号：９１）、F i g 37（配列番号：１０１）、  
F i g 39（配列番号：１０６）、F i g 41（配列番号：１１１）、F i g 43（配列  
番号：１１６）、F i g 45（配列番号：１２３）、F i g 47（配列番号：１３３）、  
F i g 49（配列番号：１３９）、F i g 51（配列番号：１４１）、F i g 53（配列  
番号：１４３）、F i g 55（配列番号：１４５）、F i g 57（配列番号：１４７）、  
F i g 59（配列番号：１４９）、F i g 61（配列番号：１５１）、F i g 63（配列  
番号：１５６）、F i g 65（配列番号：１５８）、F i g 67（配列番号：１６０）、  
F i g 69（配列番号：１６２）、F i g 71（配列番号：１６７）、F i g 73（配列  
番号：１６９）、F i g 75（配列番号：１７７）、F i g 77（配列番号：１７９）、  
F i g 79（配列番号：１８４）、F i g 81（配列番号：１８６）、F i g 83（配列  
番号：１８８）、F i g 85（配列番号：１９０）、F i g 87（配列番号：１９２）、  
F i g 89（配列番号：２２８）、F i g 91（配列番号：２３０）、F i g 93（配列  
番号：２３２）、F i g 95（配列番号：２４０）、F i g 97（配列番号：２４８）、  
F i g 99（配列番号：２５０）、F i g 101（配列番号：２５５）、F i g 103（  
配列番号：２５７）、F i g 105（配列番号：２６６）、F i g 107（配列番号：２  
６８）、F i g 109（配列番号：２７０）、F i g 111（配列番号：２７２）、F i  
g 113（配列番号：２７４）、F i g 115（配列番号：２７６）、F i g 117（配  
列番号：２７８）、F i g 119（配列番号：２８０）、F i g 121（配列番号：２８  
５）、F i g 123（配列番号：２９２）、F i g 125（配列番号：２９４）又はF i  
g 127（配列番号：２９６）に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレ  
オチド配列と少なくとも８０％の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項２４】

F i g 1（配列番号：１）、F i g 3（配列番号：１１）、F i g 5（配列番号：１３）、  
F i g 7（配列番号：１８）、F i g 9（配列番号：２０）、F i g 11（配列番号：  
２５）、F i g 13（配列番号：３０）、F i g 15（配列番号：３５）、F i g 17（  
配列番号：４０）、F i g 19（配列番号：４５）、F i g 21（配列番号：５０）、F  
i g 23（配列番号：５６）、F i g 25（配列番号：６１）、F i g 27（配列番号：  
６６）、F i g 29（配列番号：７１）、F i g 31（配列番号：７９）、F i g 33（  
配列番号：８６）、F i g 35（配列番号：９１）、F i g 37（配列番号：１０１）、  
F i g 39（配列番号：１０６）、F i g 41（配列番号：１１１）、F i g 43（配列  
番号：１１６）、F i g 45（配列番号：１２３）、F i g 47（配列番号：１３３）、  
F i g 49（配列番号：１３９）、F i g 51（配列番号：１４１）、F i g 53（配列  
番号：１４３）、F i g 55（配列番号：１４５）、F i g 57（配列番号：１４７）、  
F i g 59（配列番号：１４９）、F i g 61（配列番号：１５１）、F i g 63（配列  
番号：１５６）、F i g 65（配列番号：１５８）、F i g 67（配列番号：１６０）、  
F i g 69（配列番号：１６２）、F i g 71（配列番号：１６７）、F i g 73（配列  
番号：１６９）、F i g 75（配列番号：１７７）、F i g 77（配列番号：１７９）、  
F i g 79（配列番号：１８４）、F i g 81（配列番号：１８６）、F i g 83（配列  
番号：１８８）、F i g 85（配列番号：１９０）、F i g 87（配列番号：１９２）、  
F i g 89（配列番号：２２８）、F i g 91（配列番号：２３０）、F i g 93（配列  
番号：２３２）、F i g 95（配列番号：２４０）、F i g 97（配列番号：２４８）、

Fig 99 (配列番号: 250)、Fig 101 (配列番号: 255)、Fig 103 (配列番号: 257)、Fig 105 (配列番号: 266)、Fig 107 (配列番号: 268)、Fig 109 (配列番号: 270)、Fig 111 (配列番号: 272)、Fig 113 (配列番号: 274)、Fig 115 (配列番号: 276)、Fig 117 (配列番号: 278)、Fig 119 (配列番号: 280)、Fig 121 (配列番号: 285)、Fig 123 (配列番号: 292)、Fig 125 (配列番号: 294) 又は Fig 127 (配列番号: 296) に示すヌクレオチド配列の全長コード化配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 80% の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項 25】

A T C C 受託番号 209653、209380、209254、209381、209376、209260、209374、209265、209419、209424、209388、209433、209704、209720、209621、209620、209616、209436、209422、209702、209480、209859、209774、209801、209802、209849、209905、209950、209962、209866、203128、209986、203173、203132、203093、203457、203244、203094、203282、203276、203160、203277、203573、203553、一、209456、209397、209492、一、209808、209802、209750、209858、203583、209989、203092、203131、203269、203267、203657、203818、203834、23-PTA、203906 で寄託された DNA の全長コード化配列と少なくとも 80% の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項 26】

請求項 22 ないし 25 のいずれか 1 項に記載の核酸を含んでなるベクター。

【請求項 27】

ベクターで形質転換された宿主細胞により認識されるコントロール配列と作用可能に結合する請求項 26 に記載のベクター。

【請求項 28】

請求項 26 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 29】

前記細胞が CHO 細胞である請求項 28 に記載の宿主細胞。

【請求項 30】

前記細胞が大腸菌である請求項 28 に記載の宿主細胞。

【請求項 31】

前記細胞が酵母菌細胞である請求項 28 に記載の宿主細胞。

【請求項 32】

PRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430 又は PRO5727 ポリペプチドの生産方法において、該ポリペプチドの発現に適した条件下で、請求項 28 に記載の宿

10

20

30

40

50

主細胞を培養し、細胞培養物から該ポリペプチドを回収することを含んでなる方法。

【請求項 33】

Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 12)、Fig 6 (配列番号: 14)、  
Fig 8 (配列番号: 19)、Fig 10 (配列番号: 21)、Fig 12 (配列番号: 26)、  
Fig 14 (配列番号: 31)、Fig 16 (配列番号: 36)、Fig 18 (配列番号: 41)、  
Fig 20 (配列番号: 46)、Fig 22 (配列番号: 51)、Fig 24 (配列番号: 57)、  
Fig 26 (配列番号: 62)、Fig 28 (配列番号: 67)、Fig 30 (配列番号: 72)、  
Fig 32 (配列番号: 80)、Fig 34 (配列番号: 87)、Fig 36 (配列番号: 92)、  
Fig 38 (配列番号: 102)、Fig 40 (配列番号: 107)、Fig 42 (配列番号: 112)、  
Fig 44 (配列番号: 117)、Fig 46 (配列番号: 124)、Fig 48 (配列番号: 134)、  
Fig 50 (配列番号: 140)、Fig 52 (配列番号: 142)、Fig 54 (配列番号: 144)、  
Fig 56 (配列番号: 146)、Fig 58 (配列番号: 148)、Fig 60 (配列番号: 150)、  
Fig 62 (配列番号: 152)、Fig 64 (配列番号: 157)、Fig 66 (配列番号: 159)、  
Fig 68 (配列番号: 161)、Fig 70 (配列番号: 163)、Fig 72 (配列番号: 168)、  
Fig 74 (配列番号: 170)、Fig 76 (配列番号: 178)、Fig 78 (配列番号: 180)、  
Fig 80 (配列番号: 185)、Fig 82 (配列番号: 187)、Fig 84 (配列番号: 189)、  
Fig 86 (配列番号: 191)、Fig 88 (配列番号: 193)、Fig 90 (配列番号: 229)、  
Fig 92 (配列番号: 231)、Fig 94 (配列番号: 233)、Fig 96 (配列番号: 241)、  
Fig 98 (配列番号: 249)、Fig 100 (配列番号: 251)、Fig 102 (配列番号: 256)、  
Fig 104 (配列番号: 258)、Fig 106 (配列番号: 267)、Fig 108 (配列番号: 269)、  
Fig 110 (配列番号: 271)、Fig 112 (配列番号: 273)、Fig 114 (配列番号: 275)、  
Fig 116 (配列番号: 277)、Fig 118 (配列番号: 279)、Fig 120 (配列番号: 281)、  
Fig 122 (配列番号: 286)、Fig 124 (配列番号: 293)、Fig 126 (配列番号: 295) 又は  
Fig 128 (配列番号: 297) に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ  
酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

【請求項 34】

Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 12)、Fig 6 (配列番号: 14)、  
Fig 8 (配列番号: 19)、Fig 10 (配列番号: 21)、Fig 12 (配列番号: 26)、  
Fig 14 (配列番号: 31)、Fig 16 (配列番号: 36)、Fig 18 (配列番号: 41)、  
Fig 20 (配列番号: 46)、Fig 22 (配列番号: 51)、Fig 24 (配列番号: 57)、  
Fig 26 (配列番号: 62)、Fig 28 (配列番号: 67)、Fig 30 (配列番号: 72)、  
Fig 32 (配列番号: 80)、Fig 34 (配列番号: 87)、Fig 36 (配列番号: 92)、  
Fig 38 (配列番号: 102)、Fig 40 (配列番号: 107)、Fig 42 (配列番号: 112)、  
Fig 44 (配列番号: 117)、Fig 46 (配列番号: 124)、Fig 48 (配列番号: 134)、  
Fig 50 (配列番号: 140)、Fig 52 (配列番号: 142)、Fig 54 (配列番号: 144)、  
Fig 56 (配列番号: 146)、Fig 58 (配列番号: 148)、Fig 60 (配列番号: 150)、  
Fig 62 (配列番号: 152)、Fig 64 (配列番号: 157)、Fig 66 (配列番号: 159)、  
Fig 68 (配列番号: 161)、Fig 70 (配列番号: 163)、Fig 72 (配列番号: 168)、  
Fig 74 (配列番号: 170)、Fig 76 (配列番号: 178)、Fig 78 (配列番号: 180)、  
Fig 80 (配列番号: 185)、Fig 82 (配列番号: 187)、Fig 84 (配列番号: 189)、  
Fig 86 (配列番号: 191)、Fig 88 (配列番号: 193)、Fig 90 (配列番号: 229)、  
Fig 92 (配列番号: 231)、Fig 94 (配列番号: 233)、Fig 96 (配列番号: 241)、  
Fig 98 (配列番号: 249)、Fig 100 (配列番号: 251)、Fig 102 (配列番号: 256)、Fig 104 (配列番号: 258)、  
Fig 106 (配列番号: 267)、Fig 108 (配列番号: 269)、Fig 110 (配列番号: 271)、  
Fig 112 (配列番号: 273)、Fig 114 (配列番号: 275)、Fig 116 (配列番号: 277)、  
Fig 118 (配列番号: 279)、Fig 120 (配列番号: 281)、Fig 122 (配列番号: 286)、  
Fig 124 (配列番号: 293)、Fig 126 (配列番号: 295) 又は Fig 128 (配列番号: 297) に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

4 (配列番号: 258)、Fig 106 (配列番号: 267)、Fig 108 (配列番号: 269)、Fig 110 (配列番号: 271)、Fig 112 (配列番号: 273)、Fig 114 (配列番号: 275)、Fig 116 (配列番号: 277)、Fig 118 (配列番号: 279)、Fig 120 (配列番号: 281)、Fig 122 (配列番号: 286)、Fig 124 (配列番号: 293)、Fig 126 (配列番号: 295) 又は Fig 128 (配列番号: 297) に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較したとき、少なくとも80%のポジティブのスコアを示す単離されたポリペプチド。

【請求項35】

A T C C 受託番号 209653、209380、209254、209381、209376、209260、209374、209265、209419、209424、209388、209433、209704、209720、209621、209620、209616、209436、209422、209702、209480、209859、209774、209801、209802、209849、209905、209950、209962、209866、203128、209986、203173、203132、203093、203457、203244、203094、203282、203276、203160、203277、203573、203553、一、209456、209397、209492、一、209808、209802、209750、209858、203583、209989、203092、203131、203269、203267、203657、203818、203834、23-PTA、203906 で寄託されたDNAの全長コード化配列によりコードされるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

【請求項36】

異種性アミノ酸配列に融合した請求項33ないし35のいずれか1項に記載のポリペプチドを含んでなるキメラ分子。

【請求項37】

前記異種性アミノ酸配列がエピトープタグ配列である請求項36に記載のキメラ分子。

【請求項38】

前記異種性アミノ酸配列が免疫グロブリンのFc領域である請求項36に記載のキメラ分子。

【請求項39】

請求項33ないし35のいずれか1項に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項40】

前記抗体がモノクローナル抗体、ヒト化抗体又は単鎖抗体である請求項39に記載の抗体。

【請求項41】

(a) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 12)、Fig 6 (配列番号: 14)、Fig 8 (配列番号: 19)、Fig 10 (配列番号: 21)、Fig 12 (配列番号: 26)、Fig 14 (配列番号: 31)、Fig 16 (配列番号: 36)、Fig 18 (配列番号: 41)、Fig 20 (配列番号: 46)、Fig 22 (配列番号: 51)、Fig 24 (配列番号: 57)、Fig 26 (配列番号: 62)、Fig 28 (配列番号: 67)、Fig 30 (配列番号: 72)、Fig 32 (配列番号: 80)、Fig 34 (配列番号: 87)、Fig 36 (配列番号: 92)、Fig 38 (配列番号: 102)、Fig 40 (配列番号: 107)、Fig 42 (配列番号: 112)、Fig 44 (配列番号: 117)、Fig 46 (配列番号: 124)、Fig 48 (配列番号: 134)、Fig 50 (配列番号: 140)、Fig 52 (配列番号: 142)、Fig 54 (配列番号: 144)、Fig 56 (配列番号: 146)、Fig 58 (配列番号: 148)、Fig 60 (配列番号: 150)、Fig 62 (配列番号: 152)、Fig 64 (配列番号: 157)、Fig 66 (配列番号: 159)、Fig 68 (配列番号: 161)、Fig 70 (配列番号: 163)、Fig 72 (配列番号: 168)、Fig 7

4 (配列番号: 170)、Fig 76 (配列番号: 178)、Fig 78 (配列番号: 180)、Fig 80 (配列番号: 185)、Fig 82 (配列番号: 187)、Fig 84 (配列番号: 189)、Fig 86 (配列番号: 191)、Fig 88 (配列番号: 193)、Fig 90 (配列番号: 229)、Fig 92 (配列番号: 231)、Fig 94 (配列番号: 233)、Fig 96 (配列番号: 241)、Fig 98 (配列番号: 249)、Fig 100 (配列番号: 251)、Fig 102 (配列番号: 256)、Fig 104 (配列番号: 258)、Fig 106 (配列番号: 267)、Fig 108 (配列番号: 269)、Fig 110 (配列番号: 271)、Fig 112 (配列番号: 273)、Fig 114 (配列番号: 275)、Fig 116 (配列番号: 277)、Fig 118 (配列番号: 279)、Fig 120 (配列番号: 281)、Fig 122 (配列番号: 286)、Fig 124 (配列番号: 293)、Fig 126 (配列番号: 295) 又は Fig 128 (配列番号: 297) に示すポリペプチドをコードし、その関連シグナルペプチドを欠くヌクレオチド配列; 10

(b) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 12)、Fig 6 (配列番号: 14)、Fig 8 (配列番号: 19)、Fig 10 (配列番号: 21)、Fig 12 (配列番号: 26)、Fig 14 (配列番号: 31)、Fig 16 (配列番号: 36)、Fig 18 (配列番号: 41)、Fig 20 (配列番号: 46)、Fig 22 (配列番号: 51)、Fig 24 (配列番号: 57)、Fig 26 (配列番号: 62)、Fig 28 (配列番号: 67)、Fig 30 (配列番号: 72)、Fig 32 (配列番号: 80)、Fig 34 (配列番号: 87)、Fig 36 (配列番号: 92)、Fig 38 (配列番号: 102)、Fig 40 (配列番号: 107)、Fig 42 (配列番号: 112)、Fig 44 (配列番号: 117)、Fig 46 (配列番号: 124)、Fig 48 (配列番号: 134)、Fig 50 (配列番号: 140)、Fig 52 (配列番号: 142)、Fig 54 (配列番号: 144)、Fig 56 (配列番号: 146)、Fig 58 (配列番号: 148)、Fig 60 (配列番号: 150)、Fig 62 (配列番号: 152)、Fig 64 (配列番号: 157)、Fig 66 (配列番号: 159)、Fig 68 (配列番号: 161)、Fig 70 (配列番号: 163)、Fig 72 (配列番号: 168)、Fig 74 (配列番号: 170)、Fig 76 (配列番号: 178)、Fig 78 (配列番号: 180)、Fig 80 (配列番号: 185)、Fig 82 (配列番号: 187)、Fig 84 (配列番号: 189)、Fig 86 (配列番号: 191)、Fig 88 (配列番号: 193)、Fig 90 (配列番号: 229)、Fig 92 (配列番号: 231)、Fig 94 (配列番号: 233)、Fig 96 (配列番号: 241)、Fig 98 (配列番号: 249)、Fig 100 (配列番号: 251)、Fig 102 (配列番号: 256)、Fig 104 (配列番号: 258)、Fig 106 (配列番号: 267)、Fig 108 (配列番号: 269)、Fig 110 (配列番号: 271)、Fig 112 (配列番号: 273)、Fig 114 (配列番号: 275)、Fig 116 (配列番号: 277)、Fig 118 (配列番号: 279)、Fig 120 (配列番号: 281)、Fig 122 (配列番号: 286)、Fig 124 (配列番号: 293)、Fig 126 (配列番号: 295) 又は Fig 128 (配列番号: 297) に示すポリペプチドの細胞外ドメインをコードし、その関連シグナルペプチドを伴うヌクレオチド配列; 又は 20 30 40

(c) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 12)、Fig 6 (配列番号: 14)、Fig 8 (配列番号: 19)、Fig 10 (配列番号: 21)、Fig 12 (配列番号: 26)、Fig 14 (配列番号: 31)、Fig 16 (配列番号: 36)、Fig 18 (配列番号: 41)、Fig 20 (配列番号: 46)、Fig 22 (配列番号: 51)、Fig 24 (配列番号: 57)、Fig 26 (配列番号: 62)、Fig 28 (配列番号: 67)、Fig 30 (配列番号: 72)、Fig 32 (配列番号: 80)、Fig 34 (配列番号: 87)、Fig 36 (配列番号: 92)、Fig 38 (配列番号: 102)、Fig 40 (配列番号: 107)、Fig 42 (配列番号: 112)、Fig 44 (配列番号: 117)、Fig 46 (配列番号: 124)、Fig 48 (配列番号: 134)、Fig 50 (配列番号: 140)、Fig 52 (配列番号: 142)、Fig 54 (配列番号: 144)、Fig 56 (配列番号: 146)、Fig 58 (配列番号: 148)、Fig 60 (配列番号: 150)、Fig 62 (配列番号: 152)、Fig 64 (配列番号: 157)、Fig 66 (配列番号: 159)、Fig 68 (配列番号: 161)、Fig 70 (配列番号: 163)、Fig 72 (配列番号: 168)、Fig 74 (配列番号: 170)、Fig 76 (配列番号: 178)、Fig 78 (配列番号: 180)、Fig 80 (配列番号: 185)、Fig 82 (配列番号: 187)、Fig 84 (配列番号: 189)、Fig 86 (配列番号: 191)、Fig 88 (配列番号: 193)、Fig 90 (配列番号: 229)、Fig 92 (配列番号: 231)、Fig 94 (配列番号: 233)、Fig 96 (配列番号: 241)、Fig 98 (配列番号: 249)、Fig 100 (配列番号: 251)、Fig 102 (配列番号: 256)、Fig 104 (配列番号: 258)、Fig 106 (配列番号: 267)、Fig 108 (配列番号: 269)、Fig 110 (配列番号: 271)、Fig 112 (配列番号: 273)、Fig 114 (配列番号: 275)、Fig 116 (配列番号: 277)、Fig 118 (配列番号: 279)、Fig 120 (配列番号: 281)、Fig 122 (配列番号: 286)、Fig 124 (配列番号: 293)、Fig 126 (配列番号: 295) 又は Fig 128 (配列番号: 297) に示すポリペプチドの細胞外ドメインをコードし、その関連シグナルペプチドを伴うヌクレオチド配列; 又は 40 50



4 (配列番号: 144)、Fig 56 (配列番号: 146)、Fig 58 (配列番号: 148)、Fig 60 (配列番号: 150)、Fig 62 (配列番号: 152)、Fig 64 (配列番号: 157)、Fig 66 (配列番号: 159)、Fig 68 (配列番号: 161)、Fig 70 (配列番号: 163)、Fig 72 (配列番号: 168)、Fig 74 (配列番号: 170)、Fig 76 (配列番号: 178)、Fig 78 (配列番号: 180)、Fig 80 (配列番号: 185)、Fig 82 (配列番号: 187)、Fig 84 (配列番号: 189)、Fig 86 (配列番号: 191)、Fig 88 (配列番号: 193)、Fig 90 (配列番号: 229)、Fig 92 (配列番号: 231)、Fig 94 (配列番号: 233)、Fig 96 (配列番号: 241)、Fig 98 (配列番号: 249)、Fig 100 (配列番号: 251)、Fig 102 (配列番号: 256)、Fig 104 (配列番号: 258)、Fig 106 (配列番号: 267)、Fig 108 (配列番号: 269)、Fig 110 (配列番号: 271)、Fig 112 (配列番号: 273)、Fig 114 (配列番号: 275)、Fig 116 (配列番号: 277)、Fig 118 (配列番号: 279)、Fig 120 (配列番号: 281)、Fig 122 (配列番号: 286)、Fig 124 (配列番号: 293)、Fig 126 (配列番号: 295) 又は Fig 128 (配列番号: 297) に示すポリペプチドの細胞外ドメインをコードし、その関連シグナルペプチドを欠くヌクレオチド配列;

10

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42】

(a) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 12)、Fig 6 (配列番号: 14)、Fig 8 (配列番号: 19)、Fig 10 (配列番号: 21)、Fig 12 (配列番号: 26)、Fig 14 (配列番号: 31)、Fig 16 (配列番号: 36)、Fig 18 (配列番号: 41)、Fig 20 (配列番号: 46)、Fig 22 (配列番号: 51)、Fig 24 (配列番号: 57)、Fig 26 (配列番号: 62)、Fig 28 (配列番号: 67)、Fig 30 (配列番号: 72)、Fig 32 (配列番号: 80)、Fig 34 (配列番号: 87)、Fig 36 (配列番号: 92)、Fig 38 (配列番号: 102)、Fig 40 (配列番号: 107)、Fig 42 (配列番号: 112)、Fig 44 (配列番号: 117)、Fig 46 (配列番号: 124)、Fig 48 (配列番号: 134)、Fig 50 (配列番号: 140)、Fig 52 (配列番号: 142)、Fig 54 (配列番号: 144)、Fig 56 (配列番号: 146)、Fig 58 (配列番号: 148)、Fig 60 (配列番号: 150)、Fig 62 (配列番号: 152)、Fig 64 (配列番号: 157)、Fig 66 (配列番号: 159)、Fig 68 (配列番号: 161)、Fig 70 (配列番号: 163)、Fig 72 (配列番号: 168)、Fig 74 (配列番号: 170)、Fig 76 (配列番号: 178)、Fig 78 (配列番号: 180)、Fig 80 (配列番号: 185)、Fig 82 (配列番号: 187)、Fig 84 (配列番号: 189)、Fig 86 (配列番号: 191)、Fig 88 (配列番号: 193)、Fig 90 (配列番号: 229)、Fig 92 (配列番号: 231)、Fig 94 (配列番号: 233)、Fig 96 (配列番号: 241)、Fig 98 (配列番号: 249)、Fig 100 (配列番号: 251)、Fig 102 (配列番号: 256)、Fig 104 (配列番号: 258)、Fig 106 (配列番号: 267)、Fig 108 (配列番号: 269)、Fig 110 (配列番号: 271)、Fig 112 (配列番号: 273)、Fig 114 (配列番号: 275)、Fig 116 (配列番号: 277)、Fig 118 (配列番号: 279)、Fig 120 (配列番号: 281)、Fig 122 (配列番号: 286)、Fig 124 (配列番号: 293)、Fig 126 (配列番号: 295) 又は Fig 128 (配列番号: 297) に示され、その関連シグナルペプチドを欠くポリペプチド;

20

30

40

(b) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 12)、Fig 6 (配列番号: 14)、Fig 8 (配列番号: 19)、Fig 10 (配列番号: 21)、Fig 12 (配列番号: 26)、Fig 14 (配列番号: 31)、Fig 16 (配列番号: 36)、Fig 18 (配列番号: 41)、Fig 20 (配列番号: 46)、Fig 22 (配列番号: 51)

50

1)、Fig 24 (配列番号: 57)、Fig 26 (配列番号: 62)、Fig 28 (配列番号: 67)、Fig 30 (配列番号: 72)、Fig 32 (配列番号: 80)、Fig 34 (配列番号: 87)、Fig 36 (配列番号: 92)、Fig 38 (配列番号: 102)、Fig 40 (配列番号: 107)、Fig 42 (配列番号: 112)、Fig 44 (配列番号: 117)、Fig 46 (配列番号: 124)、Fig 48 (配列番号: 134)、Fig 50 (配列番号: 140)、Fig 52 (配列番号: 142)、Fig 54 (配列番号: 144)、Fig 56 (配列番号: 146)、Fig 58 (配列番号: 148)、Fig 60 (配列番号: 150)、Fig 62 (配列番号: 152)、Fig 64 (配列番号: 157)、Fig 66 (配列番号: 159)、Fig 68 (配列番号: 161)、Fig 70 (配列番号: 163)、Fig 72 (配列番号: 168)、Fig 74 (配列番号: 170)、Fig 76 (配列番号: 178)、Fig 78 (配列番号: 180)、Fig 80 (配列番号: 185)、Fig 82 (配列番号: 187)、Fig 84 (配列番号: 189)、Fig 86 (配列番号: 191)、Fig 88 (配列番号: 193)、Fig 90 (配列番号: 229)、Fig 92 (配列番号: 231)、Fig 94 (配列番号: 233)、Fig 96 (配列番号: 241)、Fig 98 (配列番号: 249)、Fig 100 (配列番号: 251)、Fig 102 (配列番号: 256)、Fig 104 (配列番号: 258)、Fig 106 (配列番号: 267)、Fig 108 (配列番号: 269)、Fig 110 (配列番号: 271)、Fig 112 (配列番号: 273)、Fig 114 (配列番号: 275)、Fig 116 (配列番号: 277)、Fig 118 (配列番号: 279)、Fig 120 (配列番号: 281)、Fig 122 (配列番号: 286)、Fig 124 (配列番号: 293)、Fig 126 (配列番号: 295) 又は Fig 128 (配列番号: 297) に示され、その関連シグナルペプチドを伴うポリペプチドの細胞外ドメイン; 又は

(c) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 12)、Fig 6 (配列番号: 14)、Fig 8 (配列番号: 19)、Fig 10 (配列番号: 21)、Fig 12 (配列番号: 26)、Fig 14 (配列番号: 31)、Fig 16 (配列番号: 36)、Fig 18 (配列番号: 41)、Fig 20 (配列番号: 46)、Fig 22 (配列番号: 51)、Fig 24 (配列番号: 57)、Fig 26 (配列番号: 62)、Fig 28 (配列番号: 67)、Fig 30 (配列番号: 72)、Fig 32 (配列番号: 80)、Fig 34 (配列番号: 87)、Fig 36 (配列番号: 92)、Fig 38 (配列番号: 102)、Fig 40 (配列番号: 107)、Fig 42 (配列番号: 112)、Fig 44 (配列番号: 117)、Fig 46 (配列番号: 124)、Fig 48 (配列番号: 134)、Fig 50 (配列番号: 140)、Fig 52 (配列番号: 142)、Fig 54 (配列番号: 144)、Fig 56 (配列番号: 146)、Fig 58 (配列番号: 148)、Fig 60 (配列番号: 150)、Fig 62 (配列番号: 152)、Fig 64 (配列番号: 157)、Fig 66 (配列番号: 159)、Fig 68 (配列番号: 161)、Fig 70 (配列番号: 163)、Fig 72 (配列番号: 168)、Fig 74 (配列番号: 170)、Fig 76 (配列番号: 178)、Fig 78 (配列番号: 180)、Fig 80 (配列番号: 185)、Fig 82 (配列番号: 187)、Fig 84 (配列番号: 189)、Fig 86 (配列番号: 191)、Fig 88 (配列番号: 193)、Fig 90 (配列番号: 229)、Fig 92 (配列番号: 231)、Fig 94 (配列番号: 233)、Fig 96 (配列番号: 241)、Fig 98 (配列番号: 249)、Fig 100 (配列番号: 251)、Fig 102 (配列番号: 256)、Fig 104 (配列番号: 258)、Fig 106 (配列番号: 267)、Fig 108 (配列番号: 269)、Fig 110 (配列番号: 271)、Fig 112 (配列番号: 273)、Fig 114 (配列番号: 275)、Fig 116 (配列番号: 277)、Fig 118 (配列番号: 279)、Fig 120 (配列番号: 281)、Fig 122 (配列番号: 286)、Fig 124 (配列番号: 293)、Fig 126 (配列番号: 295) 又は Fig 128 (配列番号: 297) に示され、その関連シグナルペプチドを欠くポリペプチドの細胞外ドメイン;

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43】

PBMC細胞をPRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリペプチドの有効量と接触させ、コントロールレベルからの増殖の変化を測定することを含んでなるT細胞の増殖に影響を及ぼす方法。 10

【請求項44】

PRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリペプチドの有効量を試験動物に注入し、得られた血管透過性の度合いを測定することを含んでなる血管透過性に影響を及ぼす方法。 20 30

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は免疫関連疾患の診断と治療のための組成物と方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

免疫関連及び炎症疾患は、正常な生理機能では、発作又は傷害に反応して、発作又は傷害から修復を開始し、外来生物体に対する生得及び後天的防御を開始するのに重要な、かなり複合化し、多くの場合は多重に相互に関連した生物学的経路の現れ又は結果である。疾患又は病理は、これらの正常な生理学的経路が、反応の強さに直接関連してか、異常な調節又は過度な刺激の結果として、自己に対する反応として、又はこれらの組合せとして、さらなる発作又は傷害を引き起こすときに生じる。 40

これらの疾患の発生は、多くの場合、多段階経路、及び多くの生物学的システム／経路、に関与しており、一又は複数のこれらの経路の重要点における介在により改善又は治療効果を有し得る。治療的介在は有害なプロセス／経路、又は有益なプロセス／経路の刺激のいずれかにより生じる。

【0003】

多くの免疫関連疾患が知られており、広範囲にわたって研究されている。このような疾患には、免疫媒介炎症疾患、非免疫媒介炎症疾患、感染疾患、免疫欠損症、異常増殖等が含 50

まれる。

Tリンパ球（T細胞）は哺乳動物の免疫反応の重要な成分である。主要組織適合性複合体（MHC）内の遺伝子によりコードされる自己分子と結合する抗原を認識する。抗原は抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片の表面上のMHC分子と共に示され得る。T細胞系は宿主哺乳動物の健康を脅かすこれらの改変細胞を除去するものである。T細胞はヘルパーT細胞及び細胞障害性T細胞を含む。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上の抗原-MHC複合体の認識に続いて広範囲に増殖する。またヘルパーT細胞は種々のサイトカイン、例えばリンホカインを分泌し、これはB細胞、細胞障害性T細胞、及び免疫反応に寄与している種々の他の細胞の活性化において中心的な役割を担っている。

#### 【0004】

体液及び細胞媒介性の免疫反応の双方における中心的事象は、ヘルパーT細胞の活性化及びクローン増殖である。ヘルパーT細胞の活性化は、抗原提示細胞の表面におけるT細胞レセプター（TCR）-CD3複合体と抗原-MHCとの相互作用により開始される。この相互作用は休止ヘルパーT細胞が細胞サイクル（G0からG1転移）に入るのを誘発する生化学的事象のカスケードを媒介し、結果として、IL-2と、時々IL-4とに対する高親和性レセプターが発現する。活性化されたT細胞は増殖及び記憶細胞とエフェクター細胞への分化のサイクルを通して進行する。

TCRを通して媒介されたシグナルに加えて、T細胞の活性化は、抗原提示細胞により放出されるサイトカイン、又は抗原提示細胞とT細胞上の膜結合性分子との相互作用により誘発される付加的な同時刺激に關与している。サイトカインIL-1及びIL-6は同時刺激シグナルを提供することが示されている。また、抗原提示細胞の表面で発現したB7分子とT細胞表面で発現したCD28及びCTLA-4分子との相互作用により細胞の活性化がなされる。活性化されたT細胞は増加した数の細胞付着分子、例えばICAM-1、インテグリン、VLA-4、LFA-1、CD56等を発現する。

#### 【0005】

混合リンパ球培養又は混合リンパ球反応（MLR）におけるT細胞増殖は、化合物が免疫系を刺激する能力の確立された指標である。多くの免疫反応において、炎症細胞は傷害又は感染部位に浸潤する。移動細胞は、影響を受けた組織の組織学的検査により決定可能な好中球、好酸球、単球又はリンパ球でありうる。Current Protocols in Immunology, 編集 John. E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc. 参照。

免疫関連疾患は免疫反応を抑制することにより治療することができる。免疫刺激活性を有する分子を阻害する中和抗体を使用することは、免疫媒介及び炎症疾患の治療に有用である。免疫反応を阻害する分子は免疫反応の阻害に有用であり（タンパク質を直接、又は抗体アゴニストの使用を介して）、よって免疫関連疾患を改善する。

#### 【0006】

（発明の概要）

本発明は、ヒトを含む哺乳動物における免疫関連疾患の診断と治療のための組成物と方法に關する。本発明は、哺乳動物における免疫反応を刺激又は阻害するタンパク質（アゴニスト及びアンタゴニスト抗体を含む）の同定に基づく。免疫関連疾患は免疫反応を阻害又は増強することで治療することができる。免疫反応増強が有益である場合には、免疫反応を刺激する分子は治療に使用可能である。また、免疫反応の抑制が重要である場合には、このような刺激分子は阻害されうる。

中和抗体は、免疫刺激活性を有する分子を阻害する分子の例であり、免疫関連及び炎症疾患の治療に役立つ。また、免疫反応を阻害する分子は免疫反応の阻害に（タンパク質を直接又は抗体アゴニストの使用を経て）利用されうるし、こうして免疫関連疾患は改善する。

#### 【0007】

従って、PROポリペプチド及び抗-PRO抗体及びそれらの断片は、免疫関連疾患の診断及び／又は治療（予防を含む）に役立つ。刺激タンパク質に結合する抗体は免疫システ

10

20

30

40

50

ム及び免疫反応の阻害に利用可能である。阻害タンパク質に結合する抗体は免疫システム及び免疫反応の刺激に有用である。また、PROポリペプチド及び抗PRO抗体は免疫関連及び炎症疾患の治療のための薬や薬剤の調製に有用である。

一実施態様において、本発明はPROポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。

一態様において、単離された核酸分子は、(a)ここに開示された全長アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、シグナルペプチドを伴うか伴わないここに開示された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た全長アミノ酸配列の任意の他の特に定められた断片を有するPROポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の補体に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、又は少なくとも約81%の核酸配列同一性、又は少なくとも約82%の核酸配列同一性、又は少なくとも約83%の核酸配列同一性、又は少なくとも約84%の核酸配列同一性、又は少なくとも約85%の核酸配列同一性、又は少なくとも約86%の核酸配列同一性、又は少なくとも約87%の核酸配列同一性、又は少なくとも約88%の核酸配列同一性、又は少なくとも約89%の核酸配列同一性、又は少なくとも約90%の核酸配列同一性、又は少なくとも約91%の核酸配列同一性、又は少なくとも約92%の核酸配列同一性、又は少なくとも約93%の核酸配列同一性、又は少なくとも約94%の核酸配列同一性、又は少なくとも約95%の核酸配列同一性、又は少なくとも約96%の核酸配列同一性、又は少なくとも約97%の核酸配列同一性、又は少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、又は少なくとも約99%の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含んでなる。

#### 【0008】

他の態様において、単離された核酸分子は、(a)ここに開示されたPROポリペプチドcDNAのコード配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くPROポリペプチドのコード配列、シグナルペプチドを伴うか伴わないここに開示した膜貫通PROポリペプチドの細胞外ドメインのコード配列、又はここに開示された全長アミノ酸配列の任意の他の特に定められた断片のコード配列を含むDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の補体に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、又は少なくとも約81%の核酸配列同一性、又は少なくとも約82%の核酸配列同一性、又は少なくとも約83%の核酸配列同一性、又は少なくとも約84%の核酸配列同一性、又は少なくとも約85%の核酸配列同一性、又は少なくとも約86%の核酸配列同一性、又は少なくとも約87%の核酸配列同一性、又は少なくとも約88%の核酸配列同一性、又は少なくとも約89%の核酸配列同一性、又は少なくとも約90%の核酸配列同一性、又は少なくとも約91%の核酸配列同一性、又は少なくとも約92%の核酸配列同一性、又は少なくとも約93%の核酸配列同一性、又は少なくとも約94%の核酸配列同一性、又は少なくとも約95%の核酸配列同一性、又は少なくとも約96%の核酸配列同一性、又は少なくとも約97%の核酸配列同一性、又は少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、又は少なくとも約99%の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含んでなる。

さらなる態様では、本発明は、(a)ここに開示されたATTCに寄託されたヒトタンパク質cDNAの任意のものによりコードされる同じ成熟ポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の補体に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、又は少なくとも約81%の核酸配列同一性、又は少なくとも約82%の核酸配列同一性、又は少なくとも約83%の核酸配列同一性、又は少なくとも約84%の核酸配列同一性、又は少なくとも約85%の核酸配列同一性、又は少なくとも約86%の核酸配列同一性、又は少なくとも約87%の核酸配列同一性、又は少なくとも約88%の核酸配列同一性、又は少なくとも約89%の核酸配列同一性、又は少なくとも約90%の核酸配列同一性、又は少なくとも約91%の核酸配列同一性、又は少なくとも約92%の核酸配列同一性、又は少なくとも約93%の核酸配列同一性、又は少なくとも約94%の核酸配列同一性、又は少なくとも約95%の核酸配列同一性、又は少なくとも約96%の核酸配列同一性、又は少なくとも約97%の核酸配列同一性、又は少なくとも約98%の核酸配列同

一性、そして、又は少なくとも約 99 % の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子に関する。

#### 【0009】

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインが欠失されているか膜貫通ドメインが不活性化されている P R O ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子を提供し、またはそのようなコード化ヌクレオチド配列に相補的であり、ここでそのようなポリペプチドの膜貫通ドメインがここに開示される。従って、ここに記載された P R O ポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考慮される。

他の実施態様は、P R O ポリペプチドコード配列の断片、又はその補体に向けられ、それらは、例えば、場合によっては抗-P R O 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 P R O ポリペプチドの断片をコードする、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。そのような核酸断片は通常少なくとも約 20 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 30 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 40 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 50 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 60 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 70 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 80 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 90 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 100 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 110 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 120 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 130 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 140 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 150 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 160 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 170 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 180 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 190 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 200 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 250 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 300 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 350 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 400 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 450 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 500 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 600 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 700 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 800 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 900 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 1000 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 1500 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 2000 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 2500 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 3000 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 4000 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 5000 のヌクレオチド長、又はそれ以上であり、ここで、「約」という用語は、その参照長のプラス又はマイナス 10 % の参照ヌクレオチド配列長を意味する。それぞれの P R O 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、多くのよ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使用して、それぞれの P R O ポリペプチドコードヌクレオチド配列を他の既知のヌクレオチド配列にアラインメントさせ、どのヌクレオチド配列断片（類）が新規であるかを決定することにより常套的方法により決定することができることに留意される。そのようなそれぞれの P R O ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の全てがここで考慮される。また考慮されるものは、これらのヌクレオチド分子によりコードされる P R O ポリペプチド断片、好ましくは抗-P R O ポリペプチド抗体に対する結合部位を含んでなるそれらのポリペプチド断片である。

#### 【0010】

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 P R O ポリペプチドを提供する。

或る態様では、本発明は、ここに開示された全長アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを伴うか伴わない膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示された全長アミノ酸配列の任意の他の特に定められた断片を有する P R O 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、又は少なくとも約 81 % のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 82 % のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 83 % のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 84 % のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 85 % のアミノ酸配列同一性、又は少

なくとも約 86% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 87% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 88% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 89% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 90% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 91% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 92% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 93% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 94% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 95% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 96% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 97% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 98% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 99% のアミノ酸配列同一性を有しているアミノ酸配列を含んでなる単離された P R O ポリペプチドに関する。

さらなる態様では、本発明は、ここに開示された A T T C に寄託されたヒトタンパク質 c D N A の任意のものによりコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約 80% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 81% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 82% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 83% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 84% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 85% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 86% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 87% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 88% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 89% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 90% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 91% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 92% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 93% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 94% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 95% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 96% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 97% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 98% のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 99% のアミノ酸配列同一性を有しているアミノ酸配列を含んでなる単離された P R O ポリペプチドに関する。

10

20

30

40

50

#### 【0011】

さらなる態様では、本発明は、ここに開示された全長アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く全長アミノ酸配列、シグナルペプチドを伴うか伴わないここに開示した膜貫通タンパク質の細胞外ドメインのコード配列、又はここに開示された全長アミノ酸配列の任意の他の特に定められた断片を有する P R O ポリペプチドのアミノ酸配列と比較したとき、少なくとも約 80% のポジティブ、又は少なくとも約 81% のポジティブ、又は少なくとも約 82% のポジティブ、又は少なくとも約 83% のポジティブ、又は少なくとも約 84% のポジティブ、又は少なくとも約 85% のポジティブ、又は少なくとも約 86% のポジティブ、又は少なくとも約 87% のポジティブ、又は少なくとも約 88% のポジティブ、又は少なくとも約 89% のポジティブ、又は少なくとも約 90% のポジティブ、又は少なくとも約 91% のポジティブ、又は少なくとも約 92% のポジティブ、又は少なくとも約 93% のポジティブ、又は少なくとも約 94% のポジティブ、又は少なくとも約 95% のポジティブ、又は少なくとも約 96% のポジティブ、又は少なくとも約 97% のポジティブ、又は少なくとも約 98% のポジティブ、又は少なくとも約 99% のポジティブのスコアを示すアミノ酸配列を含んでなる単離された P R O ポリペプチドに関する。

特定の態様では、本発明は、N 末端シグナル配列及び／又は開始メチオニンを持たない単離された P R O ポリペプチドを提供し、それは上述したそのようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によりコードされる。これを生産する方法もまたここに記載され、ここで、これらの方法は P R O ポリペプチドの発現に適した条件下で適当なコード化核酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞を培養し、細胞培地から P R O ポリペプチドを回収することを含んでなる。

他の態様では、本発明は、膜貫通ドメインが欠失されたか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。これを生産する方法もまたここに記載され、ここで、これらの方法は P R O ポリペプチドの発現に適した条件下で適当なコード化核酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞を培養し、細胞培地から P R O ポリペプチドを回収することを含んでなる。

## 【0012】

他の実施態様では、本発明は、PROポリペプチドの任意のものをコードするDNAを含んでなるベクターを提供する。任意のこのようなベクターを含んでなる宿主細胞もまた提供される。例を挙げると、宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又は酵母でありうる。ここに記載のポリペプチドの任意のものを生産するための方法が更に提供され、これは、所望のポリペプチドの発現に適した条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養から所望のポリペプチドを回収することを含んでなる。

他の実施態様では、本発明は、異種性ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したここに記載のポリペプチドの任意のもの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、免疫グロブリンのFc領域又はエピトープタグ配列に融合したここに記載のポリペプチドの任意のものが含まれる。

さらに他の実施態様では、本発明は、アンチセンスプローブとして、又はゲノム及びcDNAヌクレオチド配列を単離するために有用なオリゴヌクレオチドプローブを提供し、ここでそれらプローブは上述の又は下記のヌクレオチド配列の任意の任意のものから誘導されうる。

## 【0013】

さらなる他の実施態様では、本発明は、PROポリペプチドの一又は複数の機能又は活性を模倣又は阻害する、PROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストに関する。特定の実施態様では、アゴニスト又はアンタゴニストは、PROポリペプチド又は小分子に結合する抗体である。

他の実施態様では、本発明は上述の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、抗体断片又は単鎖抗体である。一態様では、本発明は、PROポリペプチドに結合する単離された抗体に関する。他の態様では、抗体はPROポリペプチドの活性を模倣し（アゴニスト抗体）、又は逆に抗体はPROポリペプチドの活性を阻害又は中和する（アンタゴニスト抗体）。他の態様では、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、モノクローナル抗体、単鎖抗体、又は抗-イディオタイプ抗体である。

さらなる実施態様では、本発明は、PROポリペプチドを候補分子と接触させ、前記PROポリペプチドによって媒介される生物学的活性を監視することによる、PROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストの同定方法に関する。

## 【0014】

他の実施態様では、本発明は、担体又は賦形剤との混合物においてポリペプチドと結合するPROポリペプチド又はアゴニスト又はアンタゴニスト抗体を含む組成物に関する。一態様では、組成物は治療に有効な量のペプチド又は抗体を含む。他の態様では、組成物が免疫刺激分子を含むとき、組成物は：（a）その必要とする哺乳動物の組織への炎症細胞の浸潤を増大させ、（b）その必要とする哺乳動物における免疫反応を刺激又は増強し、又は（c）抗原に反応してその必要とする哺乳動物におけるT-リンパ球の増殖を増加させるのに役立つ。さらなる態様では、組成物が免疫阻害分子を含むとき、組成物は：（a）その必要とする哺乳動物の組織への炎症細胞の浸潤を減少させ、（b）その必要とする哺乳動物における免疫反応を阻害又は低減させ、又は（c）抗原に反応してその必要とする哺乳動物におけるT-リンパ球の増殖を減少させるのに役立つ。他の態様では、組成物はさらなる活性成分を含み、それは例えばさらなる抗体又は細胞毒又は化学療法剤であり得る。好ましくは、組成物は滅菌される。

他の実施態様では、本発明は、上述の用途を有する組成物又は医薬品の調製のための、本発明のPROポリペプチド及び抗体の使用に関する。

さらなる実施態様では、本発明は、抗-PRO200、抗-PRO204、抗-PRO212、抗-PRO216、抗-PRO226、抗-PRO240、抗-PRO235、抗-PRO245、抗-PRO172、抗-PRO273、抗-PRO272、抗-PRO

10

20

30

40

50



332、抗-PRO526、抗-PRO701、抗-PRO361、抗-PRO362、  
抗-PRO363、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO531、抗-PRO533、抗-PRO1083、抗-PRO865、抗-PRO770、抗-PRO769、抗-PRO788、抗-PRO1114、抗-PRO1007、抗-PRO1184、  
抗-PRO1031、抗-PRO1346、抗-PRO1155、抗-PRO1250、  
抗-PRO1312、抗-PRO1192、抗-PRO1246、抗-PRO1283、  
抗-PRO1195、抗-PRO1343、抗-PRO1418、抗-PRO1387、  
抗-PRO1410、抗-PRO1917、抗-PRO1868、抗-PRO205、  
抗-PRO21、抗-PRO269、抗-PRO344、抗-PRO333、抗-PRO381、  
抗-PRO720、抗-PRO866、抗-PRO840、抗-PRO982、  
抗-PRO836、抗-PRO1159、抗-PRO1358、抗-PRO1325、抗-PRO1338、  
抗-PRO1434、抗-PRO4333、抗-PRO4302、抗-PRO4430又は抗-PRO5727抗体をコードする核酸、及びそのような核酸を構成するベクターや組み換え宿主細胞に関する。またさらなる実施態様では、本発明は、抗体が発現するような条件下で、抗体をコードする核酸を使って形質転換された宿主細胞を培養し、細胞媒地から抗体を回収することにより、そのような抗体を生産する方法に関する。

#### 【0015】

さらなる実施態様では、本発明は、PROポリペプチドをコードする核酸分子、又はその補体にハイブリッド形成する単離された核酸分子に関する。この核酸は好ましくはDNAであり、ハイブリッド形成は好ましくは緊縮条件下で起こる。このような核酸分子は、ここに同定される増幅遺伝子のアンチセンス分子として作用でき、翻って、対応する増幅遺伝子の変調において、又は増幅反応のアンチセンスプライマーとしての用途が見いだされる。さらに、このような配列はリボザイム及び／又はトリプルヘリックス配列の一部として燃使用でき、翻って、増幅遺伝子の調節で使用することもできる。

他の実施態様では、本発明は、ポリペプチドを含有及び／又はそれを発現すると疑われる細胞を、抗-PRO200、抗-PRO204、抗-PRO212、抗-PRO216、抗-PRO226、抗-PRO240、抗-PRO235、抗-PRO245、抗-PRO172、抗-PRO273、抗-PRO272、抗-PRO332、抗-PRO526、抗-PRO701、抗-PRO361、抗-PRO362、抗-PRO363、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO531、抗-PRO533、抗-PRO1083、抗-PRO865、抗-PRO770、抗-PRO769、抗-PRO788、抗-PRO1114、抗-PRO1007、抗-PRO1184、抗-PRO1031、抗-PRO1346、抗-PRO1155、抗-PRO1250、抗-PRO1312、抗-PRO1192、抗-PRO1246、抗-PRO1283、抗-PRO1195、抗-PRO1343、抗-PRO1418、抗-PRO1387、抗-PRO1410、抗-PRO1917、抗-PRO1868、抗-PRO205、抗-PRO21、抗-PRO269、抗-PRO344、抗-PRO333、抗-PRO381、抗-PRO720、抗-PRO866、抗-PRO840、抗-PRO982、抗-PRO836、抗-PRO1159、抗-PRO1358、抗-PRO1325、抗-PRO1338、抗-PRO1434、抗-PRO4333、抗-PRO4302、抗-PRO4430又は抗-PRO5727抗体に暴露し、抗体の細胞への結合を測定することを含んでなるPROポリペプチドの存在を決定する方法に関する。

さらなる他の実施態様では、本発明は、(a)哺乳動物から得た組織細胞の試験試料における、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、PROポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含む、哺乳動物における免疫関連疾患の診断方法に関し、ここで、対照試料と比較して試験試料の発現レベルが高い又は低いと、試験組織細胞を得た哺乳動物に免疫関連疾患が存在することを示す。

#### 【0016】

他の実施態様では、本発明は(a)抗-PROポリペプチド抗体を哺乳動物から得た組織

細胞の試験試料に接触させ、(b) 試験試料中でのそれぞれのPROポリペプチドと抗体との複合体形成を検出することを含む哺乳動物における免疫関連疾患の診断方法に関し、ここで、該複合体の形成は、該疾患の有又は無を示す。検出は、定性的でも定量的でもよく、同じ細胞型の既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の比較において実施される。試験試料における多量の複合体形成は、試験組織細胞を得た哺乳動物における免疫疾患の有又は無を示す。抗体は、好ましくは検出可能な標識を有する。複合体形成は、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光測定、又は他のこの分野で知られた技術により監視することができる。通常、試験試料は、免疫システムに欠陥又は異常があると推測される個体から採取される。

他の実施態様では、本発明は適当なパッケージに、抗-PRO200、抗-PRO204 10  
、抗-PRO212、抗-PRO216、抗-PRO226、抗-PRO240、抗-PRO235、抗-PRO245、抗-PRO172、抗-PRO273、抗-PRO272、抗-PRO332、抗-PRO526、抗-PRO701、抗-PRO361、抗-PRO362、抗-PRO363、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO531、抗-PRO533、抗-PRO1083、抗-PRO865、抗-PRO770、抗-PRO769、抗-PRO788、抗-PRO1114、抗-PRO1007、抗-PRO1184、抗-PRO1031、抗-PRO1346、抗-PRO1155、抗-PRO1250、抗-PRO1312、抗-PRO1192、抗-PRO1246、抗-PRO1283、抗-PRO1195、抗-PRO1343、抗-PRO1418、抗-PRO1387、抗-PRO1410、抗-PRO1917、抗-PRO1868、抗- 20  
PRO205、抗-PRO21、抗-PRO269、抗-PRO344、抗-PRO333、抗-PRO381、抗-PRO720、抗-PRO866、抗-PRO840、抗-PRO982、抗-PRO836、抗-PRO1159、抗-PRO1358、抗-PRO1325、抗-PRO1338、抗-PRO1434、抗-PRO4333、抗-PRO4302、抗-PRO4430又は抗-PRO5727抗体と(例えば緩衝剤のような)担体を含んでなる診断キットに関する。好ましくはキットはPROポリペプチドを検出するための抗体を使用するための説明書を含む。

#### 【0017】

さらなる実施態様では、本発明は：

容器；

30

容器上の説明書；及び

容器内に収容された活性剤を含む組成物；

を含んでなる製造品に関し；ここでその組成物は哺乳類における免疫反応の刺激又は阻害に効果があり、容器上の説明書は組成物が免疫関連疾患の治療に使用されうること示しており、組成物中の活性剤はPROポリペプチドの発現及び／又は活性を刺激又は阻害する薬剤である。好ましい態様では、活性剤は、PRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO 40  
788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリペプチド、又は抗-PRO200、抗-PRO204、抗-PRO212、抗-PRO216、抗-PRO226、抗-PRO240、抗-PRO235、抗-PRO245、抗-PRO172、抗-PRO273、抗-PRO 50

272、抗-PRO332、抗-PRO526、抗-PRO701、抗-PRO361、  
抗-PRO362、抗-PRO363、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO531、  
抗-PRO533、抗-PRO1083、抗-PRO865、抗-PRO770、抗-PRO769、  
抗-PRO788、抗-PRO1114、抗-PRO1007、抗-PRO1184、抗-PRO1031、  
抗-PRO1346、抗-PRO1155、抗-PRO1250、抗-PRO1312、抗-PRO1192、  
抗-PRO1246、抗-PRO1283、抗-PRO1195、抗-PRO1343、抗-PRO1418、  
抗-PRO1387、抗-PRO1410、抗-PRO1917、抗-PRO1868、抗-PRO205、  
抗-PRO21、抗-PRO269、抗-PRO344、抗-PRO333、抗-PRO381、  
抗-PRO720、抗-PRO866、抗-PRO840、抗-PRO982、抗-PRO836、  
抗-PRO1159、抗-PRO1358、抗-PRO1325、抗-PRO1338、抗-PRO1434、  
抗-PRO4333、抗-PRO4302、抗-PRO4430又は抗-PRO5727抗体である。 10

#### 【0018】

さらなる実施態様は、PROポリペプチドに候補化合物を、これら2つの成分を互いに作用させるのに十分な時間と状況の下で接触させることにより、PROポリペプチドの発現及び／又は活性を阻害可能な化合物を同定する方法である。特定の態様では、候補化合物又はPROポリペプチドのどちらかは固体支持体上に固定される。他の態様では、非固定成分は検出標識を保有する。

本発明の他の実施態様は、PROポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニスト又は抗-PRO抗体に応答性のある症状の治療に有用な医薬品の調製のための、ここに記載されたPROポリペプチド、又はそのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-PRO抗体の使用に向けられる。 20

#### 【0019】

(好適な実施態様の詳細な説明)

##### I. 定義

ここで使用される際の「PROポリペプチド(類)」及び「PRO」という用語は、直後に数値符号がある場合に種々のポリペプチドを指し、完全な符号(例えば、PRO/数字、すなわち特に、PRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727)は、ここに記載する特定のポリペプチド配列を称する。「PRO/数字ポリペプチド」及び「PRO/数字」であって、「数字」がここで使用される実際の数値符号として与えられる用語は、天然配列ポリペプチド及びポリペプチド変異体(ここで更に定義する)を含む。ここに記載されるPROポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、組換え又は合成方法によって調製してもよい。 30

「天然配列PROポリペプチド(類)」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/数字ポリペプチドは、天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(類)」という用語には、特に、特定のPRO/数字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 40 50

）、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、ここで記載の天然配列 P R O 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、図において太字又は下線で示す。しかし、添付の図面に開示した P R O / 数字ポリペプチドは、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 P R O 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。

「P R O ポリペプチド（類）細胞外ドメイン」又は「E C D」は、膜貫通及び細胞質ドメインを本質的に有しない前記ポリペプチドの形態を称する。通常、P R O ポリペプチド E C D 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 P R O 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、ここで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と思われる。よって、P R O ポリペプチド細胞外ドメインは、場合によっては、実施例又は明細書で同定されるように膜貫通ドメイン／細胞外ドメインの境界のいずれかの側から約 5 又はそれ未満の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、そのような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。

10

20

#### 【0020】

ここに開示する種々の P R O / 数字 P R O ポリペプチドの「シグナルペプチド」の適切な位置は、本明細書及び添付の図面に示す。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 アミノ酸以下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当該技術において日常的に使用される基準に従って同定しうる（例えば、N i e l s e n 等, P r o t . E n g . 10 : 1 - 6 ( 1997 ) 及び v o n H e i n j e 等, N u c l . A c i d s . R e s . 14 : 4683 - 4690 ( 1986 ) ）。さらに、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナルペプチドの切断は完全に均一ではなく、一以上の分泌種をも

30

たらすことも認められる。シグナルペプチドがここに同定されるシグナルペプチドの C - 末端境界のいずれかの側の約 5 アミノ酸以下の範囲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。

「P R O ポリペプチド変異体」、「P R O / 数字変異体」又は「P R O 変異体」とは、ここに（例えば以下に）定義されるように、ここに開示される全長天然配列 P R O ポリペプチド、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く P R O ポリペプチド配列、シグナルペプチドを伴うか伴わないここに開示された P R O の細胞外ドメイン又はここに開示された全長 P R O 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 P R O ポリペプチドを意味する。このような P R O 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

40

50

少なくとも約 90 % のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 91 % のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 92 % のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 93 % のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 94 % のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 95 % のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 96 % のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 97 % のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 98 % のアミノ酸配列同一性、そして、又は少なくとも約 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、又は少なくとも約 20 アミノ酸長、又は少なくとも約 30 アミノ酸長、又は少なくとも約 40 アミノ酸長、又は少なくとも約 50 アミノ酸長、又は少なくとも約 60 アミノ酸長、又は少なくとも約 70 アミノ酸長、又は少なくとも約 80 アミノ酸長、又は少なくとも約 90 アミノ酸長、又は少なくとも約 100 アミノ酸長、又は少なくとも約 150 アミノ酸長、又は少なくとも約 200 アミノ酸長、又は少なくとも約 300 アミノ酸長、又は少なくとも約 400 アミノ酸長、又は少なくとも約 500 アミノ酸長、又は少なくとも約 600 アミノ酸長、又は少なくとも約 700 アミノ酸長、又は少なくとも約 800 アミノ酸長、又は少なくとも約 900 アミノ酸長、又は少なくとも約 1000 アミノ酸長、又は少なくとも約 1200 アミノ酸長、又は少なくとも約 1400 アミノ酸長、又は少なくとも約 1500 アミノ酸長、又はそれ以上である。

#### 【0021】

ここで同定されている PRO ポリペプチド配列に対して「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、特定の PRO / 数字ポリペプチド配列における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 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、アライメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、% アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2 プログラム用の完全なソースコードが以下の表 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、以下の表 1 に示したソースコードは米国著作権庁, Washington D. C., 20559 に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号 TXU510087 の下で登録されている。ALIGN-2 プログラムはジェネンテック社、South San Francisco, California から公に入手可能であり、また以下の表 1 に与えたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2 プログラムは、UNIX オペレーティングシステム、好ましくはデジタル UNIX V4.0D 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。

アミノ酸配列比較に ALIGN-2 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（与えられたアミノ酸配列 B との、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 は配列アライメントプログラム ALIGN-2 の A 及び B のアライ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認識されるであろう。この方法を用いた % アミノ酸配列同一性の計算の例として、表 2 と 3 は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「PRO」と称されるアミノ酸配列に対する % アミノ酸配列同一性の計算方法を示し、ここで「PRO」とは関心ある仮の PRO

／数字ポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」とは関心ある「PRO」ポリペプチドが比較されているポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「X」、「Y」、「Z」はそれぞれ異なった仮のアミノ酸配列を表す。

#### 【0022】

特に断らない限り、ここで用いられる全ての%アミノ酸配列同一性値は、直上のパラグラフに記載したようにしてALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%アミノ酸配列同一性値は、以下に記載するように、WU-BLAST-2コンピュータプログラム(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて得ることもできる。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。WU-BLAST-2を用いた場合、%アミノ酸配列同一性値は、WU-BLAST-2により決定されるように(a)天然PROポリペプチドから誘導された配列を有する関心あるPROポリペプチドのアミノ酸配列と、関心ある比較アミノ酸配列(即ち、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、一致する同一アミノ酸残基の数を、(b)関心あるPROポリペプチドのアミノ酸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と少なくとも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を含むポリペプチド」という表現では、アミノ酸配列Aが関心ある比較アミノ酸配列であり、アミノ酸配列Bが関心あるPROポリペプチドのアミノ酸配列である。

また、パーセント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>からダウンロードしてもよく、別にNational Institute of Health, Bethesda, MDから得てもよい。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(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と認識されるであろう。

#### 【0023】

「PRO変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO変異体核酸配列」とは、下記に定義されるように、活性PROポリペプチドをコードする核酸分子でを意味し、(1)ここに開示された全長天然配列PROポリペプチド;(2)ここに開示されたシグナルペプチドを欠く全長天然配列PROポリペプチド;(3)ここに開示されたシグナルペプチドを伴うか伴わないPROポリペプチドの細胞外ドメイン又は(4)ここに開示された全長ポリペプチド配列の任意の他の断片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。通常は、PROポリペプチド変異体ポリヌクレオチドは、(1)ここに開示された全長天然配列PROポリペプチド配列、(2)ここに開示されたシグナルペ

チドを欠く全長天然配列 P R O ポリペプチド配列、(3) ここに開示されたシグナル配列を伴うか伴わない P R O ポリペプチド配列の細胞外ドメイン又は(4) ここに開示された全長 P R O ポリペプチド配列の任意の他の断片をコードする核酸配列と、少なくとも約 80 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 81 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 82 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 83 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 84 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 85 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 86 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 87 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 88 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 89 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 90 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 91 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 92 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 93 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 94 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 95 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 96 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 97 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 98 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 99 % の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。変異体は天然ヌクレオチド配列を含まない。

通常は、P R O ポリペプチド変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約 30 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 60 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 90 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 120 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 150 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 180 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 210 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 240 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 270 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 300 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 450 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 500 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 600 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 700 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 800 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 900 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 1000 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 1200 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 1400 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 1600 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 1800 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 2000 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 2500 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 3000 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 3500 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 4000 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 5000 のヌクレオチド長、又はそれ以上である。

ここで同定される P R O コード化核酸配列に対する「パーセント (%) 核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、関心ある P R O 核酸のヌクレオチド配列と同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えば B L A S T、B L A S T-2、A L I G N 又は M e g a l i g n (D N A S T A R) 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。しかし、ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、A L I G N-2 プログラム用の完全なソースコードが以下の表 1 に与えられている配列比較コンピュータプログラム A L I G N-2 を用いて得られる。A L I G N-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、以下の表 1 に示したソースコードは米国著作権庁、W a s h i n g t o n 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 T X U 510087 の下で登録されている。A L I G N-2 プログラムはジェネンテック社、S o u t h S a n F r a n c i s c o , C a l i f o r n i a から公に入手可能であり、また以下の表 1 に与えたソースコードからコンパイルしてもよい。A L I G N-2 プログラムは、U N I X オペレーティングシステム、好ましくはデジタル U N I X V 4 . 0 D 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、A L I G N-2 プログラムによって設定され変動しない。

#### 【0024】

核酸配列比較に A L I G N-2 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 (与えられた核酸配列 D との、

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

分率 $W/Z$ の100倍

ここで、 $W$ は配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアの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と認識されるであろう。%核酸配列同一性の計算の例として、表4と5は、「比較DNA」と称される核酸配列の「PRO-DNA」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法を示し、ここで「PRO-DNA」は、関心ある仮のPROポリペプチドコード化核酸配列を表し、「比較DNA」は関心ある「PRO-DNA」核酸分子が比較されている核酸分子のヌクレオチド配列を表し、「N」、「L」及び「V」はそれぞれ異なった仮のヌクレオチド配列を表す。 10

特に断らない限り、ここで用いられる全ての%核酸配列同一性値は、直上のパラグラフに記載したようにしてALIGN-2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、%核酸配列同一性値は、以下に記載するように、WU-BLAST-2コンピュータプログラム(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて得ることもできる。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。WU-BLAST-2を用いた場合、%核酸配列同一性値は、WU-BLAST-2により決定されるように(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(すなわち参照配列)を有する関心あるPROポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列と、関心ある比較核酸分子(すなわち、関心あるPROポリペプチドコード化核酸分子が比較されるPRO変異ポリヌクレオチドであってもよい配列)との間の、一致する同一ヌクレオチドの数を、(b)PRO参照配列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と少なくとも80%の核酸配列同一性を持つ又は持っている核酸配列Aを含む単離された核酸分子」という記載において、核酸配列Aは関心ある比較核酸分子であり、核酸配列Bは関心あるPROポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。 20 30

#### 【0025】

また、%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>からダウンロードしてもよく、別にNational Institute of Health, Bethesda, MDから得てもよい。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。 40

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(与えられた核酸配列Dとの、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 50



% 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と認識されるであろう。

#### 【0026】

他の実施態様では、PRO 変異体ポリヌクレオチドは、活性 PRO ポリペプチドをコードし、好ましくは緊縮性ハイブリッド形成及び洗浄条件下で、ここに開示する全長 PRO ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリッド形成可能な核酸分子である。PRO 変異体ポリペプチドは、PRO 変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

「ポジティブ（陽性）」という用語は、上記のように実施された配列比較の中で、比較された配列において同一ではないが類似の特性を有している残基（例えば、保存的置換の結果として、下記の表 6 参照）を含む。ここでの目的のために、ポジティブの % 値は、（a）天然配列 PRO ポリペプチドから誘導された配列を有する関心ある PRO ポリペプチド配列と、関心ある比較アミノ酸配列（即ち、PRO ポリペプチド配列が比較されるアミノ酸配列）との間の、WU-BLAST-2 の BLOSUM 62 マトリクス内で決定されるようにポジティブ値をスコアされるアミノ酸残基の数を、（b）関心ある PRO ポリペプチドのアミノ酸残基の総数で除した商によって決定される。

特に断らない限り、陽性の % 値は、直上のパラグラフに記載したようにして計算される。しかしながら、上述の ALIGN-2 及び NCBI-BLAST 2 について記載したように実施されるアミノ酸配列同一性比較には、同一のみならず類似した特性をもつ比較配列におけるアミノ酸残基が含まれる。関心あるアミノ酸残基に対してポジティブ値がスコアされたアミノ酸残基は、関心あるアミノ酸残基と同一であるか、又は関心あるアミノ酸残基の好ましい置換（下記の表 1 に定義）であるものである。

#### 【0027】

ALIGN-2 又は NCBI-BLAST 2 を用いたアミノ酸配列比較では、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、又はそれに対するポジティブの % 値（与えられたアミノ酸配列 B との、又はそれに対して或る程度の % ポジティブを持つ又は含む与えられたアミノ酸配列 A と言うこともできる）は次のように計算される：

分率  $X/Y$  の 100 倍

ここで、X は配列アラインメントプログラム ALIGN-2 又は NCBI-BLAST 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され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 の長さと同じでない場合、A の B に対する % ポジティブは、B の A に対する % ポジティブとは異なると認識されるであろう。

「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には、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。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、自然環境における PRO ポリペプチドの少なくとも 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。

#### 【0028】

「単離された」PRO ポリペプチドコード化核酸又は他のポリペプチドコード化核酸は、同定され、PRO ポリペプチド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。単離された PRO ポリペプチドコード化核酸分子は、天然に見出される状態あるいは設定以外のものである。ゆえに、単離された

P R Oポリペプチドコード化核酸は、天然の細胞中に存在するポリペプチドコード化核酸分子とは区別される。しかし、単離されたP R Oポリペプチドコード化核酸分子は、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特定のポリペプチドを通常発現する細胞に含まれるものを含む。

「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D N A配列を称す。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D N Aは、ポリペプチドの分泌に寄与するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのD N A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D N A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、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

#### 【0029】

ハイブリッド形成反応の「緊縮性」は、通常、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、プローブが長くなればなる程、適切なアニーリングのために温度を高くする必要がある、プローブが短くなればなる程、温度を低くする必要があるが生じる。ハイブリッド形成は、一般的に、相補的鎖がその融点より低い環境に存在する場合、変性D N Aの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリッド形成可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をより緊縮性にするが、低い温度は緊縮性を低下させる。ハイブリッド形成反応の緊縮性の更なる詳細及び説明は、Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publisher s, (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デンハート液、超音波処理サケ精子D N A (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得る。

#### 【0030】

「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の例は、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デンハート液、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ものがある。当業者であれば、プローブ長等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。

「抗体」（Abs）と「免疫グロブリン」（Igs）は、概略的に、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する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（アゴニスト、アンタゴニスト及び中和抗体を含む）、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）、PROポリペプチドに特異的なエピトープと結合する単鎖抗体、及びそれらが所望の生物活性を示す限り抗体断片もカバーする。抗-PRO200、抗-PRO204、抗-PRO212、抗-PRO216、抗-PRO226、抗-PRO240、抗-PRO235、抗-PRO245、抗-PRO172、抗-PRO273、抗-PRO272、抗-PRO332、抗-PRO526、抗-PRO701、抗-PRO361、抗-PRO362、抗-PRO363、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO531、抗-PRO533、抗-PRO1083、抗-PRO865、抗-PRO770、抗-PRO769、抗-PRO788、抗-PRO1114、抗-PRO1007、抗-PRO1184、抗-PRO1031、抗-PRO1346、抗-PRO1155、抗-PRO1250、抗-PRO1312、抗-PRO1192、抗-PRO1246、抗-PRO1283、抗-PRO1195、抗-PRO1343、抗-PRO1418、抗-PRO1387、抗-PRO1410、抗-PRO1917、抗-PRO1868、抗-PRO205、抗-PRO21、抗-PRO269、抗-PRO344、抗-PRO333、抗-PRO381、抗-PRO720、抗-PRO866、抗-PRO840、抗-PRO982、抗-PRO836、抗-PRO1159、抗-PRO1358、抗-PRO1325、抗-PRO1338、抗-PRO1434、抗-PRO4333、抗-PRO4302、抗-PRO4430又は抗-PRO5727抗体は、それぞれPRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリペプチドに免疫学的に結合する抗体である。抗体は、抗体に接触し得るPROポリペプチドの任意のドメインに結合可能である。例えば、抗体はポリペプチドの任意の細胞外ドメインに、また全ポリペプチドが分泌されたものである場合は、抗体が結合のために利用可能なポリペプチドの任意のドメインに結合可能である。

#### 【0031】

「天然抗体」及び「天然免疫グロブリン」は、通常、2つの同一の軽（L）鎖及び2つの

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

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を称する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の「高頻度可変領域」又は「相補性決定領域（CDR）」と呼ばれる3又は4のセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域（FR）と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、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CDRにより連結された $\beta$ シート配置を主にとる4又は5のFR領域をそれぞれ含んでいる。各鎖のCDRは、FRにより近接して結合せしめられ、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している（Kabat等, NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, 647-669頁[1991]を参照のこと）。CDRの範囲を決定するためには少なくとも2つの技術がある：（1）交雑種配列可変性に基づくアプローチ（すなわち、Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, MD)；及び（2）抗原-抗体複合体の結晶学的研究に基づくアプローチ（Chothia, C. 等, (1989), Nature 342: 877）。さらにまた、CDRは先の技術の両方により同定される残基を導入するハイブリッド形成アプローチを使用して決定することもできる。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。

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

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

#### 【0032】

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

またFab断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域（CH1）を有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でFab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持しているFab'に対するここでの命名である。 $F(ab')_2$ 抗体断片は、間にヒンジシステインを有するFab'

10

20

30

40

50

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（ $\kappa$ ）及びラムダ（ $\lambda$ ）と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには5つの主たるクラス：I g A、I g D、I g E、I g G及びI g Mがあり、それらのいくつかは更にサブクラス（アイソタイプ）、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3及びI g G 4、I g A及びI g A 2に分割される。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ $\alpha$ 、 $\sigma$ 、 $\varepsilon$ 、 $\gamma$ 及び $\mu$ と呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び3次元構造はよく知られている。 10

### 【0033】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能な突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。更に、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的には含む通常の（ポリクローナル）抗体と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンによって汚染されていないハイブリドーマ培養から合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、実質的に均一な抗体集団から得られていると 20  
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K o h l l e r等、N a t u r e 256, 495 [1975]により記載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C l a c k s o n等、N a t u r e 352:624-628 [1991]、及びM a r k sほか、J. M o l. B i o l. 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。また、ファージミド及びファージベクターを使用する抗体の調製について記載した米国特許第5, 750, 373号、同5, 571, 698号、同5, 403, 484号及び同5, 223, 409号を 30  
参照のこと。

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

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはそれらの断片（例えばF v、F a b、F a b'、F (a b')<sub>2</sub>あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列）であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。大部分においてヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域（C D R）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C D Rの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのF vフレームワーク領域（F R）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C D R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C D R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F R領域がヒト免疫グロブリン配列のものである、少な 50

くとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる。更なる詳細は、Jones等，Nature 321，522-525（1986）；Reichmann等，Nature 332，323-329 [1988]；及びPresta，Curr. Op. Struct. Biol. 2，593-596（1992）を参照のこと。ヒト化抗体は、抗体の抗原結合領域が、関心ある抗原でマカクザルを免疫化することにより生産された抗体から由来する「プリマタイズした（primatized）」抗体を含む。旧世界ザルの残基を含有する抗体も本発明の範疇に入れることができる。例えば、米国特許第5，658，570号；同5，693，780号；同5，681，722号；及び同5，756，096号を参照のこと。 10

#### 【0034】

本発明の抗体及びその断片には、抗体を一又は複数のCDR領域及び／又はフレームワーク領域のアミノ酸配列を変化させて、それが結合する抗原に対する抗体又はその断片の親和性を改変させた「親和成熟（affinity matured）」抗体も含まれる。親和成熟により、出発抗体と比較して抗原に対する成熟抗体の親和性が増加又は低減する結果となる。典型的には、出発抗体はヒト化、ヒト、キメラもしくはマウス抗体であり、親和成熟した抗体は出発抗体よりも高い親和性を有する。成熟プロセス中、CDR又はフレームワーク領域における一又は複数のアミノ酸残基は、任意の標準的な方法を使用して異なる残基に変えられる。適切な方法には、よく知られているカセット突然変異法（Well 20 11等，1985，Gene 34：315）又はオリゴヌクレオチド媒介突然変異法（Zoller等，1987，Nucl. Acids Res.，10：6487-6504）を使用する点突然変異が含まれる。また親和成熟は、多くの変異体を産出し、所望の親和性を有する変異体を抗原又はリガンドに対する改善された親和性に基づき、変異体のライブラリ又はプールから選択する、既知の選択法を使用して実施することもできる。既知のファージライブラリ技術をこのアプローチ法で簡便に使用することができる。例えば米国特許第5，750，373号、米国特許第5，223，409号等を参照のこと。

ヒト抗体は本発明の抗体の範囲に入る。ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリ [Hoogenboom及びWinter，J. Mol. Biol.，227：381（1992）；Marks等，J. Mol. Biol.，222：581（1991）] 20 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。また、Cole等及びBoerner等の技術も、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）；Boerner等，J. Immunol.，147（1）：86-95（1991）；米国特許第5，750，373号]。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体 40 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 Biotechnology 14，845-51（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。 50

「単鎖Fv」又は「sFv」抗体断片は、抗体のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインを含み、これらのドメインは単一の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V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それはsFvが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。sFvの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

用語「ダイアボディ(diabodies)」は、二つの抗原結合部位を持つ小型の抗体断片を指し、その断片は同じポリペプチド鎖(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)内で軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)に結合した重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)を含む。同じ鎖の二つのドメイン間に対形成するには短すぎるリンカーを用いることにより、ドメインは強制的に他の鎖の相補的ドメインと対形成して二つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディは、例えば、EP 404, 097; WO 93/11161; 及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により十分に記載されている。

10

#### 【0035】

「標識」なる語は、ここで用いられる場合、化合物、例えば抗体又はポリペプチドに直接又は間接的に抱合して、「標識」化合物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。

20

「固相」とは、本発明の化合物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。ここで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。

「免疫関連疾患」という用語は、哺乳動物の免疫システムの成分が、哺乳動物の病的状態を引き起こし、媒介し又は寄与等するものである疾患を意味する。また、免疫反応の刺激又は介在により疾患の進行に改善された効果が付与される疾患も含まれる。この用語に含まれるものは、免疫媒介炎症疾患、非免疫媒介炎症疾患、感染症、免疫不全症、異常増殖等が含まれる。

30

「T細胞媒介疾患」という用語は、T細胞が直接的又は間接的に哺乳動物の病的状態を媒介するか寄与等する疾患を意味する。T細胞媒介疾患は細胞媒介効果、リンホカイン媒介効果等を伴い、例えばT細胞により分泌されるリンホカインによりB細胞が刺激されている場合はB細胞に関連した効果を伴う。

本発明で治療可能で、そのいくつかは免疫又はT細胞媒介性である免疫関連及び炎症疾患の例には、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ様関節炎、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症(強皮症)、特発性炎症ミオパシー(皮膚筋炎、多発性筋炎)、シェーグレン症候群、全身性血管炎(systemic vasculitis)、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血(免疫再生不良性貧血、発作性夜間血色素尿)、自己免疫性血小板減少(特発性血小板減少性紫斑病、免疫仲介血小板減少)、甲状腺炎(グレーブス疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎)、真性糖尿病、免疫仲介腎疾患(糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎)、例えば多発性硬化症のような中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、特発性脱髄性多発神経障害、又はギラン・バレー症候群、及び慢性炎症脱髄性多発神経障害、肝疾患、例えば伝染性肝炎(A型、B型、C型、D型、E型肝炎及び他の非肝炎性(nonhepatotropic)ウィルス)、自己免疫性慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎、炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎;クローン病)、グルテン過敏性腸疾患、ウィップル病、水疱性皮膚疾患、多形

40

50

性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、乾癬、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹等のアレルギー性疾患、好球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎のような肺の免疫疾患、拒絶反応及び移植片対宿主疾患を含む移植関連疾患が含まれる。ウイルス性疾患、例えばAIDS（例えばHIV感染）、A型、B型、C型、D型及びE型肝炎、ヘルペス、細菌感染、真菌感染、原生動物感染及び寄生虫感染等の感染症も含まれる。

#### 【0036】

「治療」とは、疾患の病理の進行又は改変の防止を意図して行われる。従って、「治療」とは、治癒的処置、予防的処置及び防止的処置の両方を称する。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。免疫関連疾患の治療において、治療薬は直接的に免疫反応の成分度合いを減少又は増加させてもよいし、又は他の治療薬、例えば抗生物質、抗真菌剤、抗炎症剤、化学療法剤等による治療に対してより敏感にしてもよい。

「有効量」という用語は、インビトロアッセイで測定される哺乳動物における免疫反応の成分で、検出可能な改善を引き起こすか、誘発するか、又は結果をもたらすPROポリペプチド及び／又はアゴニスト／アンタゴニストの少なくとも最小濃度又は量のことである。例えば、T細胞の増殖及び／又は血管透過性の増加又は低減がここで提供される実施例で測定される。さらに「治療有効量」は、哺乳動物における免疫反応の成分で、病状を少なくとも緩和させる（ケースによっては増加又は減少させる）のに有効で、上述したパラグラフに定義された治療に効果的な結果をもたらすPROポリペプチド及び／又はアゴニスト／アンタゴニストの少なくとも最小濃度又は量のことである。

「慢性」投与とは、急性様式とは異なり連続的な様式で薬剤を投与し、初期の治療効果（活性）を長時間に渡って維持することを称する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ本質的に周期的になされる処理である。

免疫関連疾患の「病理」は、患者の良好な生存を危うくさせる全ての現象を含む。これは、限定されるものではないが、異常又は制御不能な細胞成長、抗体生産、自己抗体生産、補体生産及び活性化、隣接細胞の正常機能の阻害、サイトカイン又は他の分泌生成物の異常レベルでの放出、炎症又は免疫反応の抑制又は悪化、組織空間への炎症細胞（好中球、エシオン好性球、単球、リンパ球）の侵入等を含む。

治療の目的のための「哺乳動物」は、ヒト、家庭及び農業用動物、及び動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ウマ、ウシ、ブタ、サル、ハムスター、イタチ、ネコ等を含む哺乳類に分類される任意の動物を称する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。一又は複数のさらなる治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時（同時期）及び任意の順序での連続した投与を含む。

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる用量及び濃度でそれらに暴露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性pH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン；グルコース、マンノース又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び／又は非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN（商品名）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（商品名）を含む。

#### 【0037】

ここで用いられる「細胞障害薬」なる用語は、細胞の機能を阻害又は抑制する及び／又は細胞破壊を生ずる物質を称する。この用語は、放射性同位体（例えば、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 及び $Re^{186}$ ）、化学療法剤、及び細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素的活性毒素といった毒素、又はその断片を含むとされる。



「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学化合物である。化学療法剤の例は、アドリアマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、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、タキソイド類、例えばパクリタキセル（Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ）及びドキセタキセル（Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）、トキソテール、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イフォスファミド、マイトマイシンC、マイトキサントロン、ビンクリスチン、ビノレルビン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラマイシン（米国特許第4,675,187号を参照のこと）、メルファラン、及び他の関連するナイトロジェンマスタードを含む。また、この定義に含まれるのは、タモキシフェン及びオナプリストン等の腫瘍へのホルモン作用を調節又は阻害するように作用するホルモン様薬剤である。

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、細胞、特にここで同定される任意の遺伝子を過剰発現する癌細胞の成長を、インビトロ又はインビボで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相でそのような遺伝子を過剰発現する細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期の進行を（S相以外の位置で）ブロックする薬剤、例えばG1停止又はM相停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM相ブロッカーは、ビンカス（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキソール、及びトポIIインヒビター、例えばドキソルビシン、エピルビシン、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相停止にも溢流し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、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, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特にp13に見出すことができる。

「サイトカイン」なる用語は、1つの細胞集団から放出され、他の細胞に細胞間メディエーターとして作用するタンパク質の一般用語である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるのは、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インシュリン；プロインシュリン；レラキシン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば濾胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、及び黄体化ホルモン（LH）；肝臓成長因子；線維芽成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子- $\alpha$ 及び- $\beta$ ；ミューラー阻害因子；マウス生殖腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF- $\beta$ 等の神経成長因子；血小板成長因子；TGF- $\alpha$ 及びTGF- $\beta$ 等のトランスフォーミング成長因子（TGF）；インシュリン様成長因子-I及び-II；エリスロポエチン（EPO）；骨誘発因子；インターフェロン- $\alpha$ 、- $\beta$ 、及び- $\gamma$ 等のインターフェロン；コロニー刺激因子（CSFs）、例えばマクロファージ-CSF（M-CSF）；顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF）；及び顆粒球-CSF（G-CSF）；インターロイキン（ILs）、例えばIL-1、IL-1 $\alpha$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12；腫瘍壊死因子、例えばTNF- $\alpha$ 及びTNF- $\beta$ ；及びLIF及びキットリガンド（KL）を含む他のポリペプチド因子である。ここで用いられる際、用語サイトカインは、天然供給源から、又は組換え細胞培養からのタンパク質を含み、天然配列サイトカインの生物学的な活性等価物である。

【0038】

10

20

30

40

50

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したPROポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチドを称す。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PROポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8～約50のアミノ酸残基（好ましくは約10～約20のアミノ酸残基）を有する。PROポリペプチド変異体における「活性な」及び「活性」とは、PROポリペプチドが有する抗原性エピトープに対して抗体の産生を誘発する能力及び／又は生物学的機能を保持する本発明のタンパク質の形態を指す。より詳細には、「生物学的活性」とは、天然配列又は天然発生PROポリペプチドによって引き起こされる（阻害性又は刺激性の）生物学的機能を指す。さらにより詳細には、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抗体又は他の分子（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、このような分子が、組織への炎症細胞の侵入を誘発又は阻害し、T細胞の増殖又は活性化を刺激又は阻害し、細胞からのサイトカインの放出を阻害し、又は血管透過性を増加又は低減させる能力のことである。他の特定の生物学的活性は増加した血管透過性又はその阻害である。

10

「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配列PROポリペプチドの生物学的活性を部分的又は完全に阻止、阻害、又は中和する任意の分子を含む。同様に「アゴニスト」なる用語も最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然配列PROポリペプチドの生物学的活性を模倣又は増幅する任意の分子を含む。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然PROポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、有機小分子等を含む。PROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストの同定方法は、PROポリペプチドを候補アンタゴニスト又はアゴニスト分子と接触させ、PROポリペプチドに通常付随する一又は複数の生物学的活性の変化を測定することを含む。

20

「小分子」とは、ここで、約600ダルトン未満の分子量を持つと定義され、一般的に有機化合物である。

「リボソーム」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（場合によっては化学療法剤を含む）の輸送に有用である。リボソームの成分は、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。

30

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等の任意の免疫グロブリンから得ることができる。

40

【0039】

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, -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},
/* 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},
/* V */  { 0, -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},
/* 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

表1(続き)

```

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

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

#define DMAT         3      /* value of matching bases */
#define DMIS         0      /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0        8      /* penalty for a gap */
#define DINS1        1      /* penalty per base */
#define PINS0        8      /* penalty for a gap */
#define PINS1        4      /* penalty per residue */

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

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

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

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

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

```

10

20

30

表1(続き)

```

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

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

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

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

    endgaps = 0;
    ofile = "align.out";

    nw();
    readjumps();
    print();

    cleanup(0);
}

```

10

20

30

表1(続き)

```

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

    dx = (struct diag *)g_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

表1(続き)

...nw

```

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

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

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

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

```

10

20

30

表1(続き)

...11W

```

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



表1(続き)

```

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

#include "nw.h"

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

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

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

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

```

10

print

20

30

表 1(続き)

```

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

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

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

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

```

getmat

10

20

30

40

表1(続き)

```

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

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

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

30

pr\_align

40

表1(続き)

```

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

        more++;

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

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

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

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

```

...pr\_align

10

20

30

dumpblock

40

表1(続き)

...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)
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 = *py;
            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)
int ix;
{

```

10

nums

20

30

putline

40

表1(続き)

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

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

```

20

30

表1(続き)

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

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

stripname

表1(続き)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- 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';

```

10

cleanup

20

getseq

30

40



表1(続き)

...getseq

10

20

30

40

```

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

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

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

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

/*
 * get final jmps from dx[] or ump 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--)

```

g\_calloc

readjmps

表1(続き)

...readjumps

```

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

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

```

表1(続き)

```

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

    char    *mktemp();

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

```

writejumps

10

【 0 0 4 0 】

表2

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

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数)  
を(PROポリペプチドの全アミノ酸残基の数)で割る=

5 ÷ 15 = 33.3%

30

表3

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

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数)  
を(PROポリペプチドの全アミノ酸残基の数)で割る=

5 ÷ 10 = 50%

40

表4

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

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチド残基の数を(PRO-DNA核酸配列の全ヌクレオチド数)で割る=

10

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

表5

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

% 核酸配列同一性 =

20

(ALIGN-2によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチド残基の数を(PRO-DNA核酸配列の全ヌクレオチド数)で割る=

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

## 【0041】

### II. 本発明の組成物と方法

#### 1. 本発明のPROポリペプチドの調製

30

本発明は、本出願でPROポリペプチドとされるポリペプチドをコードする新規に同定され単離された核酸配列を提供する。特に下記の実施例でさらに詳細に開示するように、種々のPROポリペプチドをコードするcDNAが同定され単離された。別々の発現ラウンドで生成されたタンパク質には異なるPRO番号が与えられるが、UNQ番号は全ての与えられたDNA及びコード化タンパク質に独特であり、変わることはないことを記しておく。しかしながら、単純化のために、本明細書において、ここに開示した全長天然核酸分子にコードされるタンパク質並びに上記のPROの定義に含まれるさらなる天然相同体及び変異体は、それらの起源又は調製形式に関わらず、「PRO／番号」又は「PRO」で呼称する。

特に、PRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PR

50

O1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリ  
ペプチド（それぞれ、UNQ174、UNQ178、UNQ186、UNQ190、UN  
Q200、UNQ214、UNQ209、UNQ219、UNQ146、UNQ240、  
UNQ239、UNQ293、UNQ330、UNQ365、UNQ316、UNQ31  
7、UNQ318、UNQ319、UNQ313、UNQ332、UNQ334、UNQ  
540、UNQ434、UNQ408、UNQ407、UNQ430、UNQ557、U  
NQ491、UNQ598、UNQ516、UNQ701、UNQ585、UNQ633  
、UNQ678、UNQ606、UNQ630、UNQ653、UNQ608、UNQ6  
98、UNQ732、UNQ722、UNQ728、UNQ900、UNQ859、UN  
Q179、UNQ21、UNQ236、UNQ303、UNQ294、UNQ322、U 10  
NQ388、UNQ435、UNQ433、UNQ483、UNQ545、UNQ589  
、UNQ707、UNQ685、UNQ693、UNQ739、UNQ1888、UNQ  
1866、UNQ1947及びUNQ2448に相当）をコードするcDNAは、以下の  
実施例においてさらに詳細に開示されているように、同定され単離されている。

#### 【0042】

特に、本明細書は、天然配列PRO200、PRO204、PRO212、PRO216  
、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO2  
73、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PR  
O362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、  
PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1 20  
114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1  
155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1  
283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1  
410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、  
PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO84  
0、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、  
PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430及  
びPRO5727ポリペプチドをそれぞれコードする、cDNA、DNA29101-1  
276、DNA30871-1157、DNA30942-1134、DNA33087  
-1158、DNA33460-1166、DNA34387-1138、DNA355 30  
58-1167、DNA35638-1141、DNA35916-1161、DNA3  
9523-1192、DNA40620-1183、DNA40982-1235、DN  
A44184-1319、DNA44205-1285、DNA45410-1250、  
DNA45416-1251、DNA45419-1525、DNA47365-120  
6、DNA47470-1130、DNA48314-1320、DNA49435-1  
219、DNA50921-1458、DNA53974-1401、DNA54228  
-1366、DNA54231-1366、DNA56405-1357、DNA570  
33-1403、DNA57690-1374、DNA59220-1514、DNA5  
9294-1381、DNA59776-1600、DNA59849-1504、DN 40  
A60775-1532、DNA61873-1574、DNA62814-1521、  
DNA64885-1529、DNA65404-1551、DNA65412-152  
3、DNA66675-1587、DNA68864-1629、DNA68872-1  
620、DNA68874-1622、DNA76400-2528、DNA77624  
-2515、DNA30868-1156、DNA36638-1056、DNA382  
60-1180、DNA40592-1242、DNA41374-1312、DNA4  
4194-1317、DNA53517-1366、DNA53971-1359、DN  
A53987-1438、DNA57700-1408、DNA59620-1463、  
DNA60627-1508、DNA64890-1612、DNA66659-159  
3、DNA66667-1596、DNA68818-2536、DNA84210-2  
576、DNA92218-2554、DNA96878-2626、DNA98853 50

ー 1 7 3 9 を記載している。

下記の実施例に開示するように、種々の c D N A クローンが A T C C に寄託されている。これらのクローンの事実上のヌクレオチド配列は、この分野で日常的な方法を用いて寄託されたクローンを配列決定することにより容易に決定することができる。寄託された配列とここに開示された配列との間で不一致がある場合は、寄託物の配列は正確な配列を含むと理解される。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。ここに記載した P R O ポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。

#### 【 0 0 4 3 】

##### B. P R O ポリペプチド変異体

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

天然全長配列 P R O 配列又はここに記載した P R O の種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第 5, 3 6 4, 9 3 4 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技術及び指針の任意のもの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 と比較して P R O のアミノ酸配列が変化する P R O をコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも 1 つのアミノ酸の P R O 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 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の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸の類似した構造及び／又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては 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タンパク質によって提示された活性について試験することにより決定される。

P R O ポリペプチド断片がここに提供される。このような断片は、例えば、全長天然タンパク質と比較した際に、N-末端又は C-末端で切断されてもよく、又は内部残基を欠いていてもよい。或る種の断片は、P R O ポリペプチドの所望の生物学的活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

#### 【 0 0 4 4 】

P R O 断片は、多くの従来技術の任意のものによって調製してよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法是、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基によって決定される部位のタンパク質を切断することが知られた酵素でタンパク質を処理することにより、あるいは適当な制限酵素で D N A を消化して所望の断片を単離することによる P R O 断片の生成を含む。さらに他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) により、所望のポリペプチド断片をコードする D N A 断片を単離し増幅することを含む。D N A 断片の所望の末端を決定するオリゴヌクレオチドは、P C R の 5 ' 及び 3 ' プライマーで用いられる。好ましくは、P R O ポリペプチド断片は、ここに開示した天然 P R O ポリペプチドと少なくとも 1 つの生物学的及び／又は免疫学的活性を共有する。

特別の実施態様では、関心ある保存的置換を、好ましい置換と題して表 6 に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表 6 に例示的置換と示した又は以下に参照として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。

#### 【 0 0 4 5 】

10

20

30

40

50

表 6

| 元の残基   | 例示的置換                             | 好ましい置換 |
|--------|-----------------------------------|--------|
| Ala(A) | val; leu; ile                     | val    |
| Arg(R) | lys; gln; asn                     | lys    |
| Asn(N) | gln; his; lys; arg                | gln    |
| Asp(D) | glu                               | glu    |
| Cys(C) | ser                               | ser    |
| Gln(Q) | asn                               | asn    |
| Glu(E) | asp                               | asp    |
| Gly(G) | pro; ala                          | ala    |
| His(H) | asn; gln; lys; arg                | arg    |
| Ile(I) | leu; val; met; ala; phe;<br>ノロイシン | leu    |
| Leu(L) | ノロイシン; ile; val;<br>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;<br>ala; ノロイシン | leu    |

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 6 】

本発明のポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の実質的な修飾は、(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)標的部位における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

- (1) 疎水性：ノロイシン, 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。

## 【 0 0 4 7 】

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、もしくは好ましくは残

された(非保存)部位に導入されうる。  
変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位指向性)突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びPCR突然変異誘発等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができる。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[Wellls等, Gene, 34: 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発[Wellls等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)]、又は他の知られた技術をクローニングしたDNAに実施してPRO変異体DNAを作成することもできる。

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham 及び Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に頻繁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。 10

#### 【0048】

##### C. PROの修飾

PROポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の1型は、PROポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、PROの選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることを含む。二官能性試薬での誘導体化が、例えばPROを水不溶性支持体マトリクスあるいは抗PRO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。 20

他の修飾は、グルタミニル及びアスパラギニル残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチルへの脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖のα-アミノ基のメチル化 [T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。 30

#### 【0049】

本発明の範囲内に含まれるPROポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、この目的で意図されるのは、天然配列PROに見られる一又は複数の炭水化物部分の欠失 (潜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PRO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、この語句は、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化を含む、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。 40

PRO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PRO (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。PROアミノ酸配列は、場合によっては、DNAレベルでの変化、特に、PROポリペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることを通して変更されてもよい。

PRO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Applin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-3 50



06 (1981)に記載されている。

#### 【0050】

PROポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987)により、及びEdge等, Anal. Biochem., 118: 131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, Meth. Enzymol. 138: 350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。 10

本発明のPROの共有結合的修飾の他の型は、PRO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；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号又は同第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。

また、PROポリペプチドは、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合した本発明のポリペプチドを含むキメラ分子を形成する方法で修飾されてもよい。

#### 【0051】

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PROとの融合を含む。エピトープタグは、一般的にはPROのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなPROポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってPROを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン(poly-his)又はポリ-ヒスチジン-グリシン(poly-his-gly)タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5[Field等, Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体[Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D(gD)タグ及びその抗体[Paborsky等, Protein Engineering, 3(6): 547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド[Hopp等, BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド[Martin等, Science, 255: 192-194 (1992)]； $\alpha$ -チューブリンエピトープペプチド[Skinner等, J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ[Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)]を含む。 20 30 40

それに換わる実施態様では、キメラ分子はPROの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。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IgG1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本発明の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、IgG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。

#### 【0052】

#### D. PROの調製

以下の記述は、主として、PRO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PRO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PROを調製することができると考えられる。例えば、PRO配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい〔例えば、Stewart等, Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963) 参照〕。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機 (Foster City, CA) を用いて、製造者の指示により実施してもよい。PROの種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて全長PROを生産してもよい。

#### 【0053】

##### 1. PROポリペプチド(類)をコードするDNAの単離

PROをコードするDNAは、ポリペプチドmRNAを保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたcDNAライブラリから得ることができる。従って、ヒトPRO 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PROコード化遺伝子は、ゲノムライブラリ、オリゴヌクレオチド合成、又は他の既知の合成方法(例えば、自動化核酸合成)により得ることもできる。

ライブラリは、関心あ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(例えば、PRO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)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, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)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。PROポリペプチドをコードする遺伝子を単離する他の手段はPCR法を使用するものである〔Sambrook等, 上掲; Dieffenbach等, PCR Primer: A Laboratory Manual (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、<sup>32</sup>P標識されたATPのような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用が含まれる。中程度の緊縮性及び高度の緊縮性を含むハイブリッド形成条件は、上掲のSambrook等に与えられている。

#### 【0054】

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列は、Genbank等の公共データベース又は他の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他の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の定められた領域内又は全長配列に渡っての(アミノ酸又はヌクレオチドレベルのいずれかでの)配列同一性は、この分野で知られた、そしてここに記載した方法を用いて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。

# 【0055】

## 2. 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PROポリペプチド生産のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された従来の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。 10

形質移入の方法、例えば、CaPO<sub>4</sub> 及びエレクトロポレーションは、通常、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。上掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物又は実質的な細胞壁障壁を有する他の細胞に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shaw等, Gene, 23:315 (1983) 及び1989年6月29日公開のWO 89/05859に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978) のリン 20  
酸カルシウム沈降法を使用することができる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Vansolingen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られる。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 ( 30  
1988) を参照のこと。

このベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294 (ATCC31,446); 大腸菌X1776 (ATCC31,537); 大腸菌株W3110 (ATCC27,325) 及びK5772 (ATCC53,635) である。他の 40  
好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、E. coli、エンテロバクター、エルビニア (Erwinia)、クレブシエラ (Klebsiella)、プロテウス (Proteus)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス (Serratia marcescans)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバシリスブチリス (B. subtilis) 及びバシリリチェニフォルミス (B. licheniformis) (例えば、1989年4月12日公開のDD 266,710に記載されたバシリリチェニフォルミス41P)、シュードモナス、例えば緑膿筋及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生産発行のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110は、宿主に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異に影響を与え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 50

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を有する大腸菌W3110株27C7 (ATCC 55, 244)；完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (algF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvGkan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ポリメラーゼ反応が好ましい。

#### 【0056】

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、PROコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・プロンプ (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, Nature, 290: 140 [1981]；1985年5月2日発行のEP 139, 383)；クルベロミセスホスツ (*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4, 943, 529号；Fleer等, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991))、例えばケーラクチス (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574；Louvencourt等, J. Bacteriol. 737 [1983])、ケーフラギリス (*K. fragilis*) (ATCC 12, 424)、ケーブルガリクス (*K. bulgaricus*) (ATCC 16, 045)、ケーウィケラミイ (*K. wickerhamii*) (ATCC 24, 178)、ケーワルチイ (*K. waltii*) (ATCC 56, 500)、ケードロソフィラルム (*K. drosophilum*) (ATCC 36, 906；Van den Berg等, Bio/Technology, 8: 135 (1990))、ケーテモトレランス (*K. thermotolerans*) 及びケーマルキシアナス (*K. marxianus*)；ヤロウィア (*yarrowia*) (EP 402, 226)；ピッチャパストリス (*Pichia pastoris*) (EP 183, 070；Sheekrishna等, J. Basic Microbiol, 28: 265-278 [1988])；カンジダ；トリコデルマレーシア (*reesia*) (EP 244, 234)；アカパンカビ (Case等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979])；シュワニオマイセス (*schwanomyces*)、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 (*Tolypocladium*) (1991年1月10日公開の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。ここではメチロトロピック (methylootropic) 酵母が適切であり、これらに限られないが、ハンセンラ (*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 Methylotherophs, 269 (1982)に見出される。

グリコシル化PROポリペプチドの発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエS2及びスポドスペラSf9等の昆虫

10

20

30

40

50

細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）及びCOS細胞を含む。より特定の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7, ATCC CRL 1651）；ヒト胚腎臓株（293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977)）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／-DHFR（CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)）；マウスのセルトリ細胞（TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)）；ヒト肺細胞（W138, ATCC CCL 75）；ヒト肝細胞（Hep G2, HB 8065）；及びマウス乳房腫瘍細胞（MMT 060562, ATCC CCL 51）を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術範囲内にあると考えられる。

10

### 【0057】

#### 3. 複製可能なベクターの選択及び使用

PROポリペプチドをコードする核酸（例えば、cDNA又はゲノムDNA）は、クローニング（DNAの増幅）又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、ファージミド又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、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。

20

PROは直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるPROコード化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。酵母菌の分泌に関しては、シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（酵母菌属（*Saccharomyces*）及びクルイペロマイシス（*Kluyveromyces*） $\alpha$ 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている）、又は酸ホスファターゼリーダー、白体（*C. albicans*）グルコアミラーゼリーダー（1990年4月4日公開のEP362,179）、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。

30

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、酵母菌及びウイルスに対してよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 $\mu$ 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。

40

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

50

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの例は、DHFRあるいはチミジンキナーゼのように、PROコード化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、U r l a u b 等により、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたDHFR活性に欠陥のあるCHO株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である[Stinchcomb等, Nature, 282:39 (1979); Kingman等, Gene, 7:141 (1979); Tschemper等, Gene, 10:157 (1980)]。trp1遺伝子は、例えば、ATCC番号44076あるいはPEP4-1のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する[Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。 10

#### 【0058】

発現及びクロニングベクターは、通常、PROコード化核酸配列に作用可能に結合し、mRNA合成に指向するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターはβ-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系[Cahng等, Nature, 275:615 (1978); Goeddel等, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系[Goeddel, 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PROをコードするDNAと作用可能に結合したシャイン-ダルガーノ(S. D.)配列を有する。 20

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[Hitze等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)]又は他の糖分解酵素[Hess等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1987)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。 30

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、窒素代謝に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を利用する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現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。

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのPRO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、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。 40

#### 【0059】

より高等の真核生物による所望のPROポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス 50

作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン及びインスリン）。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製開始点の後期側のSV40エンハンサー（100-270塩基対）、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、PROポリペプチドコード化配列の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（酵母菌、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞）に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、PROをコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養でのPROポリペプチドの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei等, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117, 060; 及びEP 117, 058に記載されている。

#### 【0060】

#### 4. 遺伝子発現の検出

遺伝子発現は、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、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)]、サザンブロット法、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、又は特異的抗体エピトープをコードし、PROポリペプチドをコードするDNAに融合した外因性配列に対して調製され得る。

#### 【0061】

#### 5. ポリペプチドの精製

PRO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-X100）又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。PROポリペプチドの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

PROポリペプチドを、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。次の手順が適切な精製手順の例である：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAEによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過；IgGのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラム；及びPROポリペプチドのエピトープタグ形態を結合させる金属

10

20

30

40

50

キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutcher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された種々のタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定のPROポリペプチドの性質に依存する。

#### 【0062】

##### E. 組織分布

PROを発現する組織の位置は、種々のヒト組織でのmRNAの発現を測定することにより同定可能である。このような遺伝子の位置により、PROポリペプチドの活性の刺激又は阻害の影響を最も受けていると思われる組織の情報が提供される。また、特異的組織における遺伝子の位置により、以下で論議される活性阻止アッセイについての試料組織も提供される。

上記したように、種々の組織における遺伝子発現は、従来の、mRNAの転写の定量化のためのノーザンブロット(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 [1980])、サザンブロット、ドットブロット(DNA分析)、又はインサイツハイブリッド形成により、ここに提供する配列にもとづいて適切な標識プローブを用いて測定できる。あるいは、DNA二重鎖、RNA二重鎖、及びDNA-RNAハイブリッド二重鎖又はDNA-タンパク質二重鎖を含む特定の二重鎖を認識可能な抗体を用いてもよい。

あるいは、種々の組織における遺伝子発現は、遺伝子産物を直接定量化するための、組織断片の免疫組織学的染色、及び細胞培地又は体液のアッセイ等の免疫学的方法によっても測定できる。免疫組織学的染色又は試料液の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、任意の動物から調製される。便利には、抗体は天然配列PROポリペプチドに対して、又はPROポリペプチドをコードするDNA配列に基づく合成ペプチドに対して、又は特異的抗体エピトープをコードし、PROポリペプチドをコードするDNAに融合した外因性配列に対して調製され得る。抗体を生成する一般的技術、及びノーザンブロット及びインサイツハイブリッド形成の特定のプロトコールは以下に提供する。

#### 【0063】

##### F. 抗体結合性の研究

遺伝子増幅実験の結果は、それぞれ、組織細胞上でのPRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430又はPRO5727ポリペプチドの効果を阻害する、抗-PRO200、抗-PRO204、抗-PRO212、抗-PRO216、抗-PRO226、抗-PRO240、抗-PRO235、抗-PRO245、抗-PRO172、抗-PRO273、抗-PRO272、抗-PRO332、抗-PRO526、抗-PRO701、抗-PRO361、抗-PRO362、抗-PRO363、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO531、抗-PRO533、抗-PRO1083、抗-PRO865、抗-PRO770、抗-PRO769、抗-PRO788、抗-PRO1114、抗



－PRO1007、抗－PRO1184、抗－PRO1031、抗－PRO1346、抗－PRO1155、抗－PRO1250、抗－PRO1312、抗－PRO1192、抗－PRO1246、抗－PRO1283、抗－PRO1195、抗－PRO1343、抗－PRO1418、抗－PRO1387、抗－PRO1410、抗－PRO1917、抗－PRO1868、抗－PRO205、抗－PRO21、抗－PRO269、抗－PRO344、抗－PRO333、抗－PRO381、抗－PRO720、抗－PRO866、抗－PRO840、抗－PRO982、抗－PRO836、抗－PRO1159、抗－PRO1358、抗－PRO1325、抗－PRO1338、抗－PRO1434、抗－PRO4333、抗－PRO4302、抗－PRO4430又は抗－PRO5727抗体の能力が試験される抗体結合性の研究によって更に証明できる。例示的な抗体は、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を含み、その調製は以下に記載する。 10

抗体結合性の研究は、競合的結合アッセイ、直接及び間接サンドウィッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイなどの既知のアッセイ法で実施してよい。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)。

競合的結合アッセイは、標識標準物の、限られた量の抗体との結合について試験分析物と競合する能力による。試験試料中の標的タンパク質の量は、抗体に結合する標準物の量に逆比例する。結合する標準物の量の測定を促進するために、抗体は好ましくは競合の前又は後に不溶化し、抗体に結合した標準品及び分析物が未結合で残っている標準物及び分析物から容易に分離できるようにする。 20

サンドウィッチアッセイは2つの抗体の使用を含み、各々、検出されるタンパク質の異なる免疫原部分、又はエピトープに結合できる。サンドウィッチアッセイにおいて試験試料分析物は固体支持体上に固定化された第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成分複合体が形成される。例えば米国特許第4,376,110号参照。第2の抗体は検出可能部分で標識され（直接サンドウィッチアッセイ）、あるいは検出可能部分で標識された抗－免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい（間接サンドウィッチアッセイ）。例えば、サンドウィッチアッセイの一形態はELISAアッセイであり、この場合の検出可能部分は酵素である。

免疫組織学のために、組織試料は新鮮でも凍結したものでもよく、パラフィンに包埋して、例えばホルマリン等の保存剤で固定してもよい。 30

#### 【0064】

##### G. 細胞ベースアッセイ

細胞ベースアッセイ及び免疫関連疾患の動物モデルは、ここで同定されたポリペプチドと遺伝子との関係、及び免疫関連疾患の進行及び病理との関係をさらに理解するために使用することができる。

異なる方法では、特定の免疫関連疾患に含まれることが知られた細胞型の細胞をここに記載のcDNAで形質移入し、これらのcDNAの免疫機能を刺激又は阻害する能力を分析する。適当な細胞を所望の遺伝子で形質移入し、免疫機能活性を監視できる。このような形質移入株化細胞は、次いで、例えばT細胞増殖又は炎症細胞の侵入を調節するといった免疫機能を刺激又は阻害するポリ－又はモノクローナル抗体又は抗体組成物の能力を試験するのに使用できる。ここに同定した遺伝子のコード化配列で形質移入した細胞は、さらに、免疫関連疾患治療用の候補薬の同定に使用できる。 40

さらに、（下記のような）トランスジェニック動物から誘導された一次培地は、ここでの細胞ベースアッセイに使用できるが、安定な株化細胞が好ましい。トランスジェニック動物から連続株化細胞を誘導する技術はこの分野で良く知られている（Small等, Mol. Cell. Biol. 5, 642-648 [1985] 参照）。

一つの適切な細胞ベースアッセイは混合リンパ球反応（MLR）である。Current Protocols in Immunology, unit 3.12; J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. S 50

hevach, W. Strobeer 編, 国立衛生研究所, John Wiley & Sons, Inc から出版。このアッセイでは、試験化合物が活性化した T 細胞の増殖を刺激又は阻害する能力をアッセイする。レスポンドー T 細胞の懸濁液を同種刺激細胞で培養し、トリチウム化チミジンの取込により T 細胞の増殖度合いを測定する。このアッセイは T 細胞反応性の一般的な測定法である。多くの T 細胞が応答し、IL-2 の活性化をもたらすため、このアッセイにおける応答性の差異は、応答細胞による IL-2 生産の差異に部分的に反映する。MLR の結果を、標準的なリンホカイン (IL-2) 検出アッセイにより証明することができる。上掲の Current Protocols in Immunology, 3.15.6.3.。

MLR アッセイにおける増殖性 T 細胞応答は、アッセイされる分子の直接的な有糸分裂促進特性又は外的な抗原誘発活性化による可能性がある。PRO ポリペプチドの T 細胞刺激活性のさらなる証明は、同時刺激アッセイにより得ることができる。T 細胞活性化には T 細胞レセプター (TCR) を通して媒介される抗原に特異的なシグナル、及び第 2 のリガンド結合相互作用、例えば B7 (CD80、CD86) / CD28 結合相互作用を通して媒介される同時刺激シグナルが必要である。CD28 の架橋により、活性化 T 細胞によるリンホカインの分泌が増加する。T 細胞活性化はネガティブ又はポジティブ効果を有するリガンドの結合を通してネガティブ及びポジティブコントロールの双方を有する。CD28 及び CTLA-4 は B7 に結合する Ig スーパーファミリーの糖タンパク質に関連している。B7 に結合する CD28 は、ポジティブな T 細胞活性化同時刺激効果を有し；逆に B7 に結合する CTLA-4 はネガティブな T 細胞非活性化効果を有する。Chambers, C. A. and Allison, J. P., Curr. Opin. Immunol. (1997) 9:396. Schwartz, R. H., Cell (1992) 71:1065; Linsey, P. S. and Ledbetter, J. A. Annu. Rev. Immunol. (1993) 11:191; June, C. H. 等 Immunol. Today (1994) 15:321; Jenkins, M. K., Immunity (1994) 1:405。同時刺激アッセイにおいて、PRO ポリペプチドは T 細胞同時刺激又は阻害活性をアッセイするものである。

#### 【0065】

PRO ポリペプチド、並びに T 細胞の増殖の刺激剤 (同時刺激剤) である本発明の他の化合物及びアゴニスト、例えばアゴニスト抗体で、例えば MLR 及び同時刺激アッセイで決定されるようなものは、免疫機能の貧弱さ、最適下限又は不適切さに特徴付けられる免疫関連疾患の治療に有用である。これらの疾患は T 細胞 (及び T 細胞媒介免疫性) の増殖及び活性化を刺激し、刺激化合物、例えば刺激性 PRO ポリペプチドの投与により哺乳動物における免疫反応を増強することにより治療される。刺激性ポリペプチドは、例えば PRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430 又は PRO5727 ポリペプチド又はそのアゴニスト抗体であり得る。

本発明の刺激化合物の直接的用途は、プライム T 細胞上で発現するリガンド (4-1BB) に結合し、T 細胞活性化及び成長の信号を発する腫瘍壊死因子レセプターファミリーのメンバーである 4-1BB 糖タンパク質を用いる実験において確認されている。Ald

erson, M. E. 等, J. Immunol. (1994) 24:2219。

また、アゴニスト刺激化合物の用途は実験的に確認されている。アゴニスト抗-4-IBB抗体を用いた治療による4-IBBの活性化は腫瘍の根絶化を増強する。Hellstrom, I. 及びHellstrom, K. E., Crit. Rev. Immunol. (1998) 18:1。以下により詳細に記載する腫瘍治療のための免疫アジュバント治療は、本発明の刺激化合物の用途の他の例である。

さらに、免疫刺激又は増強効果はMLRアッセイにおいて阻害することが見出されたPROの活性に拮抗又はこれをブロックすることにより達成することができる。化合物の阻害活性を無効にすることで、ネットの刺激効果が生じる。適切なアンタゴニスト／ブロック化合物は阻害タンパク質を認識し、これに結合する抗体及びその断片であり、それにより該タンパク質とそのレセプターとの効果的な相互作用がブロックされ、レセプターを通じたシグナル化が阻害される。この効果は、おそらくCTLA-4結合による阻害シグナルの除去することにより、T細胞増殖を増強する抗-CTLA-4抗体を使用する実験で確認されている。Walunas, T. L. 等, Immunity (1994) 1:405。

別に、免疫刺激又は増強効果は、血管透過性増強特性を有するPROの投与により達成することもできる。増強した血管透過性は炎症及び免疫細胞（例えば単球、好酸球、PMN）の局部的浸潤により緩和可能な疾患に有益である。

他方、T細胞増殖／活性化、リンホカイン分泌、及び／又は血管透過性の直接阻害剤であるPROポリペプチド並びに本発明の他の化合物は、免疫反応の抑制に直接使用することができる。これらの化合物は、過剰活性、最適上限（superoptimal）又は自己免疫反応により特徴付けられる免疫関連疾患の治療、及び免疫反応の程度を低減するのに有用である。本発明の化合物のこの用途は、レセプターB7に結合するCTLA-4がT細胞を非活性化するという上述の実験により確認されている。本発明の直接阻害化合物は類似した方法で機能する。血管透過性を抑制する化合物の用途は炎症を低減することが期待される。このような用途は過度の炎症に関連した病状の治療に有益である。

別に、刺激PROポリペプチドに結合し、これらの分子の刺激効果をブロックする化合物、例えば抗体により、ネットの阻害効果が生じ、T細胞の増殖／活性化及び／又はリホカイン分泌を阻害することにより、T細胞媒介免疫反応を抑制するために使用することができる。ポリペプチドの刺激効果をブロックすると、哺乳動物の免疫反応が抑制される。この用途は抗-IL2抗体を使用する実験において確認されている。これらの実験において、抗体はIL2に結合し、そのレセプターへのIL2の結合が阻害され、よってT細胞阻害効果が達成される。

#### 【0066】

#### H. 動物モデル

さらに、インビトロにおける細胞ベースアッセイの結果は、インビボ動物モデルを使用し、T細胞機能アッセイにより証明することができる。免疫関連疾患の進行及び病因におけるここに同定される遺伝子の役割を更に理解するために、そして抗体、及び小分子アゴニストを含む天然ポリペプチドの他のアゴニストを含む候補治療薬の有効性を試験するために、種々の良く知られた動物モデルが使用できる。これらのモデルのインビボ性質により、特にヒト患者における反応を予測できる。免疫関連疾患の動物モデルは、非組換え及び組換え（トランスジェニック）動物の両方を含む。非組換え動物モデルは、例えば、齧歯類、例えばマウスモデルを含む。このようなモデルは、標準的な技術、例えば、皮下注射、尾部静脈注射、脾臓移植、腹膜内移植、腎被膜下移植等により、細胞を同系マウスに導入することにより作成される。（1997年9月18日に発行されたPCT公報WO 97/33551参照。）

移植片対宿主疾患は、免疫適格細胞が免疫抑制された、又は耐性のある患者に移植された場合に生じる。ドナー細胞は認識し、宿主抗原に反応する。反応は生命に危険性のある重度の炎症から、下痢や体重の減少等の軽度のケースまで多様である。移植片対宿主疾患モデルはMHC抗原及び少量の移植抗原に対するT細胞反応性を評価する手段を提供する。

適切な手順は上掲のCurrent Protocols in Immunology unit 4. 3. に詳細に記載されている。

皮膚同種移植片拒絶のための動物モデルは、T細胞がインビボ組織の破壊を媒介する能力を試験し、及び移植拒絶におけるそれらの役割を測定する手段である。最も一般的で容認されているモデルではマウスの尾の皮膚の移植片が使用される。繰り返し実験により、皮膚同種移植片拒絶がT細胞、ヘルパーT細胞及びキラーエフェクターT細胞により媒介されるが、抗体では媒介されないことが示された。Auchincloss, H. Jr. 及びSachs, D. H., Fundamental Immunology, 2nd ed., W. E. Paul ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992。適切な手順は上掲のCurrent Protocols in Immunology unit 4. 4. に詳細に記載されている。本発明の化合物の試験に使用可能な他の移植拒絶は、Tanabe, M. 等, Transplantation (1994) 58:23及びTinubu, S. A. 等, J. Immunol. (1994) 4330-4338により記載されている同種心臓移植片モデルである。

遅延型過敏用の動物モデルは、細胞媒介免疫機能のアッセイを提供する。遅延型過敏反応は、抗原投与による攻撃後の経過した時間まで、ピークに達しない炎症により特徴付けられるT細胞媒介インビボ免疫反応である。またこれらの反応は組織特異的自己免疫疾患、例えば多発性硬化症(MS)及び実験的自己免疫脳脊髄炎(EAE、MS用のモデル)で生じる。適切な手順は上掲のCurrent Protocols in Immunology unit 4. 5. に詳細に記載されている。

EAEは、T細胞及び単核細胞の炎症、続いて中枢神経系における軸索の脱髄により特徴付けられるT細胞媒介自己免疫疾患である。EAEは、一般的にヒトにおけるMS用の関連動物モデルであると考えられている。Bolton, C., Multiple Sclerosis (1995) 1:143。急性及び再発性弛緩モデルの双方が開発されている。本発明の化合物は上掲のCurrent Protocols in Immunology unit 15. 1及び15. 2. に記載されているプロトコルを使用して、免疫媒介脱髄疾患に対するT細胞刺激又は阻害活性を試験することができる。また、Duncan, I. D. 等, Molec. Med. Today (1997) 554-561に記載されているようにして、オリゴデンドロサイト又はシュワン細胞が中枢神経系に移植されたミエリン疾患用のモデルも参照のこと。

接触性過敏は、細胞媒介免疫機能の単純遅延型過敏インビボアッセイである。この手順において、遅延型過敏反応が生じている外因性ハプテンに皮膚を暴露し、測定して定量する。接触性過敏は最初に敏感相、続いて顕現相を含む。顕現相はTリンパ球が以前接触したことのある抗原に遭遇したときに生じる。腫脹及び炎症が生じ、ヒトアレルギー性接触皮膚炎の優れたモデルが作成される。適切な手順は、Current Protocols in Immunology; J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, 及びW. Strober編, John Wiley & Sons, Inc, unit 4. 2に詳細に記載されている。また、Grabbe, S. 及びSchwarz, T. Immun. Today 19(1):37-44(1998)を参照のこと。

関節炎用の動物モデルは、コラーゲン誘発関節炎である。このモデルはヒト自己免疫慢性関節リウマチの臨床的、組織的及び免疫学的特徴を共有し、ヒト自己免疫関節炎用の許容可能なモデルである。マウス及びラットモデルは滑膜炎、軟骨の腐食及びsubchondral骨により特徴付けられる。本発明の化合物は上掲のCurrent Protocols in Immunology unit 15. 5. に記載されているプロトコルを使用し、自己免疫関節炎に対する活性度を試験することができる。また、Isssekutz, A. C. 等, Immunology (1996) 88:569に記載されているCD18及びVLA-4インテグリンに対するモノクローナル抗体を使用するモデルも参照のこと。

喘息モデルでは、抗原誘発気道反応性亢進、肺好球菌増加症及び炎症が卵白アルブミンで

10

20

30

40

50

動物を感作させることで誘発され、ついで、エアゾールにより送達された同様のタンパク質で動物を攻撃する、と記載されている。いくつかの動物モデル（モルモット、ラット、非ヒト霊長類）では、エアゾール抗原で攻撃されたヒトにおけるアトピー性喘息に類似した徴候が示された。本発明の化合物の、喘息治療における活性及び有効性を試験するのに適した手順は、Wolyniec, W. W. 等, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (1998) 18: 777とそこに引用された文献に記載されている。

#### 【0067】

さらに、本発明の化合物は乾癬用疾患用の動物モデルにおいて試験することができる。T細胞が乾癬の病原である証拠も示唆されている。本発明の化合物はSchon, M. P. 等, Nat. Med. (1997) 3: 183により記載されているscid/scidマウスモデルにおいて試験することができ、マウスは組織病理学的傷害に類似した乾癬を示す。他の適切なモデルはNickoloff, B. J. 等, Am. J. Pathol. (1995) 146: 580に記載されているようにして調製されたヒト皮膚/scidマウスキメラである。

組換え（トランスジェニック）動物モデルは、ここで同定された遺伝子のコード部分を、トランスジェニック動物作成のための標準的技術を用いて、関心ある動物のゲノムに導入することにより加工できる。トランスジェニック操作の標的として提供できる動物は、限定されないが、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を含む。これらの動物に導入遺伝子を導入するのにこの分野で知られた技術は、前核マイクロインジェクション（Hoppe及びWanger, 米国特許第4, 873, 191号）；胚系列へのレトロウイルス媒介遺伝子転移（例えば、Vander Putten等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]）；胚性肝細胞での遺伝子標的化（Thompson等, Cell 56, 313-321 [1989]）；胚のエレクトロポレーション（Lo, Mol. Cell. Biol. 3, 1803-1814 [1983]）；精子媒介遺伝子転移（Lavitrano等, Cell 57, 717-73 [1989]）を含む。概説のためには、例えば、米国特許第4, 736, 866号を参照のこと。

本発明の目的のために、トランスジェニック動物は、それらの細胞の一部にのみ導入遺伝子を有するもの（「モザイク動物」）を含む。導入遺伝子は、単一の導入遺伝子として、又はコンカテマー、例えば頭部と頭部又は頭部と尾部の直列型として組み込まれる。特定の細胞型への導入遺伝子の選択的導入も、例えば、Lasko等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6232-636 (1992)の技術に従って可能である。

トランスジェニック動物における導入遺伝子の発現は、標準的技術によって監視できる。例えば、導入遺伝子の組み込みの確認にサザンブロット分析又はPCR増幅が用いられる。次いで、mRNA発現のレベルは、インサイツハイブリッド形成、ノーザンブロット分析、PCR、又は免疫組織化学等の技術を用いて分析できる。

さらに、特定組織中への免疫細胞の湿潤を測定するために、動物を、例えば組織学的検査により免疫疾患の病原の徴候について検査してもよい。またブロック実験も実施することができ、ここでトランスジェニック動物は本発明の化合物で処理され、化合物のT細胞増殖刺激又は阻害の度合いが測定される。これらの実験において、上述のようにして調製したPROポリペプチドに結合するブロック抗体は動物に投与され、免疫機能における効果が測定される。

あるいは、動物の胚性細胞に導入されたポリペプチドをコードする変更ゲノムDNAと、その同じポリペプチドをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えの結果、ここに同定するポリペプチドをコードする欠陥又は変更遺伝子を有する「ノックアウト」動物を作成することができる。例えば、特定のポリペプチドをコードするcDNAは、確立された技術に従って当該ポリペプチドをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。

特定のポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部を欠失したり、組み込みを監視するために使用する選択可能なマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングDNA（5'と3'末端の両方）を数キロベース含む〔例えば、相同的組換えベクターの記述についてはThomas and Capecechi, 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）導入され、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する〔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、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、「ノックアウト」動物を作ると言われる。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、ポリペプチドが存在しないことによるある種の病理的状态及び病理的状态の進行に対して防御する能力によって特徴付けられる。

#### 【0068】

##### I. 免疫アジュバント治療

一実施態様において、本発明の免疫刺激化合物は腫瘍（癌）治療における免疫アジュバント治療に使用することができる。T細胞がヒト腫瘍特異的抗原を認識することは十分に確立されている。遺伝子のMAGE、BAGE及びGAGEファミリーによりコードされる腫瘍抗原のグループは全ての成人の正常組織で無症状であるが、腫瘍、例えばメラノーマ、肺腫瘍、頭部及び頸部の腫瘍、膀胱癌においてはかなりの量が発現している。Desmet, C.等, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 7149。T細胞の同時刺激により、インビトロ及びインビボの双方において、腫瘍の退行及び抗腫瘍反応が誘発されることが示されている。Melerio, I.等, Nature Medicine (1997) 3: 682; Kwon, E. D.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94: 8099; Lynch, D. H.等, Nature Medicine (1997) 3: 625; Finn, O. J.及びLotze, M. T., J. Immunol. (1998) 21: 114。本発明の刺激化合物はアジュバントとして単独で又は成長調節剤、細胞障害薬又は化学療法剤と共に投与することができ、T細胞増殖／活性化及び腫瘍抗原に対する抗腫瘍反応を刺激する。成長調節剤、細胞障害薬又は化学療法剤は既知の投与方法で使用されている従来からの量で投与することができる。本発明の化合物による免疫刺激活性により、成長調節剤、細胞障害薬又は化学療法剤の量を減らすことができ、よって、潜在的に患者に対する毒性を低下させることができる。

##### J. 候補薬についてのスクリーニングアッセイ

候補薬のスクリーニングアッセイは、ここで同定される遺伝子にコードされるポリペプチド、又はその生物学的に活性な断片と結合又は抱合する化合物、あるいは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、特に小分子候補薬の同定に適したものにしている、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングに従うアッセイを含む。考慮される小分子とは、合成有機又は無機化合物を含み、それらは、ペプチド、好ましくは可溶性ペプチド、（ポリ）ペプチド-免疫グロブリン融合体、特に、限定されないが、ポリマー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、及びそれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。アッセイは、種々の形式で実施でき、この分野で良く特徴付けられたタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ及び細胞ベースのアッセイを含む。

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PROポリペプチドと、これら2つの成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間で接触させることを必要とすることにおいて共通する。

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるポリペプチド、即ち候補薬が、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、固定化すべき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、そのペプチド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。

候補化合物がここで同定される遺伝子にコードされる特定のタンパク質と相互作用するが結合しない場合、そのタンパク質との相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Chevray及びNathans [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)] に開示されているようにして、Fields及び共同研究者等 [Fields及びSong, Nature (London) 340, 245-246 (1989); Chien等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991)] に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより監視することができる。酵母菌GAL4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-lacZリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（MATCHMAKER（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。

ここで同定される遺伝子と他の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、次のように試験することができる：通常は、遺伝子の生成物及び細胞内又は外成分を含む反応混合物を、条件下で2つの生成物が相互作用及び結合する時間に渡って調製する。試験化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物有り又は無しで実施する。さらに、第3の反応混合物にプラシーボを添加してポジティブ対照としてもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は外成分との結合（複合体形成）は上記のように監視する。対照反応において複合体が形成され、試験化合物を含む反応混合物ではしないことは、試験化合物が試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を妨害することを示す。

【0069】

## K. 免疫関連疾患の治療のための組成物及び方法

免疫関連疾患の治療に有用な組成物は、限定するものではないが、例えば、T細胞の増殖／活性化、リンホカインの放出、又は免疫細胞の浸潤等の免疫機能を阻害又は刺激するタンパク質、抗体、有機小分子、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、三重螺旋分子を含む。

例えば、アンチセンスRNA及びRNA分子は、標的mRNAにハイブリッド形成してタンパク質翻訳を妨害することによりmRNAの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリッド形成、次いでヌクレオチド鎖切断的切断により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4: 469-471 (1994)及びPCT公報、番号WO 97/33551 (1997年9月18日公開)を参照のこと。

転写阻害に用いられる三重螺旋形成における核酸分子は単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三重螺旋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、PCT公報、番号WO 97/33551, 上掲を参照のこと。

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任意のもの又は任意の組合せにより、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。

### 【0070】

## L. 抗体

本発明は、さらにT細胞の増殖、エオシン好性白血球の浸潤、血管透過性等を阻害（アンタゴニスト）又は刺激（アゴニスト）する抗-PRO抗体及びその断片を提供するものである。このような抗-PRO抗体又はその断片の例としては、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る。

### 1. ポリクローナル抗体

抗-PRO抗体はポリクローナル抗体を含む。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫化剤、及び所望するのであればアジュバントを、一又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫化剤及び／又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫化剤は、PRO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、これらに限られないが、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。

### 【0071】

### 2. モノクローナル抗体

あるいは、抗-PRO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PRO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, Academic Press, (1986) pp. 59-103〕。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髓腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髓腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培養培地で培養される。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HPRRT）を欠いていると、ハイブリドーマの培養培地は、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髓腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalik Institute Cell Distribution Centerやバージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髓腫及びマウスーヒト異種骨髓腫株化細胞も記載されている〔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、PROに対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイする。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、当該分野において既知である。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。

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

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

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

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

### 【0072】

#### 3. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗-PRO抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト（例えばマウス）抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片（例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列）であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる〔Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-329 (1988); 及び Presta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992)〕。

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の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〔Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1992); Marks等, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)〕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。また、Cole等及びBoerner等の技術も、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.

10

20

30

40

50

L i s s . p . 7 7 ( 1 9 8 5 ) ; B o e r n e r 等 , J . I m m u n o l . , 1 4 7 ( 1 ) : 8 6 - 9 5 ( 1 9 9 1 ) ; 米 国 特 許 第 5 , 7 5 0 , 3 7 3 号 ] 。 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 し て 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 , 5 4 5 , 8 0 7 号 ; 同 第 5 , 5 4 5 , 8 0 6 号 ; 同 第 5 , 5 6 9 , 8 2 5 号 ; 同 第 5 , 6 2 5 , 1 2 6 号 ; 同 第 5 , 6 3 3 , 4 2 5 号 ; 同 第 5 , 6 6 1 , 0 1 6 号 、 及 び 次 の 科 学 文 献 : M a r k s 等 , B i o / T e c h n o l o g y 1 0 , 7 7 9 - 7 8 3 ( 1 9 9 2 ) ; L o n b e r g 等 , N a t u r e 3 6 8 8 5 6 - 8 5 9 ( 1 9 9 4 ) ; M o r r i s o n , N a t u r e 3 6 8 , 8 1 2 - 1 3 ( 1 9 9 4 ) ; F i s h w i l d 等 , N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 1 4 , 8 4 5 - 5 1 ( 1 9 9 6 ) ; N e u b e r g e r , N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 1 4 , 8 2 6 ( 1 9 9 6 ) ; L o n b e r g 及 び H u s z a r , I n t e r n . R e v . I m m u n o l . 1 3 6 5 - 9 3 ( 1 9 9 5 ) に 記 載 さ れ て い る 。

また、抗体は上述した既知の選択及び／又は突然変異誘発を使用し、親和成熟させてもよい。好ましい親和成熟抗体は、成熟抗体が調製される（一般的にマウス、ヒト化又はヒトの）出発抗体のものよりも、5倍、より好ましくは10倍、さらに好ましくは20又は30倍の親和性を有する。

#### 【0073】

#### 4. 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。本ケースにおいて、結合特異性の一方はPRO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（M i l s t e i n 及び C u e l l o , N a t u r e , 3 0 5 : 5 3 7 - 5 3 9 [ 1 9 8 3 ] ）。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、アフニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のWO 93/08829、及びTraunecker等, E M B O J . , 1 0 : 3 6 5 5 - 3 6 5 6 ( 1 9 9 1 ) に開示されている。

所望の結合特異性（抗体－抗原結合部位）を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、CH2及びCH3領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域（CH1）が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするDNA、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作成するための更なる詳細については、例えばSuresh等, M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , 1 2 1 : 2 1 0 ( 1 9 8 6 ) を参照されたい。

#### 【0074】

WO 96/27011に記載された他のアプローチによれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収される異種二量体の割合を最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのCH3領域の少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖（例えばチロシン又はトリプトファン）と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」は、大きなアミノ酸側鎖が小さいもの（例えばアラニン又はスレオニン

）と置き換えられた第2の抗体分子の界面に作り出される。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片（例えば、 $F(ab')_2$  二重特異性抗体）として調製できる。抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, Science, 229:81 (1985) は無傷の抗体をタンパク分解性に切断して $F(ab')$ 断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生された $Fab'$ 断片はついでチオニトロベンゾアート (TNB) 誘導体に転換される。 $Fab'$ -TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元により $Fab'$ -チオールに再転換し、他の $Fab'$ -TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

大腸菌から $Fab'$ 断片を直接回収でき、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992) は完全にヒト化された二重特異性抗体 $F(ab')_2$ 分子の製造を記述している。各 $Fab'$ 断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞及びErbB2レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelnyら, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体の $Fab'$ 部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン( $V_L$ )に重鎖可変ドメイン( $V_H$ )を結合してなる。従って、一つの断片の $V_H$ 及び $V_L$ ドメインは他の断片の相補的 $V_L$ 及び $V_H$ ドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖 $Fv(sFv)$ ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruberら, J. Immunol. 152:5368 (1994) を参照されたい。

#### 【0075】

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttら J. Immunol. 147:60 (1991)。

例示的な二重特異性抗体は、ここに与えられたPROポリペプチドの2つの異なるエピトープに結合しうる。あるいは、抗-PROアームは、特定のPROポリペプチド発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、T細胞レセプター分子（例えばCD2、CD3、CD28、又はB7）等の白血球上のトリガー分子又は $Fc\gamma RI(CD64)$ 、 $Fc\gamma RI I(CD32)$ 及び $Fc\gamma RI I I(CD16)$ 等のIgG( $Fc\gamma R$ )に対するFcレセプターに結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体は特定のPROポリペプチドを発現する細胞に細胞障害薬を局在化させるためにも使用されうる。これらの抗体はPROポリペプチド結合アーム及び細胞障害薬又は放射性キレート化剤、例えばEOTUBE、DPTA、DOTA、又はTETAと結合するアームを有する。関心ある他の二重特異性抗体はPROポリペプチドに結合し、そしてさらに組織因子(TF)に結合する。

10

20

30

40

50

## 5. ヘテロ抱合体抗体

ヘテロ抱合体抗体は2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため〔米国特許第4, 676, 980号〕及びHIV感染の治療のために〔WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089〕提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4, 6767, 980号に開示されているものが含まれる。

10

### 【0076】

## 6. 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、例えば免疫関連疾患の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。

20

## 7. 免疫複合体

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、又はその断片)などの細胞障害薬、あるいは放射性同位体(即ち、放射性抱合)に抱合された抗体を含む免疫複合体にも関する。

このような免疫抱合体の生成に有用な化学療法剤は上記した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modectin)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・アメリカナ(Phytolacca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crocin)、サパオナリア・オフィシナリス(saponaaria 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(tricotechnene)を含む。様々な放射性ヌクレオチドが放射性抱合体の生成に利用可能である。例として、<sup>212</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>131</sup>In、<sup>90</sup>Y及び<sup>186</sup>Reを含む。

30

40

抗体及び細胞障害薬の抱合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサレンジアミン等)、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

50

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、V i t e t t a等，S c i e n c e 238：1098（1987）に記載されたように調製することができる。カーボン－１４－標識１－イソチオシアナトベンジル－３－メチルジエチレントリアミン五酢酸（M X－D T P A）は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。W O 94／11026 参照。

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

10

#### 【0077】

##### 8．免疫リポソーム

また、ここに開示するタンパク質、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、E p s t e i n等，P r o c．N a t l．a c a d．S c i．U S A，82：3688（1985）；H w a n g等，P r o c．n a t l．A c a d．S c i．U S A，77：4030（1980）；及び米国特許第4，485，045号及び同第4，544，545号に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5，013，556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びP E G－誘導ホスファチジルエタノールアミン（P E G－P E）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、定められた孔サイズのフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体のF a b '断片は、M a r t i n等，J．B i o l．C h e m．257：286－288（1982）に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに抱合され得る。化学治療剤（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。G a b i z o n等，J．N a t i o n a l C a n c e r I n s t．81（19）1484（1989）参照。

20

#### 【0078】

##### 9．抗体の製薬組成物

本発明の活性P R O分子（例えばP R Oポリペプチド、抗－P R O抗体、及び／又はその変異体）、並びに上述のスクリーニングアッセイで同定された他の分子は、免疫関連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。

本発明の活性P R O分子、好ましくはポリペプチド又は抗体の治療用製剤は、所望される程度の純度を持つ活性分子を、親油性製剤又は水性溶液の形態で、任意の製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される（R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e 16t h e d i t i o n，O s o l，A．E d．[1980]）。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸、クエン酸、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イド；ヘキサメトニウムクロイド；ベンズアルコニウムクロイド；ベンズエトニウムクロイド；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－クレゾールなど）；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、又はデキストリンを含む単糖類、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などの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Z n－タンパク質錯体）；及び／又は又は又はトウイーン（T W E

30

40

50

EN) (商品名)、プルロニクス (PLURONICS) (商品名)、及びポリエチレングリコール (PEG) 等の非イオン性界面活性剤を含む。

ここで開示されたスクリーニングアッセイで同定された化合物は、同様の方式でこの分野で知られた標準技術を用いて製剤することができる。

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

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

また、活性PRO分子は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)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。

徐放性製剤又はPRO分子を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、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。徐放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))、ポリアクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸とγ-エチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT (商品名)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リユープロリドからなる注射可能なマイクロスフェア)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは37℃の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオー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。

#### 【0079】

##### N. 治療方法

本発明のポリペプチド、抗体及び他の活性物質は、組織への炎症細胞の浸潤、T細胞の増殖の刺激、T細胞の増殖の阻害、血管透過性の増加又は低減又はそれらの阻害によって特徴付けられるものを含む、T細胞媒介疾患等の種々の免疫関連疾患及び病状を治療するために使用できると考えられる。

本発明のポリペプチド、抗体及び他の化合物で治療される病状又は疾患の例には、限定するものではないが、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ様関節炎、若年性慢性関節炎、骨関節症、脊椎関節症、全身性硬化症(強皮症)、特発性炎症ミオパシー(皮膚筋炎、多発性筋炎

）、シェーグレン症候群、全身性血管炎（systemic vasculitis）、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血（免疫再生不良性貧血、発作性夜間血色素尿）、自己免疫性血小板減少（特発性血小板減少性紫斑病、免疫仲介血小板減少）、甲状腺炎（グレーブス疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）、真性糖尿病、免疫仲介腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）、例えば多発性硬化症のような中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、特発性脱髄性多発神経障害、又はギラン・バレー症候群、及び慢性炎症脱髄性多発神経障害、肝疾患、例えば伝染性肝炎（A型、B型、C型、D型、E型肝炎及び他の非肝炎性（nonhepatotropic）ウィルス）、自己免疫性慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎；クローン病）、グルテン過敏性腸疾患、ウィップル病、水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、乾癬、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹等のアレルギー性疾患、好球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎のような肺の免疫疾患、拒絶反応及び移植片対宿主疾患を含む移植関連疾患が含まれる。

全身性紅斑性狼瘡において、疾患の中心媒介物は自己タンパク質／組織に対する自己反応性抗体の産出であり、続いて、免疫媒介炎症が生じ、抗体は直接的又は間接的に組織傷害を媒介する。しかし、Tリンパ球は組織ダメージに直接関与しないことが示されており、Tリンパ球は自己反応性抗体の発育に必要である。よって、疾患の発生はTリンパ球に依存している。腎臓、肺、筋骨格、皮膚粘膜、眼、中枢神経系、心臓血管系、胃腸管、骨髄及び血液を含む複数の器官及び系が臨床的な影響を受ける。

#### 【0080】

リウマチ様関節炎（RA）は、主に複数の関節の滑膜に係る慢性全身性自己免疫疾患であり、結果として関節軟骨に傷害が生じる。病原はTリンパ球依存であり、リウマチ因子、自己IgGに指向する自己抗体の生成を付随し、結果として関節体液及び血液において高レベルに達する免疫複合体が形成される。関節におけるこれらの複合体は、滑膜へのリンパ球及び単球の顕著な浸潤と、続いての顕著な滑膜変化を誘発しうる；多数の好中球の添加により同様の細胞で浸潤されるならば関節空間／体液でもある。影響を受けている組織は、多くの場合対照的なパターンで主に関節である。しかしながら、2つの主要な形態の関節外疾患も生じる。一方の形態は進行中の進行性関節疾患及び肺線維症の局部的障害、血管炎、及び皮膚潰瘍を伴う関節外障害の発達である。関節外疾患の第2の形態はいわゆるフェルティー症候群であり、RA疾患経路の末期、時々関節疾患が鎮静した後に生じ、好中球減少、血小板減少及び脾肥大の存在に関与する。これは、梗塞、皮膚潰瘍及び壊疽の形成を伴う多数の器官及び血管炎に付随する。多くの場合、患者では、発病している関節上にある皮下組織にリウマチ様小結節が発達し；小結節は、混合炎症細胞浸潤に包囲された壊死性中心を有する。RAで生じる可能性のある他の徴候には：心外膜炎、胸膜炎、冠動脈炎、肺線維症を伴う間質性肺炎、乾性角結膜炎、及びリウマチ様小結節が含まれる。

若年性慢性関節炎は、多く場合16才以下で発症する慢性特発性炎症疾患である。その表現型はRAといくつかの類似点があり；リウマチ因子がポジティブである患者の中には若年性リウマチ様関節炎に分類されるものもある。この疾患は主な3つのカテゴリー：小関節（paucarticular）、多関節（polyarticular）及び全身性ものに亜分類される。関節炎は重度で局所的な破壊が生じ、関節強直症及び遅延成長に至るおそれもある。他の徴候には慢性前ブドウ膜炎及び全身性アミロイド症が含まれる。

脊椎関節症は、一般的にHLA-B27遺伝子生成物の発現に関連した、いくつかの共通した臨床的特徴を有する疾患のグループである。疾患には：強直症、脊椎炎（spondylitis）、ライター症候群（反応性関節炎）、炎症性大腸疾患に関連した関節炎、乾癬に関連した脊椎炎、若年発生脊椎関節症及び未分化脊椎関節症が含まれる。区別する特徴には、脊椎炎を伴うか伴わない仙腸関節炎；HLA-B27（血清学的には、クラスI MHCのHLA-B座位にある定義された対立遺伝子）を伴う炎症非対称性関節炎；眼の炎症、及び他のリウマチ疾患に関連した自己抗体の不在が含まれる。疾患の誘導にお



る鍵として関わるほとんどの細胞はCD8+Tリンパ球であり、クラスI MHC分子により付与される抗原を標的としている細胞である。CD8+T細胞は、MHCクラスI分子により発現した外来ペプチドであるかのように、クラスI MHC対立遺伝子HLA-B27と反応する。HLA-B27のエピトープが細菌性又は他の微生物の抗原エピトープを模倣し、よってCD8+細胞の反応が誘発されると仮定されている。

全身性硬化症（強皮症）は病因がよく知られていない。疾患の特徴は皮膚の硬化であり；これは活性化炎症プロセスにより誘発される。強皮症は局部的又は全身的であり；血管障害が一般的で、微小血管系における内皮細胞傷害は全身性硬化症の発達における初期の重要な事象であり；血管傷害は免疫媒介されうる。免疫学的基準では、皮膚障害における単核細胞浸潤の存在、多くの患者において抗細胞核抗体の存在を意味する。多くの場合、ICAM-1は皮膚障害における線維芽細胞の細胞表面をアップレギュレーションし、これらの細胞と相互作用するT細胞が疾患の病因における役割を担っていることが示唆される。関連する他の器官には：胃腸管：萎縮症及び線維症があり、結果として異常なぜん動／運動性となっている平滑筋；腎臓：小弓形及び小葉間動脈に影響を及ぼし、結果として腎皮質の血流が低下し、タンパク尿、高窒素血尿及び高血圧になる同心性内皮下内膜増殖；骨格筋：萎縮、間質性線維症；炎症：肺：間質性肺炎及び間質性線維症；及び心臓：収縮バンド壊死、癒痕／線維症が含まれる。

#### 【0081】

皮膚筋炎、多発性筋炎及び他のものを含む特発性炎症ミオパシーは病因がよく知られていない慢性筋肉炎症疾患であり、筋肉の弱化に至る。筋肉損傷／炎症は多くの場合対称的で進行性である。自己抗体は多くの形態と関連している。これらの筋炎特異的自己抗体は、タンパク質合成に係る成分、タンパク質及びRNAに対して産生されてその機能を阻害する。

シェーグレン症候群は、免疫媒介炎症、続く涙腺及び唾液腺の機能破壊によるものである。この疾患は炎症結合組織疾患を伴うか又は伴わない。この疾患は、双方ともが小RNA-タンパク質複合体であるRo及びLa抗原に対する抗体産出に関連している。障害により、結果として乾性角結膜炎、biliary硬変を含む他の徴候又は会合を伴う口内乾燥、末梢又は感覚ニューロパシー、及び明白な紫斑病に至る。

全身性血管炎症症は主な障害が炎症で、続いて血管にダメージを受け、結果として影響を受けた脈管により供給される組織に虚血／壊死／変性が生じ、最終的な末端器官ではいくつかのケースで機能障害になるといった疾患である。また、第2の障害として血管炎（vasculitides）、又は他の免疫炎症媒介疾患、例えばリウマチ様関節炎、全身性硬化症等、特に免疫複合体の形成に関連した疾患等の続発症が生じるおそれがある。主な全身性血管炎症症グループの疾患には：全身壊死性血管炎：多動脈炎結節（polyarteritis nodosa）、アレルギー性脈管炎、及び肉芽腫症、多脈管炎：ヴェゲナー肉芽腫症；リンパ腫様肉芽腫症：及び巨細胞動脈炎が含まれる。種々の血管炎には：粘膜皮膚リンパ節症候群（MLNS又は川崎病）、単離したCNS血管炎、ベヘット（Behet's）病、閉塞性血栓性血管炎（バージャー病）及び皮膚壊死性細静脈炎（venulitis）が含まれる。列挙した血管炎のほとんどの種類の病原メカニズムは、主に脈管壁に免疫グロブリン複合体が付着し、続いてADCC、補体活性又は双方を介して炎症反応が誘発されることによると考えられている。

サルコイドーシスは、体内のほとんど任意の組織中に類上皮細胞肉芽腫が存在し、肺ではほとんど一般的に包含されることにより特徴付けられる、病因がよく知られていない病状である。病原には疾患部位に活性マクロファージ及びリンパ球が残留していることに関連しており、続いてこれらの細胞種より放出される局部的又は全身的活性物質の放出の結果として慢性続発症が生じる。

自己免疫性溶血性貧血、免疫再生不良性貧血、発作性夜間血色素尿を含む自己免疫性溶血性貧血は、赤血球細胞（いくつかのケースにおいては、血小板を含む他の血液細胞）表面で発現する抗原と反応する抗体が産出される結果によるものであり、補体媒介溶解及び／又はADCC／Fc-レセプター-媒介メカニズムを介して、その抗体被覆細胞の除去に反

10

20

30

40

50

映される。

#### 【0082】

他の臨床的セッティング (s e t t i n g) における血小板減少性紫斑病及び免疫仲介血小板減少を含む自己免疫性血小板減少では、抗体又は補体が血小板に接合し、続いて補体溶解、A D C C 又は F c - レセプター-媒介メカニズムによる除去の結果として生じる。グレーブス疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎を含む甲状腺炎は、甲状腺内に多くの場合特異的に存在するタンパク質と反応する抗体の産出を伴う、甲状腺抗原に対する自己免疫反応の結果によるものである。実験用モデルには：内在的モデルラット (B U F 及び B B ラット) 及びチキン (肥満チキン種)；誘導性モデル：チログロブリン、甲状腺ミクロソーム抗原 (甲状腺ペルオキシダーゼ) を用いた動物の免疫化が含まれる。 10

I 型真性糖尿病又はインシュリン依存性糖尿病は膵臓小島  $\beta$  細胞の自己免疫破壊であり；この破壊は自己抗体及び自己反応性 T 細胞により媒介される。また、インシュリン又はインシュリン様レセプターに対する抗体は、インシュリン-非-反応性の表現型を産出することができる。

糸球体腎炎及び尿細管間質性腎炎を含む免疫仲介腎疾患は、腎抗原に対する自己反応性抗体又は T 細胞が産出される結果により直接的に、又は他の非腎抗原に対して反応する、腎臓における抗体及び／又は免疫複合体の沈着の結果により間接的に、腎組織に抗体又は T 細胞媒介傷害が生じることによるものである。よって、免疫複合体の形成の結果生じる他の免疫媒介疾患により、間接的続発症等の免疫媒介腎疾患が誘発される。直接的及び間接的免疫メカニズムの双方により、結果として腎組織における障害発達が産出／誘発されるといった炎症反応が生じ、器官機能が損なわれ、いくつかのケースでは腎臓機能不全が進行する。体液及び細胞免疫メカニズムに双方が障害の病原に関与している。 20

多発性硬化症のような中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、特発性脱髄性多発神経障害、又はギラン-バレー症候群；及び慢性炎症脱髄性多発神経障害は、自己免疫基準であり、神経脱髄が生じて、オリゴデンドロサイト又はミエリンに直接的に起因するダメージの結果によるものと考えられている。M S において、疾患の誘発及び進行は T リンパ球に依存すると示唆される証拠がある。多発性硬化症は、T リンパ球依存性であり、再発性弛緩経路又は慢性進行経路のいずれかを有する脱髄疾患である。病因はよく知られていないが、ウイルス感染、遺伝的素因、環境及び自己免疫性の全てが寄与している。障害は T 細胞媒介小膠細胞の優先的湿潤、及びマイクロファージの浸潤を含み；C D 4 + T リンパ球は障害において優先的な細胞型であった。オリゴデンドロサイトの細胞死及び続く脱髄のメカニズムはよく知られていないが、T リンパ球の駆動によると思われる。 30

好球性肺炎；特発性肺線維症及び過敏性肺炎のような炎症及び線維症の肺疾患には、調節されない免疫炎症反応が関連している。反応を阻害することは治療的に有益なことである。

水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患は自己抗体により媒介され、T リンパ球に依存して発生する。

乾癬は T リンパ球媒介炎症疾患である。障害は T リンパ球、マクロファージ及び抗原プロセッシング細胞及びある種の好中球の浸潤が含まれる。 40

#### 【0083】

喘息；アレルギー性鼻炎；アトピー性皮膚炎；食物過敏症及び蕁麻疹等を含むアレルギー性疾患は T 細胞依存性である。この疾患は炎症により誘発される T リンパ球、及び I g E 媒介炎症、又は双方の組合せにより主に媒介される。

拒絶反応及び移植片対宿主疾患 (G V H D) を含む移植関連疾患は T リンパ球依存性であり；T リンパ球の機能を阻害することで改善される。免疫及び／又は炎症反応への介在が有益である他の疾患には、限定するものではないがウイルス感染 (限定するものではないが A I D S、A 型、B 型、C 型、D 型及び E 型肝炎、ヘルペス)、細菌感染、真菌感染、原生動物感染及び寄生虫感染 (M L R を刺激する分子 (又は誘導体／アゴニスト) を治療に利用し、感染要因に対する免疫反応性を増強することができる)、M L R を刺激する ( 50

分子／誘導体／アゴニスト）を治療に利用し、受け継ぎ、獲得し、感染誘発された（例えばH I V感染）又は医原性（例えば化学療法）免疫欠損疾患の病状に対する免疫反応増強することができる免疫欠損疾患、及び異常増殖が含まれる。

ヒト癌患者の中には、異常増殖細胞上の抗原に反応する抗体及び／又はTリンパ球が発育しているものもいることが示されている。また、異常増殖のある動物モデルにおいても、免疫反応を増強することで、特定の異常増殖が拒絶又は退行する結果になることが示されている。M L RにおけるTリンパ球反応を増強する分子は、異常増殖に対する免疫反応を増強するインビボにて利用される。M L RにおけるTリンパ球増殖反応を増強する分子（又は拮抗方式で同様のレセプターに影響を及ぼす小分子アゴニスト又は抗体）は、癌の治療に治療的に使用することができる。また、M L Rにおいてリンパ球反応を阻害する分子は、異常増殖中に、新生物に対する免疫反応抑制するように、インビボで機能し；このような分子は新生物細胞自体により発現するか、又はそれらの発現は他の細胞中の新生物により誘発され得る。このような阻害分子（抗体、小分子アンタゴニスト又は他の手段）の拮抗作用により免疫媒介腫瘍拒絶が増強される。

加えて、炎症誘発性を有する分子を阻害することは、再灌流傷害；脳卒中；心筋梗塞；アテローム性動脈硬化；急性肺傷害；出血性ショック；火傷；敗血症／敗血症ショック；急性尿細管壊死；子宮内膜症；変性関節疾患及び膵炎（p a n c r e a t i s）の治療に有益である。

本発明の化合物、例えばポリペプチド又は抗体は、哺乳動物、好ましくはヒトに、周知の方法、例えば、ボーラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入（鼻孔内、肺内）経路などにより投与される。抗体の静脈内又は吸入投与が好ましい。

免疫アジュバント治療、他の治療的養生法において、抗癌剤を、本発明のタンパク質、抗体又は化合物の投与と組み合わせて投与してもよい。例えば、本発明の免疫アジュバントで治療される患者は、抗癌剤（化学療法剤）又は放射線治療を受けてもよい。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。そのような化学療法に対する調製法及び用量スケジュールはまたC h e m o t h e r a p y S e r v i c e M . C . P e r r y 編, W i l l i a m s & W i l k i n s , B a l t i m o r e , M D ( 1 9 9 2 ) にも記載されている。化学療法剤は、免疫アジュバントの投与に先立って、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。加えて、タモキシフェン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（E P 6 1 6 8 1 2 参照）を、それらの分子について知られた用量で付与してもよい。

また、他の免疫疾患に関連した、又は腫瘍に関連した抗原に対する抗体、例えばC D 2 0、C D 1 1 a、C D 1 8、E r b B 2、E G F R、E r b B 3、E r b B 4、又は血管内皮因子（V E G F）に結合する抗体を投与することも好ましい。別に、あるいは加えて、同一のもの又はここに開示した二又はそれ以上の異なる抗原に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。一実施態様では、P R Oポリペプチドは、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P R Oポリペプチドを投与する。しかしながら、同時投与、又は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P R Oポリペプチドとの組み合わせ（相乗）効果により減少させ得る。

重篤な免疫関連疾患の治療又は低減のための、本発明の化合物の適切な用量は、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化合物に対する反応、及び主治医の裁量に依存する。化合物は、適切には患者に一回又は一連の治療に渡って適切に投与される。

例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約1  $\mu$  g / k g から1 5 m g / k g（例えば、0 . 1 - 2 0 m g / k g）のポリペプチド又は抗体が、例えば、一又はそれ以上の別々の投

10

20

30

40

50

与あるいは連続注入のいずれにしても、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な1日の用量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ の範囲又はそれ以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。この治療の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易に監視される。

#### 【0084】

##### O. 製造品

本発明の他の実施態様では、上記の疾患の診断又は治療に有用な物質（例えばPRO分子を含有するもの）を含む製造品が提供される。この製造品は容器と使用説明書とを含んでなる。好適な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、及び試験管を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの種々の材料から形成されてよい。容器は、状態を診断し治療するの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貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の活性剤は通常、本発明のポリペプチド又は抗体である。容器上又は添付される使用説明書又はラベルは、組成物が選択した状態の診断又は治療のために使用されることを示す。製造品はさらに、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロース溶液などの製薬的に許容されるバッファーを含む第2の容器を具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用上の指示を付けたパッケージ挿入物を含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

##### P. 免疫関連疾患の診断及び予知

或る種の免疫関連疾患で過剰発現されるタンパク質等の細胞表面タンパク質は候補薬剤又は疾患治療の優れた標的である。同じタンパク質は免疫関連疾患で増幅された遺伝子にコードされる分泌タンパク質とともに、これらの疾患の診断及び予知における用途が見出される。例えば、多発性硬化症、リウマチ様関節炎、又は他の免疫関連疾患で増幅された遺伝子のタンパク質産物に対する抗体は診断又は予知として使用できる。

例えば、抗体断片を含む抗体は、増幅又は過剰発現された遺伝子にコードされるタンパク質（「マーカー遺伝子産物」）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。これらの技術は、過剰発現した遺伝子が細胞表面タンパク質をコードする場合に特に適切である。このような結合アッセイは、本質的に上述したように実施される。

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。

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参考文献の全体を、参照としてここに取り込む。

#### 【0085】

##### （実施例）

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC受託番号により以下の実施例及び明細書全体を通して同定されている細胞の供給源はバージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションである。特記しない限り、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る：Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press N. Y., 1989; Ausubel等, Current Proto

cols 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, M. J., Oligonucleotide synthesis, IRL Press, Oxford, 1984; R. I. Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan等, Current Protocols in Immunology, 1991。 10

#### 【0086】

##### 実施例1

ヒトPRO200、PRO204、PRO212、PRO216、PRO226、PRO240、PRO235、PRO245、PRO172、PRO273、PRO272、PRO332、PRO526、PRO701、PRO361、PRO362、PRO363、PRO364、PRO356、PRO531、PRO533、PRO1083、PRO865、PRO770、PRO769、PRO788、PRO1114、PRO1007、PRO1184、PRO1031、PRO1346、PRO1155、PRO1250、PRO1312、PRO1192、PRO1246、PRO1283、PRO1195、PRO1343、PRO1418、PRO1387、PRO1410、PRO1917、PRO1868、PRO205、PRO21、PRO269、PRO344、PRO333、PRO381、PRO720、PRO866、PRO840、PRO982、PRO836、PRO1159、PRO1358、PRO1325、PRO1338、PRO1434、PRO4333、PRO4302、PRO4430及びPRO5727ポリペプチドをコードするcDNAクローンの単離 20

以下に記載するcDNAクローンを単離するための様々な技術を使用した。使用した方法の一般的な記載は直ぐ後に示すが、単離された特定の配列に関連した詳細は各天然配列に対して別個に記載している。PROポリペプチドの実際の配列はATCCに寄託されたクローンによりコードされるか、又はその中に含まれるものであり、寄託された配列とここに開示された配列との間に不一致がある場合は、寄託された配列が正しい配列であると理解される。 30

##### ECD相同性

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（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）、私的ESTデータベース（例えば、LIFESeq（商品名）、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）、及びジェネンテクの企業のESTを含む。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EST配列の6フレーム翻訳に対してECDタンパク質配列を比較することで実施した。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を、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配列に構築した。 40

公的及び私的データベースから引き出した種々のESTを使用して、コンセンサスDNA配列を構築した。次いでオリゴヌクレオチドを合成し、PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリを同定し、またここで同定された特定の天然配列PROポリペプチドをコードする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。

全長天然配列クローン源に対し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 50

ブラリからのDNAを、以下に記載する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の一方を用いて、特定の天然配列PROポリペプチドをコードするクローンを単離するのに使用した。

cDNAライブラリ構築のためのRNAは、胎児肺、胎児肝臓、胎児脳、小腸、胃筋肉細胞等を含む、種々のヒト組織ライブラリから単離した。cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSalIヘミキナーゼアダプターに結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分類し、適切なクローニングベクター（pRKB等；pRK5BはSfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である；Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991) 参照）に、独特のXhoI及びNotI部位において、所定の方

10

### 【0087】

アミラーゼ酵母菌スクリーニング：

#### 1. オリゴdTプライムcDNAライブラリの調製

mRNAを種々の組織（例えば、上述のECD相同性の手法において示したもの）からInvitrogen, San Diego, CAからの試薬とプロトコルを用いて単離した（Fast Track 2）。このRNAを、Life Technologies, Gaithersburg, MD（Super Script Plasmid System）からの試薬とプロトコルを用いて、ベクターpRK5DにおいてオリゴdTプライムしたcDNAライブラリの作成に使用した。この方法において、二本鎖cDNAを1000bpを越えるサイズに分類し、SalI/NotI結合cDNAをXhoI/NotI切断ベクターにクローニングした。pRK5Dは、sp6転写開始部位に続いてSfiI制限酵素部位がありXhoI/NotI cDNAクローニング部位がさらに続くクローニングベクターである。

20

#### 2. ランダムプライムcDNAライブラリの調製

一次cDNAクローンの5'末端を優先的に提示するために二次cDNAライブラリを作成した。Sp6 RNAを（上述した）一次ライブラリから生成し、このRNAを、ベクターpSST-AMY. 0においてLife Technologies（上で参照したSuper Script Plasmid System）からの試薬とプロトコルを用いてランダムプライムしたcDNAライブラリの生成に使用した。この方法において、二本鎖cDNAを500-1000bpにサイズ分類し、平滑末端でNotIアダプターに結合させ、SfiI部位で切断し、SfiI/NotI切断ベクターにクローニングした。pSST-AMY. 0は、cDNAクローニング部位の前に酵母アルコールデヒドロゲナーゼプロモータを持ち、クローニング部位の後においてマウスアミラーゼ配列（分泌シグナルを持たない成熟配列）に次いで酵母アルコールデヒドロゲナーゼ転写終結区を有するクローニングベクターである。よって、アミラーゼ配列と読み枠を合わせて融合するこのベクターにクローニングされたcDNAは、適当に形質移入された酵母コロニーからのアミラーゼの分泌を導くであろう。

30

40

#### 3. 形質転換及び検出

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

50

ールを実施した。

酵母方法は3つの範疇に分けられる：(1)酵母のプラスミド／cDNA結合ベクターでの形質転換；(2)アミラーゼを分泌する酵母クローンの検出及び単離；及び(3)酵母コロニーから直接的な挿入物のPCR増幅及び配列決定と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<sup>+</sup>、SUC<sup>+</sup>、GAL<sup>+</sup>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作用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)、この翻訳後経路に関与する他のタンパク質(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した。次いで、形質転換細胞を寒天からYEPD複合培地ブロス(100ml)に播種し、30℃で終夜成長させた。YEPDブロスは、Kaiser等, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 207 (1994)に記載されているようにして調製した。終夜培養は、次いで新鮮なYEPDブロス(500ml)中におよそ $2 \times 10^6$ 細胞/ml(約OD<sub>600</sub> = 0.1)となるまで希釈し、 $1 \times 10^7$ 細胞/ml(約OD<sub>600</sub> = 0.4-0.5)まで再成長させた。

#### 【0088】

次いで細胞を収集し、5,000rpmで5分間の間、Sorval GS3ローター中のGS3ローターボトルに移し、上清を捨て、次いで無菌水中に再懸濁することにより形質転換のために調製し、Beckman GS-6KR遠心機において50mlのファルコン管内で3,500rpmにて再度遠心分離した。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。

形質転換は、マイクロチューブ内で、調製した細胞(100μl)を新鮮な変性一本鎖サケ精巢DNA(Lofstrand Labs, Gaithersburg, MD)及び形質転換DNA(1μg vol. < 10μl)と混合することにより起こした。混合物はボルテックスにより簡単に混合し、次いで40%PEG/TE(600μl, 40%のポリエチレングリコール-4000, 10mMのトリス-HCl, 1mMのEDTA, 100mMのLi2Ac pH7.5)を添加した。この混合物を緩く攪拌し、30℃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℃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(500μl, 10mMのトリス-HCl, 1mMのEDTA pH7.5)への再懸濁に次いで遠心分離した。次いで、細胞をTE(1ml)中に希釈し、アリコート(200μl)を150mm成長プレート(VWR)に予め調製した選択培地上に広げた。

あるいは、複数の少量反応の代わりに、形質転換を1回の大規模反応で実施したが、試薬の量はしかるべくスケールアップした。

用いた選択培地は、Kaiser等, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor press, Cold Spring Harbor, NY, p. 208-210 (1994)に記載されているようにして調製されたウラシルを欠く合成完全デキストロース寒天(SCD-Ura)であった。形質転

換体は30℃で2-3日成長させた。

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

ポジティブコロニーを拾って新鮮な選択培地(150mmプレート)に画線し、良好に単離された同定可能な単一コロニーを得た。アミラーゼ分泌に対してポジティブな良好に単離されたコロニーは、緩衝SCD-Ura寒天への赤色デンプンの直接導入により検出した。ポジティブコロニーは、デンプンを分解して、ポジティブコロニーの周囲に直接目視

10

できる量を形成する能力により決定した。標準的な技術による単離と配列決定により、以下に記載するようにさらなるデータベース検索の基礎となる酵母EST断片を同定した。

#### 【0089】

##### 4. アセンブリ

上述したように同定された酵母EST断片を使用し、種々の発現配列タグ(EST)データベースを検索した。ESTデータベースは、公的ESTデータベース(例えばGenBank, Merck/Wash U)及び私的ESTのデータベース(例えば、LIFE SEQ(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BLAST2 [Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)]を用いてEST配列の6フレーム翻訳とECDタンパク質配列を比較することにより実施した。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配列に構築した。

20

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、コンセンサスDNA配列を、BLAST又はBLAST-2及びphrapの繰り返しサイクルを用いて伸長し、コンセンサス配列を上で議論したEST配列及びジ

30

ェネンテク社の企業のEST配列の供給源を用いて可能な限り伸長させた。このコンセンサス配列に基づいて: 1) PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリを同定するため、及び2) 特定のPROポリペプチドをコードする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。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのDNAを、Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、PCRプライマー対でのPCRによりスクリーニングした。ポジティブライブラリを、次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて関心ある遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

cDNAライブラリ構築のためのRNAを種々のヒト組織から単離した。cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、Not I部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSal Iヘミキナーゼアダプターに結合させ、Not Iで切断し、ゲル電気泳動で適切にサイズ分類し、適切なクローニングベクター(pRKB又はpRKD等; pRK5BはSfi I部位を含まないpRK5Dの前駆体である; Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991)参照)に、独特のXho I及びNot I部位において、所定の方

40

#### 【0090】

シグナルアルゴリズム:

50



ジェネンテック社によって開発された企業のシグナル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）なデータベースからの発現配列タグ（EST）並びに集団化及び構築されたEST断片に使用した。シグナル配列アルゴリズムは、考慮下の配列又は配列断片の5'末端の第1と、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の一義的な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と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ている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。

上述した手順の結果、公的ESTデータベース（例えば、GenBank）と企業のEST DNAデータベース（LIFESEQ（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA）を含む様々な発現配列タグ（EST）データベースと比較してEST配列が同定された。相同性検索はコンピュータプログラムBLAST及又はBLAST2を用いて実施された（Altschul等、Methods in Enzymology 266:460-480（1996））。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70（90の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。この結果、全長クローンに対応するさらなるEST配列が同定され、検査され、配列決定され、又はオリゴヌクレオチドのクローン作成のためのテンプレートとして提供され、天然配列PROポリペプチドをコードするDNAを単離するための種々の組織ライブラリをスクリーニングするために使用された。

#### 【0091】

A. ヒトPRO200（UNQ174）をコードするcDNAクローンの単離  
VEGFとの相同性に基づいてIncyte Pharmaceuticalsデータベースから同定された発現配列タグ（EST）に基づくプローブを、ヒト神経膠腫株化細胞G61から誘導されたcDNAライブラリのスクリーニングに使用した。スクリーニングは本出願の他の箇所を開示した手順と同様な方法で行った。特に、Incyteクローン「INC1302516」を以下の4つのプローブを生成するのに用いた：

5'-ACTTCTCAGTGTCATAAGGG-3' (配列番号：3)

5'-GAACATAAGAGAACCGATACCATTTTCTGGCCAGGTTGTC-3' (配列番号：4)

5'-CACCACAGCGTTTAACCAGG-3' (配列番号：5)

5'-ACAACAGGCACAGTTCAC-3' (配列番号：6)

9つのポジティブを同定し特徴付けした。3つのクローンが全コード化領域を含み、配列で一致した。胎児肺ライブラリから部分的クローンも同定し、コードされるアミノ酸を変化させなかった一つのヌクレオチド変化を除いて神経膠腫誘導配列と一致した。

哺乳動物タンパク質発現のために、全オープンリーディングフレーム（ORF）をCMVベース発現ベクターにクローニングした。エピトープタグ（FLAG, Kodak）及びヒスチジンタグ（His8）をORFと停止コドンの間に挿入した。UNQ174-His8及びUNQ174-FLAGを、SuperFect（Qiagen）によりヒト胚腎臓293細胞に形質移入し、 $[^3\text{H}]$ メチオニン及び $[^{35}\text{S}]$ システインで3時間パルス標識した。15倍濃縮無血清条件培地20マイクロリットルをドデシル硫酸ナトリウムバッファー中においてポリアクリルアミドゲル（Novex）上で電気泳動させたとき（SDS-PAGE）、両方のエピトープタグタンパク質が同時に移動する。ヒトFc（IgG）配列の前にORFにクローニングすることによりUNQ174-IgG発現プラスミドを作成した。

UNQ174-IgGプラスミドを、Lipofectin (GibcoBRL) を用いて、10%ウシ胎児血清を添加したヒンクのTNM-FH培地 (JRH Biosciences) において成長させた $10^5$  Sf9細胞中にBaculogoldバキュロウイルスDNA (Pharmagen) で同時形質移入した。細胞を28℃で5日間インキュベートした。上清を収集し、次いで約10の感染多発性 (MOI) でのSf9細胞感染による第1のウイルス増幅に使用した。細胞を3日間インキュベートし、次いで上清を回収し、1mlの上清の30 $\mu$ lのプロテインAセファロースCL-4Bビーズ (Pharmacia) への結合、続くSDS-PAGE分析により組換えプラスミドの発現を決定した。第1の増幅の上清を、ESF-921培地 (Expression Systems LLC) 中において約0.1のMOIで成長させたSf9細胞のスピナー培地500mlの感染に使用した。収集した上清を無菌濾過した以外は細胞を上記のように処理した。特定のタンパク質を、プロテインAセファロース4ファストフロー (Pharmacia) カラムに結合させることにより精製した。

同定されたクローンDNA29101の全ヌクレオチド配列をFig1 (配列番号: 1) に示す。クローンDNA29101 (配列番号: 1) は、太字の下線で示したように単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド残基285-287に見かけの翻訳開始部位を持ちヌクレオチド位置1320-1322に見出される停止コドン (TAG) で終端する (Fig1、配列番号: 1)。予測されるPRO200ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ174、配列番号2) は345アミノ酸長であり、39029ダルトンの算定分子量及び6.06のpIを持ち、これはFig2 (配列番号: 2) に示される。潜在的N-グルコシル化部位はアミノ酸残基25、54及び254にある。CUBドメインはアミノ酸残基52-65、118-125及び260-273にある。UNQ174 (配列番号: 2) をコードするDNAを含むcDNAは、1998年3月5日にATCCに寄託され、寄託番号209653が付されている。

#### 【0092】

B. ヒトPRO204 (UNQ178) をコードするcDNA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、ESTを同定した。ヒト胎児網膜cDNAライブラリをPCRオリゴヌクレオチドプライマーでスクリーニングし、EST配列に基づく合成オリゴヌクレオチドプローブでハイブリッド形成することにより確認した。

#### ハイブリッド形成プローブ

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

#### 正方向PCRプライマー

5'-CTGCTGCAGAGTTGCACGAAC-3' (配列番号: 8)

#### 逆方向PCRプライマー1

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

#### 逆方向PCRプライマー2

5'-AGTTCGTGCAACTCTGCAGCAG-3' (配列番号: 10)

cDNAクローンを同定し全体を配列決定した。DNA30871の全ヌクレオチド配列をFig3 (配列番号: 11) に示す。太字の下線で示したように、クローンDNA30871-1157 (配列番号: 11) 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367-378に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置1498-1500に見出される停止コドン (TAA) で終端する (Fig3; 配列番号: 11)。予測されるPRO204前駆体 (すなわち、UNQ178、配列番号: 12) は374アミノ酸長であり、39285ダルトンの算定分子量及び6.06のpIを持ち、Fig4に示される。UNQ178 (配列番号: 12) をコードするDNAを含むcDNAクローンは1997年10月16日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209380が付与されている。

C. ヒトPRO212 (UNQ186) をコードするcDNAの単離

10

20

30

40

50

ヒト胎児肺ライブラリにおいて上述の E C D 相同性手順を使用した結果、DNA 30942 の全長 DNA 配列 (Fig 5; 配列番号: 13) と誘導天然配列タンパク質 UNQ186 (配列番号: 14) を同定をした。

この手順で使用した PCR プライマー (正方向及び逆方向) とプローブは次のものである:

正方向 PCR プライマー: 5'-CACGCTGGTTTCTGCTGGAG-3' (配列番号: 15)

逆方向 PCR プライマー: 5'-AGCTGGTGCACAGGGTGCATG-3' (配列番号: 16)

ハイブリッド形成プローブ: (配列番号: 17)

5'-CCCAGGCACCTTCTCAGCCAGCCAGCAGCTCCAGCTCAGAGCAGTGCAGCCC-3'

DNA 30942 の全ヌクレオチド配列を Fig 5 (配列番号: 13) に示す。太字の下線 10  
 で示したように、クローン DNA 30942 (配列番号: 13) 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 101-103 に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 1001-1003 の停止コドン (TGA) で終端する (Fig 5; 配列番号: 13)。Fig 6 (配列番号: 14) の予測される PRO212 ポリペプチド前駆体は 300 アミノ酸長であり、32680 ダルトンの算定分子量と 8.70 の pI を持つ。Fig 6 (配列番号: 14) の PRO212 配列は膜貫通ドメインを欠いていると考えられる。また、Fig 6 (配列番号: 14) のアミノ酸 1-215 は 4 つのシステインリッチドメイン (CRD) を含む ECD を提示していると考えられる。DNA 30942 (配列番号: 13) を含む cDNA クローンは 1997 年 9 月 16 日に ATCC に 20  
 寄託され (DNA 30942-1134 として特定)、ATCC 寄託番号 209254 が付与されている。

#### 【0093】

D. ヒト PRO216 (UNQ190) をコードする cDNA クローンの単離

PRO212 の単離のための上述した手順と類似した手順を使用し、PRO216 ポリペプチド UNQ190 (配列番号: 19) (Fig 8) をコードする DNA 33087 (配列番号: 18) (Fig 7) を単離した。

太字の下線で示したように、DNA 33087 は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド残基 268-270 に見かけの翻訳開始部位を有し、残基 1531-1553 の停止コドン (TAG) で終端する (Fig 7、配列番号: 18)。予測される PRO215 ポリペプチド前駆体 (すなわち UNQ190、配列番号: 19) は 421 30  
 アミノ酸長であり、49492 ダルトンの算定分子量及び 5.51 の pI を持つ (Fig 8)。

ヒドロパシー分析により、アミノ酸残基 1 から 20 にシグナル配列、アミノ酸残基 268-274 及び 300-306 にチロシンキナーゼリン酸化部位、及び残基 230-235 に N-ミリスチル化部位、及び残基 146 から 167、217 から 238 にロイシンジッパーの存在が示唆された。伝統的な単離技術とは別に、DNA 配列は、Dayhoff タンパク質 AB000114\_1 をコードする受託番号 AB000114 として Genbank から公的に入手可能である。

また別に、配列は Ohno 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 228 (2): 411-414 (1996) に記載されている。DNA 33087 30  
 7 を含む cDNA クローン (DNA 33087-1157 として同定) は 1997 年 9 月 16 日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) に寄託され、ATCC 寄託番号 209381 が付与されている。

E. ヒト PRO226 (UNQ200) をコードする cDNA クローンの単離

ヒト胎児肺ライブラリにおいて上述の E C D 相同性手順を使用し、DNA 33460 の全長 DNA 配列 (Fig 9; 配列番号: 20) と誘導天然配列タンパク質 UNQ200 (配列番号: 21) を同定をした。

太字の下線で示したように、DNA 33460 は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド残基 62-64 に見かけの翻訳開始部位を有し、残基 1391-1393 の停止コドン (TGA) で終端する (Fig 9、配列番号: 20)。予測される P 50

R O 2 2 6 ポリペプチド前駆体（すなわち U N Q 2 0 0、配列番号：21）は 4 4 3 アミノ酸長であり、4 9 3 9 1 ダルトンの算定分子量及び 4. 8 2 の p I を持ち、これは U N Q 2 0 0 として F i g 1 0（配列番号：21）に示している。D N A 3 3 4 6 0 - 1 1 6 6 と命名された D N A 3 3 4 6 0（配列番号：20）を含む c D N A クロームは 1 9 9 7 年 1 0 月 1 6 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 3 7 6 が付与されている。

上述の手順で使用したヌクレオチド配列は以下の通りである：

2 8 7 2 2. p (O L I 4 8 8) (配列番号：22)

5'-TGTGTGGACATAGACGAGTGCCGCTACCGCTACTGCCAGCACC GC-3'

2 8 7 2 2. f (O L I 4 8 9) (配列番号：23)

5'-AGGACTGCCATAACTGCCTG-3'

2 8 7 2 2. r (O L I 4 9 0) (配列番号：24)

5'-ATAGGAGTTGAAGCAGCGCTGC-3'

【0094】

F. ヒト P R O 2 4 0 (U N Q 2 1 4) をコードする c D N A クロームの単離

ヒト胎児肝臓ライブラリにおいて上述の E C D 相同性手順を使用し、D N A 3 4 3 8 7 の全長 D N A 配列 (F i g 1 1 ; 配列番号：25) と誘導天然配列タンパク質 U N Q 2 1 4 (配列番号：26) を同定をした。

D N A 3 4 3 8 7 の全ヌクレオチド配列を F i g 1 1 (配列番号：25) に示す。太字の下線で示したように、D N A 3 4 3 8 7 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 2 - 1 4 に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 6 9 9 - 7 0 1 の停止コドン (T G A) で終端する (F i g 1 1、配列番号：25)。予測される P R O 2 4 0 ポリペプチド前駆体（すなわち U N Q 2 1 4、配列番号：26）は 2 2 9 アミノ酸長であり、2 4 6 8 9 ダルトンの算定分子量、7. 8 3 の p I を持ち、F i g 1 2 に示している。D N A 3 4 3 8 7 (配列番号：25) を含む c D N A クロームは 1 9 9 7 年 9 月 1 6 日に A T C C に寄託され A T C C 寄託番号 2 0 9 2 6 0 が付与されている。上述に記載した手順で使用するために合成したハイブリッド形成プローブ及び P C R プライマー（正方向及び逆方向）は以下の通りである：

正方向 P C R プライマー：5'-TCAGCTCCAGACTCTGATACTGCC-3' (配列番号：27)

逆方向 P C R プライマー：5'-TGCCTTTCTAGGAGGCAGAGCTCC-3' (配列番号：28)

ハイブリッド形成プローブ： (配列番号：29)

5'-GGACCCAGAAATGTGTCCTGAGAATGGATCTTGTGTACCTGATGGTCCAG-3' )

G. ヒト P R O 2 3 5 (U N Q 2 0 9) をコードする c D N A クロームの単離

ヒト胎児肝臓ライブラリにおいて上述の E C D 相同性手順を使用し、D N A 3 5 5 5 8 の全長 D N A 配列 (F i g 1 3 ; 配列番号：30) と誘導 P R O 2 3 5 天然配列タンパク質 U N Q 2 0 9 (F i g 1 4、配列番号：31) を単離した。

D N A 3 5 5 5 8 の全ヌクレオチド配列を F i g 1 3 (配列番号：30) に示す。太字の下線で示したように、F i g 1 3 に示す D N A 3 5 5 5 8 クロームは、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 6 6 7 - 6 6 9 に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 2 3 2 3 - 2 3 2 5 の停止コドン (T G A) で終端する。予測される P R O 2 3 5 ポリペプチド前駆体（すなわち U N Q 2 0 9、配列番号：31）は 5 5 2 アミノ酸長であり、6 1 6 7 4 ダルトンの算定分子量と 6. 9 5 の p I を持つ (F i g 1 4)。D N A 3 5 5 5 8 を含む c D N A クロームは 1 9 9 7 年 1 0 月 1 6 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 3 7 4 が付与されている。

上述の手順で使用するために合成したハイブリッド形成プローブ及び P C R プライマー（正方向及び逆方向）は以下の通りである：

正方向 P C R プライマー：5'-TGGAATACCGCCTCCTGCAG-3' (配列番号：32)

逆方向 P C R プライマー：5'-CTTCTGCCCTTTGGAGAAGATGGC-3' (配列番号：33)

ハイブリッド形成プローブ： (配列番号：34)

5'-GGACTCACTGGCCAGGCCTTCAATATCACCAGCCAGGACGAT-3'

10

20

30

40

50

## 【0095】

H. ヒトPRO245 (UNQ219) をコードするcDNAクローンの単離  
ヒト胎児肝臓ライブラリにおいて上述のECD相同性手順を使用し、DNA35658の全長DNA配列 (Fig 15; 配列番号: 35) と誘導PRO245天然配列タンパク質UNQ219 (Fig 16、配列番号: 36) を単離した。

上述の方法で使用するために合成したハイブリッド形成プローブ及びPCRプライマー (正方向及び逆方向) は以下の通りである:

正方向PCRプライマー: 5'-ATCGTTGTGAAGTTAGTGCCCC-3' (配列番号: 37)

逆方向PCRプライマー: 5'-ACCTGCGATATCCAACAGAATTG-3' (配列番号: 38)

ハイブリッド形成プローブ: (配列番号: 39)

5'-GGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAGTATTAGTGGCTCCAGCAGTTC-3'

DNA35638の全ヌクレオチド配列をFig 15 (配列番号: 35) に示す。クローンDNA35638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89-91に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置1025-1027の停止コドン (TAG) で終端する (Fig 15、配列番号35)。予測されるPRO245ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ219、配列番号: 36) は312アミノ酸長であり、34554ダルトンの算定分子量と9.39のpIを持つ (Fig 36)。DNA35638-1141と命名したDNA35638 (配列番号: 35) を含むcDNAクローンは1997年9月16日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209265が付与されている。

I. ヒトPRO172 (UNQ146) をコードするcDNAクローンの単離  
ヒト胎児腎臓ライブラリにおいて上述のECD相同性手順を使用し、DNA35916の全長DNA配列 (Fig 17; 配列番号: 40) と誘導PRO172天然配列タンパク質UNQ146 (Fig 18、配列番号: 41) を単離した。

Fig 17に太字の下線で示したように、クローンDNA35916 (配列番号: 40) 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38-40に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置2207-2209の停止コドン (TAA) で終端する。予測されるPRO172ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ146: 配列番号: 41) は723アミノ酸長であり、78055ダルトンの算定分子量と6.17のpIを持つ (Fig 18)。DNA35916 (配列番号: 40) を含むcDNAクローンは1997年10月28日にATCCに寄託され (DNA35916-1161と命名)、ATCC寄託番号209419が付与されている。

上述の方法で使用するヌクレオチド配列は以下の通りである:

28765. p(OLI633)

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

28765. f(OLI644)

5'-GGATCTCGAGAACAGCTACTCC-3' (配列番号: 43)

28765. r(OLI645)

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

## 【0096】

J. ヒトPRO273 (UNQ240) をコードするcDNAクローンの単離  
ヒト胎児腎臓ライブラリにおいて上述のECD相同性手順を使用し、DNA39523の全長DNA配列 (Fig 19; 配列番号: 45) と誘導PRO273天然配列タンパク質UNQ240 (Fig 20、配列番号: 46) を単離した。

合成したハイブリッド形成プローブ及びPCRプライマー (正方向及び逆方向) は以下の通りである:

正方向PCRプライマー: 5'-CAGCGCCCTCCCCATGTCCTG-3' (配列番号: 47)

逆方向PCRプライマー: 5'-TCCCAACTGGTTTGGAGTTTCCC-3' (配列番号: 48)

ハイブリッド形成プローブ:

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

太字の下線で示したように、クローンDNA 39523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167-169に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置500-502の停止コドン(TAG)で終端する(Fig 19)。予測されるPRO273ポリペプチド前駆体(すなわちUNQ240、配列番号:46)は111アミノ酸長であり、13078ダルトンの算定分子量と10.37のpIを持つ(Fig 20)。DNA 39523(配列番号:45)を含むcDNAクローンは1997年10月31日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209424が付与されている。

K. ヒトPRO272(UNQ239)をコードするcDNAクローンの単離  
ヒト胎児肺組織において、プローブオリゴヌクレオチドとプライマー対の一方を使用するインビトロクロニング手順を組み合わせて上述のECD相同性手順を使用し、全長DNA配列DNA 40620(Fig 21; 配列番号:50)と誘導PRO272天然配列タンパク質UNQ239(配列番号:51)を同定した。

PRO272をコードするDNA配列を単離するために合成して使用したハイブリッド形成プローブ及び正方向及び逆方向PCRプライマーは以下の通りである:

正方向PCRプライマー(.f1): 5'-CGCAGGCCCTCATGGCCAGG-3' (配列番号:52)

正方向PCRプライマー(.f2): 5'-GAAATCCTGGGTAATTGG-3' (配列番号:53)

逆方向PCRプライマー: 5'-GTGCGCGGTGCTCACAGCTCATC-3' (配列番号:54)

ハイブリッド形成プローブ:

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

太字の下線で示したように、クローンDNA 40620(配列番号:50)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35-37に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置1020-1022の停止コドン(TGA)で終端する(Fig 21)。予測されるポリペプチド前駆体は328アミノ酸長であり(Fig 22)、37493ダルトンの算定分子量と4.77のpIを持つ。DNA 40620(配列番号:50)を含むcDNAクローンは1997年10月17日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209388が付与されている。

L. ヒトPRO332(UNQ293)をコードするcDNAクローンの単離  
ヒト胎児肝臓ライブラリにおいて上述のECD相同性手順を使用し、DNA 40982の全長DNA配列(Fig 23、配列番号:56)と誘導PRO332天然配列タンパク質UNQ293(Fig 24、配列番号:57)を同定した。

上述した手順で使用するために合成したハイブリッド形成プローブ及びPCRプライマー(正方向及び逆方向)は以下の通りである:

5'-GCATTGGCCGCGAGACTTTGCC-3' (配列番号:58)

5'-GCGGCCACGGTCTCTGGAATG-3' (配列番号:59)

5'-TGGAGGAGCTCAACCTCAGCTACAACCGCATCACCAGCCACAGG-3' (配列番号:60)

DNA 40982の全ヌクレオチド配列(配列番号:56)をFig 23に示す。Fig 23に太字の下線で示したように、クローンDNA 40982(配列番号:56)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342-344に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置2268-2270の停止コドン(TAG)で終端する。予測されるPRO332ポリペプチド前駆体(すなわちUNQ293、配列番号:57、Fig 24)は642アミノ酸長であり、72067ダルトンの算定分子量と6.60のpIを持つ。DNA 40982(配列番号:56)を含むcDNAクローン(DNA 40982-1235と命名)は1997年11月7日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209433が付与されている。

【0097】

M. ヒトPRO526(UNQ330)をコードするcDNAクローンの単離  
ヒト胎児肝臓ライブラリにおいて上述のECD相同性手順を使用し、全長DNA配列DNA 44184(Fig 25、配列番号:61)と誘導PRO526天然配列タンパク質UNQ330(Fig 26、配列番号:62)を同定した。

合成したハイブリッド形成プローブ及びPCRプライマー(正方向及び逆方向)は以下の

通りである：

正方向PCRプライマー：5'-TGGCTGCCCTGCAGTACCTCTACC-3' (配列番号：63)

逆方向PCRプライマー：5'-CCCTGCAGGTCATTGGCAGCTAGG-3' (配列番号：64)

ハイブリッド形成プローブ：

5'-AGGCACTGCCTGATGACACCTTCGCGACCTGGGCAACCTCACAC-3' (配列番号：65)

太字の下線で示したように、クローンDNA44184 (配列番号：61) 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514-516に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置1933-1935の停止コドン (TGA) で終端する (Fig 61)。予測されるPRO526ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ330、配列番号：62) は473アミノ酸長である (Fig 62)。Fig 62に示すUNQ330 (配列番号：62) タンパク質は約50708ダルトンの算定分子量と9.28のpIを持つ。DNA44184を含むcDNAクローンは1998年3月26日にATCCに寄託され (DNA44184-1319と命名)、寄託番号209704が付与されている。

UNQ330 (配列番号：62) の分析により、シグナルペプチド配列はおよそアミノ酸1-26にあることが明らかになった。ロイシンジッパーパターンはおよそアミノ酸135-156にある。グリコサミノグリカン結合部位は、およそアミノ酸436-439にある。N-グリコシル化部位は、およそアミノ酸82-85、179-182、237-240及び423-426にある。フォンウィルブランド因子 (VWF) 型Cドメインは、およそアミノ酸411-425に見られる。当業者であれば、ここに提供した配列に基づいて、これらのアミノ酸にどのヌクレオチドが対応するかを理解できるであろう。

#### 【0098】

N. ヒトPRO701 (UNQ365) をコードするcDNAクローンの単離  
ヒト胎児肝臓ライブラリにおいて上述のECD相同性手順を使用し、全長DNA配列DNA44205 (Fig 27、配列番号：66) と誘導PRO526天然配列タンパク質UNQ365 (Fig 28、配列番号：67) を同定した。  
上述の手順で使用するために合成したハイブリッド形成プローブ及びPCRプライマー (正方向及び逆方向) は以下の通りである：

5'-GGCAAGCTACGGAACGTCATCGTG-3' (配列番号：68)

5'-AACCCCGAGCCAAAAGATGGTCAC-3' (配列番号：69)

5'-GTACCGGTGACCAGGCAGCAAAAGGCAACTATGGGCTCCTGGATCAG-3' (配列番号：70)

Fig 27に太字の下線で示したように、クローンDNA44205 (配列番号：66) 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50-52に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置2498-3000の停止コドン (TAG) で終端する。予測されるPRO701ポリペプチド前駆体 (すなわちFig 28、UNQ365、配列番号：67) は816アミノ酸長であり、91794Daの算定分子量 (pI：5.88) を持つ。DNA44205を含むcDNAクローン (配列番号：66) (DNA44205-1285と命名) は1998年3月31日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209720が付与されている。

UNQ365 (配列番号：67) は、およそアミノ酸位置25に潜在的シグナルペプチド切断部位を含む。アミノ酸位置83、511、716及び803には潜在的N-グリコシル化部位が存在する。カルボキシルエステラーゼB型シグネチャー2配列は、およそ残基125から135である。カルボキシルエステラーゼB型に相同な領域は、およそ残基54-74、197-212及び221-261である。潜在的な膜貫通領域は、およそアミノ酸671からおよそ700に相当する。対応する核酸は、ここに提供した配列から通常のようにして決定できる。

Q. ヒトPRO361 (UNQ316) をコードするcDNAクローンの単離  
ヒト胎児腎臓ライブラリにおいて、プローブオリゴヌクレオチドとプライマー対の一方を使用するインビボクローニング手順を組み合わせて上述のECD相同性手順を使用し、全長DNA配列DNA45410 (Fig 29；配列番号：71) と誘導PRO361天然

配列タンパク質 U N Q 3 1 6 ( F i g 3 0、配列番号：7 2 ) を同定した。

ハイブリッド形成プローブ及び正方向及び逆方向 P C R プライマーを上述の方法に使用するために合成した：

正方向 P C R プライマー(. f1)：

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

正方向 P C R プライマー(. f2)：5'-GAAGCAAGTCCCCAGCTC-3' (配列番号：7 4)

正方向 P C R プライマー(. f3)：5'-CGGGTCCCTGCTCTTTGG-3' (配列番号：7 5)

逆方向 P C R プライマー(. r1)：5'-CACCGTAGCTGGGAGCGCACTCAC-3' (配列番号：7 6)

逆方向 P C R プライマー(. r2)：5'-AGTGTAAGTCAAGCTCCC-3' (配列番号：7 7)

ハイブリッド形成プローブ：

5'-GCTTCCTGACACTAAGGCTGTCTGCTAGTCAGAATTGCCTCAAAAAGAG-3' (配列番号：7 8)

太字の下線で示したように、クローン D N A 4 5 4 1 0 (配列番号：7 1) 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 2 2 6 - 2 2 8 に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 1 5 1 9 - 1 5 2 1 の停止コドン (T A A) で終端する ( F i g 2 9 )。予測される P R O 3 6 1 ポリペプチド前駆体 (すなわち U N Q 3 1 6、配列番号：7 2) は 4 3 1 アミノ酸長である ( F i g 3 0 )。U N Q 3 1 6 として F i g 3 0 に示す天然配列 P R O 3 6 1 タンパク質は、約 4 6 8 1 0 の算定分子量と約 6 . 4 5 の p I を持つ。さらに、アルギナーゼファミリータンパク質を示す領域が、およそ残基 F 3 から V 1 4、また I 3 9 から T 5 7 に存在しており、膜貫通ドメインはおよそ残基 P 3 8 0 から S 4 0 9 に存在している。D N A 4 5 4 1 0 (配列番号：7 1) を含む c D N A クローンは 1 9 9 8 年 2 月 5 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 6 2 1 が付与されている。

#### 【0 0 9 9】

P. ヒト P R O 3 6 2 ( U N Q 3 1 7 ) をコードする c D N A クローンの単離

ヒト胎児脳ライブラリにおいて上述の E C D 相同性手順を使用し、全長 D N A 配列 D N A 4 5 4 1 6 ( F i g 3 1、配列番号：7 9) と誘導 P R O 3 6 2 天然配列タンパク質 U N Q 3 1 7 ( F i g 3 2、配列番号：8 0) を単離した。

上述の手順に使用するために合成したハイブリッド形成プローブ及び P C R プライマー (正方向及び逆方向) は以下の通りである：

正方向 P C R プライマー：5'-TATCCCTCCAATTGAGCACCTGG-3' (配列番号：8 1)

正方向 P C R プライマー：5'-GTCGGAAGACATCCCAACAAG-3' (配列番号：8 2)

逆方向 P C R プライマー：5'-CTTCACAATGTCGCTGTGCTGCTC-3' (配列番号：8 3)

逆方向 P C R プライマー：5'-AGCCAAATCCAGCAGCTGGCTTAC-3' (配列番号：8 4)

ハイブリッド形成プローブ：

5'-TGGATGACCGGAGCCACTACACGTGTGAAGTCACCTGGCAGACTCCTGAT-3' (配列番号：8 5)

太字の下線で示したように、クローン D N A 4 5 4 1 6 (配列番号：7 9) 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 1 9 - 1 2 1 に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 1 0 8 2 - 1 0 8 4 の停止コドン (T A A) で終端する ( F i g 3 1 )。予測される P R O 3 6 2 ポリペプチド前駆体 (すなわち U N Q 3 1 7、配列番号：8 0) は 3 2 1 アミノ酸長である ( F i g 3 2 )。F i g 3 2 に示す U N Q 3 1 7 タンパク質 (配列番号：8 0) は約 3 5 5 4 4 ダルトンの算定分子量と約 8 . 5 1 の p I を持つ。F i g 3 2 に示す U N Q 3 1 7 ポリペプチドの分析により、およそアミノ酸 1 4 9 からおよそアミノ酸 1 5 2 にグリコサミノグリカン結合部位、及びおよそアミノ酸 2 7 6 からおよそアミノ酸 3 0 6 に膜貫通ドメインが存在することが証明された。D N A 4 5 4 1 6 を含む c D N A クローン (配列番号：7 9) は 1 9 9 8 年 2 月 5 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 6 2 0 が付与されている。

#### 【0 1 0 0】

Q. ヒト P R O 3 6 3 ( U N Q 3 1 8 ) をコードする c D N A クローンの単離

ヒト胎児腎臓ライブラリにおいて上述の E C D 相同性手順を使用し、全長 D N A 配列 D N

10

20

30

40

50



A 4 5 4 1 9 (F i g 3 3、配列番号：86)と誘導 P R O 3 6 3 天然配列タンパク質 U N Q 3 1 8 (F i g 3 4、配列番号：87)を単離した。

上述の手順に使用するために合成されたハイブリッド形成プローブ及び P C R プライマー (正方向及び逆方向)は以下の通りである：

正方向 P C R プライマー：

5'-CCAGTGCACAGCAGGCAACGAAGC-3' (配列番号：88)

逆方向 P C R プライマー：

5'-ACTAGGCTGTATGCCTGGGTGGGC-3' (配列番号：89)

ハイブリッド形成プローブ：

5'-GTATGTACAAAGCATCGGCATGGTTGCAGGAGCAGTGACAGGC-3' (配列番号：90)

10

太字の下線で示したように、クローン D N A 4 5 4 1 9 (配列番号：86)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 9 0 - 1 9 2 に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 1 3 0 9 - 1 3 1 1 の停止コドン (T G A) で終端する (F i g 3 3)。予測される P R O 3 6 3 ポリペプチド前駆体 (すなわち U N Q 3 1 8、配列番号：87)は 3 7 3 アミノ酸長である (F i g 3 4)。F i g 3 4 に示す U N Q 3 1 8 タンパク質 (配列番号：87)は約 4 1 2 8 1 ダルトンの算定分子量と約 8 . 3 3 の p I を持つ。F i g 3 4 に示す U N Q 3 1 8 ポリペプチドの分析により、およそアミノ酸残基 2 2 1 からおよそ残基 2 5 4 に膜貫通ドメインの存在が証明された。D N A 4 5 4 1 9 を含む c D N A クローン (配列番号：86)は 1 9 9 8 年 2 月 5 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 6 1 6 が付与されている。

20

R. ヒト P R O 3 6 4 (U N Q 3 1 9)をコードする c D N A クローンの単離

ヒト小腸ライブラリにおいて上述の E C D 相同性手順を使用し、腫瘍壊死因子レセプター (T N F R) 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発現配列タグ (E S T) (I n c y t e E S T 番号 3 0 0 3 4 6 0)を同定した。

次に、E C D 相同性手順で使ったのと類似した方法で I n c y t e 3 0 0 3 4 6 0 E S T に対するコンセンサス D N A 配列を組み立て、全長 D N A 配列 D N A 4 7 3 6 5 (F i g 3 5、配列番号：91)と誘導 P R O 3 6 4 天然配列タンパク質 U N Q 3 1 9 (F i g 3 6、配列番号：92)を単離した。

上述のスクリーニング法で使用するために合成したハイブリッド形成プローブ及び P C R プライマー (正方向及び逆方向)は以下の通りである：

30

正方向 P C R プライマー (4 4 8 2 5. f 1)：

5'-CACAGCACGGGCGATGGG-3' (配列番号：93)

正方向 P C R プライマー (4 4 8 2 5. f 2)：

5'-GCTCTGCGTTCTGCTCTG-3' (配列番号：94)

正方向 P C R プライマー (4 4 8 2 5. G I T R. f)：

5'-GGCACAGCACGGGCGATGGGCGGTTT-3' (配列番号：95)

逆方向 P C R プライマー (4 4 8 2 5. r 1)：

5'-CTGGTCACTGCCACCTTCCTGCAC-3' (配列番号：96)

逆方向 P C R プライマー (4 4 8 2 5. r 2)：

5'-CGCTGACCCAGGCTGAG-3' (配列番号：97)

40

逆方向 P C R プライマー (4 4 8 2 5. G I T R. r)：

5'-GAAGGTCCCCGAGGCACAGTCGATACA-3' (配列番号：98)

ハイブリッド形成プローブ (4 4 8 2 5. p 1)

5'-GAGGAGTGCTGTTCGAGTGGGACTGCATGTGTGTCCAGC-3' (配列番号：99)

ハイブリッド形成プローブ (4 4 8 2 5. G I T R. p)

5'-AGCCTGGGTGAGCGCCCGGGGGTCCCGGGTGGCGCC-3' (配列番号：100)

太字の下線で示したように、クローン D N A 4 7 3 6 5 (配列番号：91)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 2 1 - 1 2 3 に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 8 4 4 - 8 4 6 の停止コドン (T G A) で終端する (F i g 3 5)。予測される P R O 3 6 4 ポリペプチド前駆体 (すなわち U N Q 3 1 9、配列

50

番号：92)は241アミノ酸長である(Fig 36)。Fig 36に示すUNQ 319 (配列番号：92)タンパク質は約26000ダルトンの算定分子量と約6.34のpIを持つ。潜在的N-グリコシル化部位はFig 36に示すアミノ酸配列のアミノ酸146から149の間に存在する。推定シグナル配列はFig 36に示す配列のアミノ酸1から25、潜在的膜貫通ドメインはFig 36に示す配列のアミノ酸162から180の間に存在する。DNA 47365を含むcDNAクローン(DNA 47365-1206と命名)は1997年11月7日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209436が付与されている。

#### 【0101】

S. ヒトPRO356 (UNQ 313) (NL4)をコードするcDNAクローンの単離 10  
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、ヒトTIE-2 L1とTIE-2 L2との間に相同性を示すEST (#2939340)を同定した。

ESTに基づき、一对のPCRプライマー(正方向及び逆方向)とプローブを合成した：  
NL4, 5-1 : 5'-TTCAGCACCAAGGACAAGGACAATGACAAC-3' (配列番号：103)

NL4, 3-1 : 5'-TGTGCACACTTGTCCAAGCAGTTGTCATTGTC-3' (配列番号：104)

NL4, 3-3 : 5'-GTAGTACACTCCATTGAGGTTGG-3' (配列番号：105)

Life Technologies, Gaithersburg, MD (Super 20  
Script Plasmid System)からの試薬とプロトコルを用いて、ベクターpRK5DにおいてClontech, Inc. から購入した子宮mRNA (Palo Alto, CA, USA, カタログ番号6537-1)よりオリゴdTプライムしたcDNAのライブラリを作製した。pRK5Dは、sp6転写開始部位に続いてSfiI制限酵素部位を、さらにXhoI/NotI cDNAクローニング部位を持つクローニングベクターである。cDNAをNotI部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSalIヘミキナーゼアダプターに結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動で約1000bpを越えるように適切にサイズ分類し、XhoI/NotI切断pRK5Dにおいて所定の方向でクローニングした。

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を上記で同定したPCRプライマー対でPCR増幅してスクリーニング 30  
を行った。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PRO356遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

上述のように単離したクローンのDNA配列決定により、天然配列PRO356 (NL4)をコードする全長DNA配列(すなわちDNA 47470、配列番号：101)及び誘導PRO356タンパク質配列UNQ 313 (配列番号：102)が得られた。

DNA 47470の全ヌクレオチド配列をFig 37 (配列番号：101)に示す。太字の下線で示したように、クローンDNA 47470 (配列番号：101)は、単一のオープンリーディングフレームリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置215-217に見かけの翻訳開始部位、ヌクレオチド位置1038-1040にTAA停止コドン 40  
を有する。予測されるPRO356ポリペプチド前駆体は346アミノ酸長(すなわちUNQ 313、配列番号：102)であり、40018ダルトンの算定分子量及び約8.19のpIを持つ。DNA 47470 (配列番号：101)を含むcDNAは1997年10月28日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209422が付与されている。

#### 【0102】

T. ヒトPRO531 (UNQ 322)をコードするcDNAクローンの単離  
ヒト胎児脳ライブラリにおいて上述のECD相同性手順を使用し、全長DNA配列DNA 48314 (Fig 39、配列番号：106)と誘導PRO531天然配列タンパク質UNQ 332 (Fig 40、配列番号：107)を単離した。

合成されたハイブリッド形成プローブPCRプライマー(正方向及び逆方向)は以下の通 50

りである：

正方向PCRプライマー：5'-CTGAGAACGCGCCTGAACTGTG-3' (配列番号：108)

逆方向PCRプライマー：5'-AGCGTTGTCATTGACATCGGCG-3' (配列番号：109)

ハイブリッド形成プローブ：

5'-TTAGTTGCTCCATTGAGGAGGATCTACCTTCCTCTGAAATCCGCGGAA-3' (配列番号：110)

太字の下線で示したように、クローンDNA48314 (配列番号：106) 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171-173に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置2565-2567の停止コドン (TGA) で終端する (Fig 39)。予測されるPRO531ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ332、配列番号：107) は789アミノ酸長である。Fig 39に示すUNQ332タンパク質 (配列番号：107) は約87552ダルトンの算定分子量と約4.84のpIを持つ。DNA48314を含むクローン (配列番号：106) は1998年3月26日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209702が付与されている。

配列番号：107のUNQ332アミノ酸配列の分析により、およそアミノ酸122-132、231-241、336-346、439-449及び549-559にカドヘリン細胞外反復ドメインシグネチャーが見られる。ATP/GTP結合部位モチーフA (Pループ) は、配列番号：107のおよそアミノ酸285-292に見られる。N-グリコシル化部位は、配列番号：107のおよそアミノ酸567-570、786-790、418-421及び336-339に見られ、シグナルペプチドはおよそアミノ酸1-26にあり、膜貫通ドメインはおよそアミノ酸685-712にある。

U. ヒトPRO533 (UNQ334) をコードするcDNAクローンの単離  
EST配列受託番号AF007268であるマウス線維芽細胞成長因子 (FGF-15) を様々な公的ESTデータベース (例えば、GenBank, Dayhoff等) を検索するのに使用した。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タンパク質配列をEST配列の6フレーム翻訳と比較することにより実施した。検索の結果、GenBank EST AA220994が同定され、これがストラタジーンNT2ニューロン前駆体937230として同定された。

この配列に基づいて、1) PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリを同定するため、及び2) 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。ライブラリからのDNAをPCRプライマー対で、Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、PCR増幅によりスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマーの一方を使用するインビトロクロニング手順により、関心あるPRO533遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

cDNAライブラリの作成のためのRNAはヒト胎児網膜から単離した。cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリは、市販試薬 (例えばInvitrogen, San Diego, CA; Clontech等々) を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSalIヘミキナーゼアダプターに結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分類し、適切なクロニングベクター (例えばpRKB又はpRKD等; pRK5BはSfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である; Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991)) に、独特のXhoI及びNotI部位において、所定の方向でクロニングした。

cDNAクローンはその全体を配列決定した。全長ヌクレオチド配列DNA49435 (配列番号：111) をFig 41に示す。Fig 41に太字の下線で示したように、クローンDNA49435 (配列番号：111) 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 464-466 に見かけの翻訳開始部位を持ち、ヌクレオチド位置 649-651 の停止コドン (TAA) で終端する。予測される PRO533 ポリペプチド前駆体 (すなわち UNQ334、配列番号: 112) は 216 アミノ酸長であり、24003 ダルトンの算定分子量と 6.99 の pI を有する。クローン DNA 49435-1219 は 1997 年 11 月 21 日に ATCC に寄託され (DNA 49435-1219 と命名)、ATCC 寄託番号 209480 が付与されている。

上述の手順に使用されるオリゴヌクレオチド配列は以下の通りである:

FGF15.f: 5'-ATCCGCCAGATGGCTACAATGTGTA-3' (配列番号: 113)

FGF15.p: 5'-GCCTCCCGGTCTCCCTGAGCAGTGCCAAACAGCGGCAGTGA-3' (配列番号: 114)

FGF15.r: 5'-CCAGTCCGGTGACAAGCCCAA-3' (配列番号: 115)

#### 【0103】

V. ヒト PRO1083 (UNQ540) をコードする cDNA クローンの単離  
ヒト胎児腎臓組織から単離された組織について上述のアミラーゼ酵母菌スクリーニング手順を使用し、以下のオリゴヌクレオチドを作成するためのテンプレートとなる EST 配列を得、ヒト胎児腎臓ライブラリにおいて上述したようにスクリーニングして、全長 DNA 配列 DNA 50921 (Fig 43、配列番号: 116) と誘導 PRO1083 天然配列タンパク質 UNQ540 (配列番号: 117) を単離した。

上述の手順で使用するために合成したハイブリッド形成プローブ及び PCR プライマー (正方向及び逆方向) は以下の通りである:

正方向プライマー: (43422.f1):

5'-GGCATTGGAGCAGTGTGGTG-3' (配列番号: 118)

正方向プライマー: (43422.f2):

5'-AGAGCAACTCAGACAGCG-3' (配列番号: 119)

逆方向プライマー: (43422.r1):

5'-TGGAGGCCTAGATGCGGCTGGACG-3' (配列番号: 120)

逆方向プライマー: (43422.r2):

5'-CGAGGAGACCATCAGCAC-3' (配列番号: 121)

ハイブリッド形成プローブ: (43422.p1):

5'-CCCAACATCCTGCTTCTGCAACCACTTGACCTACTTTGCAGTGC-3' (配列番号: 122)

太字の下線で示したように、クローン DNA 50921 (配列番号: 116) 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 154-156 に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 2233-2235 の停止コドン (TAG) で終端する (Fig 43)。予測される PRO1083 ポリペプチド前駆体 (すなわち UNQ540、配列番号: 117、Fig 44) は 693 アミノ酸長である。Fig 44 に示す UNQ540 (配列番号: 117) タンパク質は約 77738 ダルトンの算定分子量と約 8.87 の pI を持つ。DNA 50921 を含むクローンは 1998 年 5 月 12 日に ATCC に寄託され、寄託番号 209859 が付与されている。

アミノ酸配列 UNQ540 (配列番号: 117) の分析により、推定シグナルペプチド配列がおおよそアミノ酸 1-25 にあり、膜貫通ドメインがおおよそアミノ酸 382-398、402-420、445-468、473-491、519-537、568-590 及び 634-657 にあり、ミクロボディ C 末端標的シグナルがおおよそアミノ酸 691-693 にあり、cAMP-及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位がおおよそアミノ酸 198-201 及び 370-373 に、N-グリコシル化部位がおおよそアミノ酸 39-42、148-151、171-174、234-237、303-306、324-227 及び 341-344 に、さらに G-タンパク質結合レセプターファミリードメインがおおよそアミノ酸 475-504 にあることが明らかになった。

#### 【0104】

W. ヒト PRO865 (UNQ434) をコードする cDNA クローンの単離  
ヒト胎児腎臓組織から単離された組織について上述のアミラーゼ酵母菌スクリーニング手

10

20

30

40

50

順を使用し、以下のオリゴヌクレオチドを作成するためのテンプレートとなる E S T 配列を得、ヒト胎児腎臓ライブラリにおいて上述したようにスクリーニングして、全長 D N A 配列 D N A 5 3 9 7 4 ( F i g 4 5、配列番号：1 2 3) と誘導 P R O 8 6 5 天然配列タンパク質 U N Q 4 3 4 (配列番号：1 2 4) を単離した。

上述の手順で使用するために合成したハイブリッド形成プローブ及び P C R プライマー (正方向及び逆方向) は以下の通りである：

正方向プライマー：(4 8 6 1 5. f 1)：

5'-AAGCTGCCGAGCTGCAATG-3' (配列番号：1 2 5)

正方向プライマー：(4 8 6 1 5. f 2)：

5'-TTGCTTCTTAATCCTGAGCGC-3' (配列番号：1 2 6)

正方向プライマー：(4 8 6 1 5. f 3)：

5'-AAAGGAGGACTTTGACTGC-3' (配列番号：1 2 7)

逆方向プライマー：(4 8 6 1 5. r 1)：

5'-AGAGATTCATCCACTGCTCCAAGTCG-3' (配列番号：1 2 8)

逆方向プライマー：(4 8 6 1 5. r 2)：

5'-TGTCCAGAAACAGGCACATATCAGC-3' (配列番号：1 2 9)

ハイブリッド形成プローブ：(4 8 6 1 5. p 1)：

5'-AGACAGCGGCACAGAGGTGCTTCTGCCAGGTTAGTGGTTACTTGGATGAT-3' (配列番号：1 3 0)

太字の下線で示したように、クローン D N A 5 3 9 7 4 (配列番号：1 2 3) 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 7 3 - 1 7 5 に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 1 5 7 7 - 1 5 7 9 の停止コドン (T A A) で終端する (F i g 4 5)。予測される P R O 8 6 5 ポリペプチド前駆体 (すなわち U N Q 8 6 5、配列番号：1 2 4) は 4 6 8 アミノ酸長である。F i g 4 6 に示す U N Q 4 3 4 (配列番号：1 2 4) タンパク質は約 5 4 3 9 3 の算定分子量と約 5. 6 3 の p I を持つ。D N A 5 3 9 7 4 (配列番号：1 2 3) を含むクローンは 1 9 9 8 年 4 月 1 4 日に A T C C に寄託され、寄託番号 2 0 9 7 7 4 が付与されている。

アミノ酸配列 U N Q 4 3 4 (配列番号：1 2 4) の分析により、およそアミノ酸残基 1 - 2 3 に推定シグナルペプチド、およそアミノ酸残基 2 8 0 からおよそ 3 8 4 に潜在的 N - グリコシル化部位、およそアミノ酸残基 9 4 からおよそ残基 9 7 に潜在的アミド化部位、およそアミノ酸残基 2 0 からおよそ 2 3、及びおよそ残基 2 2 3 からおよそ残基 2 2 6 にグリコサミノグリカン結合部位、およそアミノ酸残基 2 1 6 からおよそ残基 2 2 2 にアミノトランスフェラーゼクラス V ピリドキシルーホスフェートアミノ酸配列ブロック、及びおよそアミノ酸残基 3 3 8 からおよそ残基 3 4 3 のインターロイキン - 7 タンパク質に見られるものと類似するアミノ酸配列ブロックが存在することが明らかになった。

#### 【0 1 0 5】

X. ヒト P R O 7 7 0 (U N Q 4 0 8) をコードする c D N A クローンの単離  
公的な発現配列タグ (E S T) D N A データベース (M e r c k / W a s h i n g t o n U n i v e r s i t y) を全長マウス m - F I Z Z 1 D N A (D N A 5 3 5 1 7) で検索し、A A 5 2 4 3 0 0 と命名した、m - F I Z Z 1 D N A と相同性を示した E S T を同定した。

E S T A A 5 2 4 3 0 0 に相当する全長クローンを I n c y t e (L n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s, P a l o A l t o, C a l i f o r n i a) から購入し、その全体を配列決定した。

得られた P R O 7 7 0 コード化全長クローンの全ヌクレオチド配列を F i g 4 7 に示す。太字の下線で示したように、D N A 5 4 2 2 8 と命名されたこの全長クローン (配列番号：1 3 3) 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 0 0 - 1 0 2 に見かけの翻訳開始部位を有し (F i g 4 7；配列番号 1 3 3)、残基 4 3 3 - 4 3 5 の停止コドン (T G A) で終端する。予測される P R O 7 7 0 ポリペプチド先駆体 (2 0 のアミノ酸の推定シグナル配列を含む) (すなわち U N Q 4 0 8、配列番号 1 3 4)

10

20

30

40

50

は 1 1 1 アミノ酸長であり、1 1 7 3 0 ダルトンの算定分子量と 7. 8 2 の p I を持つ。  
m-F I Z Z 1 に対するその相同性に基づいて (A L I G N ソフトウェアを使用して、5  
0 %)、タンパク質は m-F I Z Z 1 のヒト相同体であると信じられ、h-F I Z Z 1 と  
命名した。D N A 5 4 2 2 8 を含む c D N A クローン (配列番号: 1 3 3) は A T C C に  
寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 8 0 1 が付与されている。

m-F I Z Z 1 (D N A 5 3 5 1 7) の同定とクローニング

マウス喘息モデル 6 ~ 8 週齢の雌の B a l b / C マウスを、二つの実験グループ: 対照  
と喘息に分けた。喘息グループを 1 0 μ g の卵白アルブミン + 1 m g のミョウバンで腹腔  
内に免疫化する一方、対照グループは免疫しなかった。2 週間後、U l t r a N e b ネブ  
ライザー (D e V i l b i s s) でエアロゾル化した P B S に入れた卵白アルブミン 1 0  
m g / m l のエアロゾルに、7 日連続して一日当たり 3 0 分間 2 m l / m i n の流速で毎日  
マウスをさらした。最後のエアロゾルの投与の 1 日後に、全血、血清及び気管支肺胞洗浄  
(B A L) 試料を収集し、肺を収集し、組織学的検査、免疫組織化学及びインサイツハイ  
ブリッド形成のために保存した。

B A L 試料のゲル電気泳動 1 6 % のトリシンゲル上でのゲル電気泳動法による B A L 試  
料の検査は、喘息マウスからの B A L 試料にあっては低分子量のタンパク質が発現される  
が、対照マウスの B A L 試料では発現しないことが示された。この低分子量のタンパク質  
を m-F I Z Z 1 と名付けたが、8 3 0 0 ダルトンのマーカータンパク質 (I L - 8) と  
同時移動することが分かった。

部分的タンパク質配列 関心あるタンパク質を P V D F 膜上に移し、エドマン分解により  
配列決定した。この配列は以下に記載する種々のクローニングオリゴの作成のためのテン  
プレートとなった。

部分的 c D N A 配列 我々は、部分的タンパク質配列の配列の最初の 7 個と最後の 7 個の  
アミノ酸に対する推定 D N A 配列に対応する 2 つの縮重オリゴヌクレオチド P C R プライ  
マーを設計した。

オリゴ # 1 :

5'-ACAAACGCGT GAYGARACNATHGARAT-3' (配列番号: 1 3 5)

オリゴ # 2 :

5'-TGGTGCATGCGGRTARTTNGCNGGRTT-3' (配列番号: 1 3 6)

正常なマウスの肺から調製された c D N A を 8 8 b p の生成物を生じた P C R 反応のテン  
プレートとして使用した。この 8 8 p b の生成物は、P C R プライマーをコードする 5 4  
の既知の塩基対と、他の部分的 m-F I Z Z 1 配列をコードする 3 4 の新規な塩基対を含  
んでいた。

全長 c D N A クローン この第 2 の部分配列を使用してプライマーを設計し、最終的にマ  
ウスの肺ポリ (A) + R N A の R T - P C R による全長 F I Z Z クローン (D N A 5 3 5  
1 7) を成功裡に得た。

オリゴ # 3 :

5'-ACAAACGCGTGCTGGAGAATAAGGTCAAGG-3' (配列番号: 1 3 7)

オリゴ # 4 :

5'-ACTAACGCGTAGGCTAAGGAACCTCTTGCC-3' (配列番号: 1 3 8)

このオリゴをオリゴ d (T) と組み合わせて R T - P C R プライマーとして使用した。

【0 1 0 6】

Y. ヒト P R O 7 6 9 (U N Q 4 0 7) をコードする c D N A クローンの単離  
公的な発現配列タグ (E S T) D N A データベース (M e r c k / W a s h i n g t o n  
U n i v e r s i t y) を上述の全長マウス動物 m-F I Z Z 1 D N A (D N A 5 3 5  
1 7) で検索し、E S T W 4 2 0 6 9 を同定した。

E S T 断片 W 4 2 0 6 9 に相当する全長クローンを L n c y t e P h a r m a c e u t  
i c a l s, (P a l o A l t o, C a l i f o r n i a) から購入し、全体を配列決  
定し、最終的に全長ヌクレオチド配列 D N A 5 4 2 3 1 (配列番号: 1 3 9) を同定した  
。

10

20

30

40

50

全長の天然配列 P R O 7 6 9 クローンに相当するヌクレオチド配列を F i g 4 9 に示す。太字の下線で示したように、D N A 5 4 2 3 1 と命名されたこのクローン（配列番号：1 3 9）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 7 5 - 7 9 に見かけの翻訳開始部位を有し、残基 4 1 7 - 4 1 9 の停止コドン（T G A）で終端する（F i g 4 9）。予測される P R O 7 6 9 ポリペプチド先駆体（10のアミノ酸のシグナル配列を含む）（すなわち U N Q 4 0 7、配列番号 1 4 0）は 1 1 4 アミノ酸長であり、1 2 4 9 2 ダルトンの算定分子量と 8. 1 9 の p I を持つ。m - F I Z Z 1 に対するその相対性に基づいて（A L I G N ソフトウェアを使用して、3 4 %）、タンパク質を m - F I Z Z 3 と命名した。D N A 5 4 2 3 1 を含むクローン（D N A 5 4 2 3 1 - 1 3 6 6 と命名）は 1 9 9 8 年 4 月 2 3 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 8 0 2 が付与されている。 10

Z. ヒト P R O 7 8 8（U N Q 4 3 0）をコードする c D N A クローンの単離  
上述の E C D 相対性手順を使用し、部分長 E S T 配列 2 7 7 7 8 2 8 を同定した。さらに対応する全長配列を分析することにより、D N A 5 6 4 0 5（配列番号：1 4 1）と誘導天然配列 P R O 7 8 8 タンパク質 U N Q 4 3 0（配列番号：1 4 2）を同定した。  
太字の下線で示したように、クローン D N A 5 6 4 0 5（配列番号：1 4 1）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 8 4 - 8 6 に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 4 5 9 - 4 6 1 の停止コドン（T A G）で終端する（F i g 5 1）。予測される P R O 7 8 8 ポリペプチド前駆体（すなわち U N Q 4 3 0、配列番号：1 0 4 2）は 1 2 5 アミノ酸長であり（F i g 5 2）、1 3 1 1 5 ダルトンの算定分子量と 5. 9 0 の p I を持つ。F i g 5 2 に示す U N Q 4 3 0（配列番号：1 4 2）タンパク質は 1 9 9 8 年 3 月 6 日に A T C C に寄託され、寄託番号 2 0 9 8 4 9 が付与されている。寄託物のヌクレオチド配列とここに開示された配列との間で不一致がある場合は、寄託されたクローンが正しい配列を含むものと理解される。さらにここで提供された配列を配列決定するための方法は周知の配列決定技術に基づくものと理解される。  
F i g 5 2 に示す U N Q 4 3 0（配列番号：5 2）の分析により、およそアミノ酸 1 - 1 7 にシグナルペプチド、およそアミノ酸 4 6 に N - グリコシル化部位があることが明らかになった。 20

#### 【0 1 0 7】

A A. ヒト P R O 1 1 1 4（U N Q 5 5 7）をコードする c D N A クローンの単離 ヒト 30  
胎児腎臓組織から単離された組織について上述のアミラーゼ酵母菌スクリーニング手順を使用し、以下のオリゴヌクレオチドを作成するためのテンプレートとなる E S T 配列を得、ヒト乳癌ライブラリにおいて上述したようにスクリーニングして、全長 D N A 配列 D N A 5 7 0 3 3（F i g 5 3、配列番号：1 4 3）と誘導 P R O 1 1 1 4 天然配列タンパク質 U N Q 5 5 7（F i g 5 4、配列番号：1 4 4）を単離した。  
上述のパラグラフに記載した単離スクリーニングで使用する P C R プライマーは以下の通りである：

正方向プライマー：(4 8 4 6 6. f 1)：

5'-AGGCTTCGCTGCGACTAGACCTC-3' (配列番号：1 4 5)

逆方向プライマー：(4 8 4 6 6. r 1)：

5'-CCAGGTCGGGTAAGGATGGTTGAG-3' (配列番号：1 4 6) 40

ハイブリッド形成プローブ：(4 8 4 6 6. p 1)：

5'-TTTCTACGCATTGATTCCATGTTTGCTCACAGATGAAGTGGCCATTCTGC-3' (配列番号：1 4 7)

太字の下線で示したように、クローン D N A 5 7 0 3 3（配列番号：1 4 3）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 2 5 0 - 2 5 2 に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 1 1 8 3 - 1 1 8 5 の停止コドン（T A G）で終端する（F i g 5 3、配列番号 1 4 3）。予測される P R O 1 1 1 4 ポリペプチド前駆体（すなわち U N Q 5 5 7、配列番号：1 4 4）は 3 1 1 アミノ酸長であり、約 3 5 0 7 6 ダルトンの算定分子量と約 5. 0 4 の算定 p I を持つ。F i g 5 4 に示す全長 P R O 1 1 1 4 50

配列（配列番号：144）の分析により、以下の存在が証明された：およそアミノ酸1からおよそアミノ酸29にシグナルペプチド、およそアミノ酸230からおよそアミノ酸255に膜貫通ドメイン、およそアミノ酸40からおよそアミノ酸43及びおよそアミノ酸134からおよそアミノ酸137に潜在的N-グルコシル化部位、およそアミノ酸92からおよそアミノ酸119にアミノ酸配列ブロック、及びおよそアミノ酸残基232からおよそアミノ酸262のインテグリンα鎖と相同性を有するアミノ酸配列ブロック。DNA57033を含むcDNAクローン（配列番号：143）は1998年3月27日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209905が付与されている。

AB. ヒトPRO1007（UNQ491）をコードするcDNAクローンの単離

上述のECD相同性手順を使用し、ヒト肝臓組織（ライブラリ341からのクローン83012）から誘導され、Merck EST T70513と命名されたEST配列を同定し、更に検査した。対応する全長クローンを更に検査して配列決定し、全長DNA配列DNA57690（Fig55、配列番号：145）及び誘導PRO1007天然配列タンパク質UNQ491（Fig56、配列番号：146）を単離した。

太字の下線で示したように、クローンDNA57690（配列番号：145）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16-18に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置1054-1056の停止コドン（TGA）で終端する（Fig55）。予測されるPRO1007ポリペプチド前駆体（すなわちUNQ491、配列番号：146）は346アミノ酸長であり（Fig56）、35971ダルトンの算定分子量及び8.17のpIを持つ。Fig56に示すUNQ491（配列番号：146）タンパク質は、約35971ダルトンの算定分子量及び約8.17のpIを持つ。DNA57690を含むcDNAクローン（配列番号：145）は1998年6月9日にATCCに寄託され、寄託番号209950が付与されている。

UNQ491（配列番号：146）のアミノ酸配列の分析により、およそアミノ酸残基1-30に推定シグナルペプチド、およそアミノ酸残基325-346に膜貫通ドメイン、およそアミノ酸残基118、129、163、176、183及び227にN-グリコシル化部位、及びおよそアミノ酸残基17-36及び209-222にLy-6/u-Paドメインタンパク質があることが明らかになった。ここに提供されたアミノ酸の対応するヌクレオチド配列はここで提供された配列が与えられれば常套的に決定できる。

#### 【0108】

AC. ヒトPRO1184（UNQ598）をコードするcDNAクローンの単離

上述のシグナルアルゴリズム手順を使用し、回腸組織ライブラリ（39、SINTBST01）から誘導されたIncye EST1428374を同定した。この配列に対応する全長クローンを更に検査して、全長DNA59220（Fig57、配列番号：147）及び誘導PRO1184天然配列タンパク質UNQ598（Fig58、配列番号：148）を単離した。

Fig58に太字の下線で示したように、UNQ598（配列番号：148）は、ヌクレオチド位置106-108に見かけの翻訳開始部位を示し、ヌクレオチド位置532-534に見られる停止コドン（TGA）で終端する。予測されるPRO1184ポリペプチド前駆体（すなわちUNQ598、配列番号：148）は142アミノ酸長であり、約15690ダルトンの算定分子量及び約9.64の算定pIを持つ。UNQ598（配列番号：148）の分析により、およそアミノ酸残基1-38にシグナルペプチドの存在が証明された。DNA59220を含むcDNAクローン（配列番号：147）は1998年6月9日にATCCに寄託され、寄託番号209962が付与されている。寄託されたクローンが実際の配列を有しており、その提示がここになされていると理解される。

AD. ヒトPRO1031（UNQ516）をコードするcDNAクローンの単離 上述のECD相同性手順を使用し、EST配列Merck W74558（クローン344649）を同定した。対応する全長クローンを更に検査して配列決定し、全長DNA配列DNA57690（Fig59、配列番号：149）及び誘導PRO1031天然配列タンパク質UNQ516（Fig60、配列番号：150）を単離した。

10

20

30

40

50



太字の下線で示したように、クローンDNA 59294（配列番号：149）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42-44に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置582-584の停止コドン（TGA）で終端する（Fig 59）。予測されるPRO1031ポリペプチド前駆体（すなわちUNQ516、配列番号：150）は180アミノ酸長である（Fig 60）。Fig 60に示すUNQ516タンパク質は、約20437ダルトンの算定分子量及び約9.58のpIを持つ。クローンDNA 59294（配列番号：149）は1998年3月14日にATCCに寄託され、寄託番号209866が付与されている。配列に関し、寄託されたクローンが正しい配列を含み、ここで提供された配列は既知の配列決定技術に基づいていることが理解される。対応するヌクレオチドはここで提供された配列が与えられれば日常的に決定できる。

10

AE. ヒトPRO1346（UNQ701）をコードするcDNAクローンの単離  
ヒト胎児腎臓ライブラリにおいて上述のECD相同性手順を使用し、全長DNA配列DNA 59776（Fig 61、配列番号：151）と誘導PRO1346天然配列タンパク質UNQ701（Fig 62、配列番号：152）を単離した。  
DNA 59776（配列番号：151）の単離に使用したハイブリッド形成プローブとPCRプライマー（正方向及び逆方向）は以下の通りである：

正方向PCRプライマー(45668.f1)：

5'-CACACGTCCAACCTCAATGGGCAG-3'

(配列番号：153)

逆方向PCRプライマー(45668.r1)：

5'-GACCAGCAGGGCCAAGGACAAGG-3'

(配列番号：154)

ハイブリッド形成プローブ(45668.p1)：

5'-GTTCTCTGAGATGAAGATCCGGCCGGTCCGGGAGTACCGCTTAG-3' (配列番号：155)

クローンDNA 59776（配列番号：151）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（ATG）に見かけの翻訳開始部位を、ヌクレオチド位置1384-1386に見かけの停止コドン（TAG）を有する。予測されるPRO1346ポリペプチド前駆体（すなわちUNQ701、配列番号：152）は461アミノ酸長である。タンパク質は、アミノ酸位置約31から約50に見かけのII型膜貫通ドメインを、およそアミノ酸位置409-421にフィブリノーゲンβ及びγ鎖C末端ドメインシグネチャーを、およそアミノ酸位置140-161、147-168、154-175及び161-182にロイシンジッパーパターンを含む。

30

DNA 59776-1600と命名されるDNA 59776を含むcDNAクローンは1998年8月18日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203128が付与されている。Fig 62に示すUNQ701（配列番号：152）タンパク質は約50744ダルトンの算定分子量と約6.38のpIを持つ（Fig 18）。

#### 【0109】

AF. ヒトPRO1155（UNQ585）をコードするcDNAクローンの単離  
上述のシグナルアルゴリズム手順を使用し、回腸組織ライブラリ（39、SININOT03）から誘導されたIncye EST2858870を同定した。この配列に対応する全長クローンを更に検査して、全長DNA配列DNA 59849（Fig 63、配列番号：156）及び誘導PRO1155天然配列タンパク質UNQ585（Fig 64、配列番号：157）を単離した。

40

太字の下線で示したように、Fig 64に示されたUNQ585（配列番号：157）ポリペプチドは、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158-160に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置563-565に見られる停止コドン（TAA）で終端する。予測されるPRO1155ポリペプチド前駆体（すなわちUNQ585、配列番号：157）は135アミノ酸長であり、シグナルペプチドはおよそアミノ酸残基1からおよそ8にあり、ロイシンジッパーパターンはおよそアミノ酸残基43からおよそ64にあり、さらにタキキニンファミリーシグネチャーはおよそアミノ酸残基86からおよそ91にある。UNQ585（配列番号：157）は約14833ダルトンの算定分子量及び約9.78の算定pIを持つ。DNA 59849を含むcDNA

50

クローン（配列番号：156）は、DNA59849-1504と命名され、1998年6月16日にATCCに寄託され、寄託番号209986が付与されている。AG. ヒトPRO1250（UNQ633）をコードするcDNAクローンの単離

上述のシグナルアルゴリズム手順を使用し、IncycyteデータベースからのIncycyte ESTクラスター配列番号56523と称されるESTクラスター配列を同定した。次いでこの配列を、上述のシグナルアルゴリズム手順下で記載されたようにして広範な様々なESTデータベースと比較して、さらにIncycyte EST3371784を同定した。このEST配列に対応する全長クローンを更に検査し配列決定して、全長DNA配列DNA60775（Fig65、配列番号：158）及び誘導PRO1250天然配列タンパク質UNQ633（Fig66、配列番号：159）を単離した。

クローンDNA60775（配列番号：158）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74-76に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置2291-2293の停止コドン（TAG）で終端する（Fig65）。予測されるPRO1250ポリペプチド前駆体（すなわちUNQ633、配列番号：159）は739アミノ酸長である（Fig66）。Fig66に示すUNQ633（配列番号：159）タンパク質は約82263ダルトンの算定分子量及び約7.55の算定pIを持つ。UNQ633（配列番号：159）の分析により、以下の存在が証明された：およそアミノ酸残基61からおよそ80にII型膜貫通ドメイン、およそアミノ酸残基314からおよそ325に推定AMP-結合ドメインシグネチャー、及びおよそアミノ酸残基102からおよそ105、およそアミノ酸残基588からおよそ591及びおよそアミノ酸残基619からおよそ622に潜在的N-グルコシル化部位。DNA60775を含むcDNAクローン（配列番号：158）は1998年9月1日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203173が付与されている。

#### 【0110】

AH. ヒトPRO1312（UNQ678）をコードするcDNAクローンの単離EST（DNA55773）を、一次cDNAクローンの5'末端を優先的に提示するヒト胎児腎臓cDNAライブラリにおいて、酵母スクリーニングを使用して同定した。DNA55773配列に基づき、全長DNA配列DNA61873（Fig67、配列番号：160）及び誘導PRO1312天然配列UNQ678（配列番号：161）を単離するためのプローブとして使用するためのオリゴヌクレオチドを合成した。

太字の下線で示すように、Fig67に示す全長DNA61873クローン（配列番号：160）クローンは、単一のオープンリーディングフレームを含み、およそヌクレオチド位置7-9に見かけの翻訳開始部位を有し、およそヌクレオチド位置643-645に見られる停止コドン（TGA）で終端する。予測されるPRO1312ポリペプチド前駆体（すなわちUNQ678、配列番号：161）は212アミノ酸長である。UNQ678（配列番号：161）は約24024ダルトンの算定分子量及び約6.26の算定pIを持つ。他の特徴は、およそアミノ酸1-14にシグナルペプチド：およそアミノ酸141-160の膜貫通ドメイン、及びおよそアミノ酸76-79及び93-96の潜在的N-グルコシル化部位を含む。DNA61873を含むcDNAクローン（配列番号：161）は、DNA61873-1312の名称で1998年8月18日にATCCに寄託され、寄託番号203132が付与されている。

AI. ヒトPRO1192（UNQ606）をコードするcDNAクローンの単離ヒト胎児肝臓ライブラリにおいて上述のECD相同性手順を使用し、全長DNA配列DNA62814（Fig69、配列番号：162）と誘導PRO1192天然配列タンパク質UNQ606（Fig70、配列番号：163）を単離した。

DNA62814（配列番号：162）の単離に使用したPCRプライマー（正方向及び逆方向）及びハイブリッド形成プローブ及びは以下の通りである：

正方向PCRプライマー(35924.f1):

5'-CCGAGGCCATCTAGAGGCCAGGC-3'

(配列番号: 164)

逆方向PCRプライマー(35924.r1):

5'-ACAGGCAGAGCCAATGCCAGAGC-3'

(配列番号: 165)

ハイブリッド形成プローブ(35924.p1):

(配列番号: 166)

5'-GAGAGGACTGCGGGAGTTTGGGACCTTTGTGCAGACGTGCTCATG-3'

太字の下線で示したように、クローンDNA62814 (Fig 69、配列番号: 162) 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、ヌクレオチド位置766-768に見かけの停止コドン (TAA) を有する。予測されるPRO1192ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ606、配列番号: 163) は215アミノ酸長である。Fig 70に示すUNQ606 (配列番号: 163) ポリペプチド前駆体は、およそアミノ酸1-21にシグナルペプチド; およそアミノ酸153-176に膜貫通ドメイン; およそアミノ酸39-42及び118-121に潜在的N-グルコシル化部位; 及びおよそアミノ酸27-68及び99-128にミエリンP0タンパク質との相同体を有する。Fig 70に示すUNQ606 (配列番号: 163) は約24484ダルトンの算定分子量と約6.98のpIを持つ (Fig 36)。

DNA62814-1521と命名されたDNA62814を含むcDNAクローン (配列番号: 162) は1998年8月4日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203093が付与されている。

#### 【0111】

AJ. ヒトPRO1246 (UNQ630) をコードするcDNAクローンの単離

上述のシグナルアルゴリズム手順を使用し、IncycyteデータベースからのIncycyte ESTクラスター配列番号56853と指定されたESTクラスター配列を同定した。次いでこの配列を、上述のシグナルアルゴリズム手順下で記載されたようにして広範な種々のESTデータベースと比較して、さらにIncycyte EST2481345を同定した。このEST配列に対応する全長クローンを更に検査し配列決定して、全長DNA配列DNA64885 (Fig 71、配列番号: 167) 及び誘導PRO1246天然配列タンパク質UNQ630 (Fig 72、配列番号: 168) を単離した。

太字の下線で示すように、クローンDNA64885 (配列番号: 167) 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119-121に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置1727-1729の停止コドン (TGA) で終端する (Fig 71)。予測されるPRO1246ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ630、配列番号: 168) は536アミノ酸長であり (Fig 72)、約61450ダルトンの算定分子量及び約9.17のpIを持つ。UNQ630 (Fig 72、配列番号: 168) の分析により、以下のもの: およそアミノ酸1からおよそアミノ酸15にシグナルペプチド、およそアミノ酸108からおよそアミノ酸111、およそアミノ酸116からおよそアミノ酸169、およそアミノ酸193からおよそアミノ酸196、およそアミノ酸262からおよそアミノ酸265、およそアミノ酸375からおよそアミノ酸378、およそアミノ酸413からおよそアミノ酸416及びおよそアミノ酸498からおよそアミノ酸501に潜在的N-グルコシル化部位、及びおよそアミノ酸286からおよそアミノ酸315、およそアミノ酸359からおよそアミノ酸369及びおよそアミノ酸78からおよそアミノ酸97にスルファターゼタンパク質と相同性を有するアミノ酸配列ブロックが、明らかになった。DNA64885-1529と命名されたDNA64885を含むcDNAクローン (配列番号: 167) は1998年11月3日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203457が付与されている。

AK. ヒトPRO1283 (UNQ653) をコードするcDNAクローンの単離

ヒト乳房腫瘍組織ライブラリにおいて上述のECD相同性手順を使用し、全長DNA配列DNA65404 (Fig 73、配列番号: 169) と誘導PRO1283天然配列タンパク質UNQ653 (Fig 74、配列番号: 170) を単離した。

10

20

30

40

50

DNA 65404（配列番号：169）使用されたPCRプライマー（正方向及び逆方向）及びハイブリッド形成プローブは以下の通りである：

正方向プライマー：(28753.f1)：

5'-GGAGATGAAGACCCTGTTCTTG-3' (配列番号：171)

正方向プライマー：(28753.f2)：

5'-GGAGATGAAGACCCTGTTCTGGTG-3' (配列番号：172)

逆方向プライマー：(28753.r1)：

5'-GTCCTCCGGAAGTCCTTATC-3' (配列番号：173)

逆方向プライマー：(28753.r2)：

5'-GCCTAGTGTTCGGGAACGCAGCTTC-3' (配列番号：174)

ハイブリッド形成プローブ：(48466.p1)：

5'-CAGGGACCTGGTACGTGAAGCCATGGTGGTCGATAAGGACTTCCGGAG-3' (配列番号：175)

ハイブリッド形成プローブ：(48466.p2)：

5'-CTGTCCTTACCCTGGAGGAGGAGGATATCACAGGACCTGGTAC-3' (配列番号：176)

太字の下線で示したように、クローンDNA 65404（配列番号：169）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45-47に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置555-557の停止コドン（TAG）で終端する（Fig 73）。予測されるPRO1283ポリペプチド前駆体（すなわちUNQ653、配列番号：170）は170アミノ酸長である（Fig 74）。Fig 74に示すUNQ653（配列番号：170）タンパク質は約19457ダルトンの算定分子量と約9.10のpIを持つ。UNQ653（配列番号：170）の分析により、以下の存在が証明された：およそアミノ酸1からおよそアミノ酸17にシグナルペプチド。DNA 65404-1551と称されるDNA 65404を含むcDNAクローン（配列番号：169）は1998年9月9日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203244が付与されている。

#### 【0112】

AL. ヒトPRO1195（UNQ608）をコードするcDNAクローンの単離

上述のシグナルアルゴリズム手順を使用し、IncyteデータベースからのESTクラスター配列32204を同定した。次いでこの配列を、上述のシグナルアルゴリズム手順下で記載されたようにして広範な種々のESTデータベースと比較して、さらにIncyte EST352980を同定した。このEST配列に対応する全長クローンを更に検査し配列決定して、全長DNA配列DNA 65412（Fig 75、配列番号：177）及び誘導PRO1195天然配列タンパク質UNQ608（Fig 76、配列番号：178）を単離した。

太字の下線で示すように、全長クローンDNA 65412（配列番号：177）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58-60に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置511-513の停止コドン（TAG）で終端する（Fig 75）。予測されるPRO1195ポリペプチド前駆体（すなわちUNQ608、Fig 76、配列番号：178）は151アミノ酸長であり、17227ダルトンの算定分子量及び約5.33のpIを持つ。UNQ608（配列番号：178）の分析により、およそアミノ酸1-22があり、約17277ダルトンの算定分子量及び約5.33の算定pIを持つことが示される。DNA 65412-1523と称されるDNA 65412を含むcDNAクローン（配列番号：177）は1998年8月4日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203094が付与されている。

AM. ヒトPRO1343（UNQ698）をコードするcDNAクローンの単離

ヒト平滑筋細胞組織から単離された組織について上述のアミラーゼ酵母菌スクリーニング手順を使用し、以下のオリゴヌクレオチドを作成するためのテンプレートとなるEST配列を得、ヒト平滑筋細胞組織ライブラリにおいて上述したようにスクリーニングして、全長DNA配列DNA 66675（Fig 77、配列番号：179）と誘導PRO1343

10

20

30

40

50

天然配列タンパク質UNQ698 (Fig 78、配列番号: 180) を単離した。

使用したオリゴヌクレオチドプローブは以下の通りである:

正方向プライマー: (48921.f1):

5'-CAATATGCATCTTGCACGTCTGG-3' (配列番号: 181)

逆方向プライマー: (48921.r1):

5'-AAGCTTCTCTGCTTCCTTCCTGC-3' (配列番号: 182)

ハイブリッド形成プローブ: (48921.p1):

5'-TGACCCATTGAGAAGGTCATTGAAGGGATCAACCGAGGGCTG-3' (配列番号: 183)

太字の下線で示したように、全長クローンDNA66675 (配列番号: 179) 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71-73に見かけの翻訳開始部位、ヌクレオチド位置812-814の停止シグナル(TAA)を有する (Fig 77)。予測されるPRO1343ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ698、配列番号: 180、Fig 78) は274アミノ酸長であり、約25335ダルトンの算定分子量と約7.0の算定pIを持つ。Fig 78に示すUNQ698配列 (配列番号: 180) の分析により、以下の存在が証明された: およそアミノ酸1からおよそアミノ酸25にシグナルペプチド、及びおよそアミノ酸35からおよそアミノ酸225にサーカムスポロゾイト (circumsporozoite) リピートと相同性の領域。DNA66675-1587と称されるDNA66675を含むcDNAクローン (配列番号: 179) は1998年9月22日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203282が付与されている。

別に、上述のアミラーゼスクリーニングから単離された酵母EST配列の比較を、公的及び私的な種々のESTデータベースに対してスクリーニングし (例えば、上述のECD相同性手順を参照のこと)、Incyte ESTクローン番号4701148を同定した。対応全長クローンをさらに分析し配列決定して、Fig 77に示すDNA66675配列 (配列番号: 179) を単離した。

#### 【0113】

AN. ヒトPRO1418 (UNQ732) をコードするcDNAクローンの単離

上述のシグナルアルゴリズム手順を使用し、ESTクラスター配列10698 (Incyte クラスター121480) を同定した。次いでこの配列を、上述のシグナルアルゴリズム手順下で記載されたようにして広範な種々のESTデータベース (胎盤組織ライブラリから得られたものを含む) と比較して、さらにIncyte EST1306026を同定した。このEST配列に対応する全長クローンを更に検査し配列決定して、全長DNA配列DNA68864 (Fig 79、配列番号: 184) 及び誘導PRO1418天然配列タンパク質UNQ732 (Fig 80、配列番号: 185) を単離した。

太字の下線で示すように、Fig 79に示す全長クローン (DNA68864、配列番号: 184) 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138-140に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置1188-1190に見られる停止コドン(TAA)で終端する。予測されるPRO1418ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ732、配列番号: 185) は350アミノ酸長であり、およそアミノ酸1-19にシグナルペプチドを有し、約39003ダルトンの算定分子量及び約5.59の算定pIを持つ。DNA68864-1629と称されるDNA68864を含むcDNAクローン (配列番号: 184) は1998年2月22日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203276が付与されている。

#### 【0114】

AO. ヒトPRO1387 (UNQ722) をコードするcDNAクローンの単離

上述のシグナルアルゴリズム手順を使用し、ESTクラスター配列10298を同定した。次いでこの配列を、上述のシグナルアルゴリズム手順下で記載されたようにして広範な種々のESTデータベースと比較して、さらにIncyte EST3507924を同定した。このEST配列に対応する全長クローンを更に検査し配列決定して、全長DNA配列DNA68872 (Fig 81、配列番号: 186) 及び誘導PRO1387天然配

10

20

30

40

50

列タンパク質UNQ722 (Fig 82、配列番号: 187) を単離した。

太字の下線で示すように、クローンDNA68872 (配列番号: 186) 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76-78に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置1258-1260の停止コドン (TGA) で終端する (Fig 81)。予測されるPRO1387ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ722、配列番号: 187) は394アミノ酸長である。Fig 82に示すUNQ722 (配列番号: 187) タンパク質は、約44339ダルトンの算定分子量及び約7.10のpIを持つ。さらに、UNQ722 (配列番号: 187) は、およそアミノ酸残基1からおよそ残基19にシグナルペプチド、およそ残基275からおよそ残基296に膜貫通ドメイン、およそ残基76、231、302、307及び376に潜在的N-グリコシル化部位、及びおよそアミノ酸残基210からおよそ残基239及びおよそアミノ酸残基92からおよそ残基121にミエリンp0タンパク質と相同性を有するアミノ酸配列ブロックを含む。DNA68872-1620と称されるDNA68872を含むcDNAクローンは1998年8月25日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203160が付与されている。

10

AP. ヒトPRO1410 (UNQ728) をコードするcDNAクローンの単離

上述のシグナルアルゴリズム手順を使用し、ESTクラスター配列98502を同定した。次いでこの配列を、上述のシグナルアルゴリズム手順下で記載されたようにして広範な種々のESTデータベースと比較して、さらにIncycyte EST1257046を同定した。このEST配列に対応する全長クローンを更に検査し配列決定して、全長DNA配列DNA68874 (Fig 83、配列番号: 188) 及び誘導PRO1387天然配列タンパク質UNQ728 (Fig 84、配列番号: 189) を単離した。

20

太字の下線で示すように、クローンDNA68874 (配列番号: 188) 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152-154に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置866-868の停止コドン (TGA) で終端する (Fig 83)。予測されるPRO1410ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ728、配列番号: 189) は238アミノ酸長である (Fig 84)。Fig 84に示すUNQ728タンパク質 (配列番号: 189) は、約25262ダルトンの算定分子量及び約6.44のpI、およそアミノ酸残基1からおよそ残基20にシグナルペプチド、およそアミノ酸残基194からおよそ残基220に膜貫通ドメイン、及びおよそアミノ酸残基132に潜在的N-グリコシル化部位を有する。DNA68874を含むクローンは1998年9月22日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203277が付与されている。

30

AQ. ヒトPRO1917 (UNQ900) をコードするcDNAクローンの単離

上述のシグナルアルゴリズム手順を使用し、ESTクラスター配列85496を同定した。次いでこの配列を、上述のシグナルアルゴリズム手順下で記載されたようにして広範な種々のESTデータベースと比較して、さらにIncycyte EST3255033を同定した。このESTは卵巣腫瘍ライブラリから得た。このEST配列に対応する全長クローンを更に検査し配列決定して、全長DNA配列DNA76400 (Fig 85、配列番号: 190) 及び誘導PRO1917天然配列タンパク質UNQ900 (Fig 86、配列番号: 191) を単離した。

40

太字の下線で示すように、Fig 85に示す全長クローンDNA76400 (配列番号: 190) 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6-9に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置1467-1469に見られる停止コドン (TGA) で終端する。予測されるPRO1917ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ900、配列番号: 191) は487アミノ酸長である。UNQ900 (配列番号: 191) タンパク質は、約55051ダルトンの算定分子量及び約8.14のpIを持つ。付加的な特徴には、およそアミノ酸残基1-30にシグナルペプチド; およそアミノ酸残基242から481に潜在的N-グリコシル化部位、およそアミノ酸残基95-97、182-184及び427-429にプロテインキナーゼCリン酸化部位; およそアミノ酸残基107-112、113-118、117-122、118-123及び128-13

50

3にN-ミリスチル化部位；およそアミノ酸残基484-487に小胞体標的配列があることが含まれる。

#### 【0115】

AR. ヒトPRO1868 (UNQ859) をコードするcDNAクローンの単離 ヒト胎児肝臓ライブラリにおいて上述のECD相同性手順を使用し、ESTクローン番号2994689を同定した。対応全長クローンをさらに分析し配列決定して、DNA77624 (Fig87、配列番号：192) 及び誘導PRO1868天然配列タンパク質UNQ859 (Fig88、配列番号：193) を単離した。

太字の下線で示したように、クローンDNA77624 (配列番号：193) 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51-53に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置981-983の停止コドン (TGA) で終端する。予測されるPRO1868ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ859、配列番号：193、Fig89) は310アミノ酸長である。Fig89に示すUNQ859 (配列番号：193) タンパク質は約35020ダルトンの算定分子量と約7.90のpI、およそアミノ酸残基243からおよそ残基263に膜貫通ドメイン、およそアミノ酸残基104から192にN-グリコシル化部位、およそアミノ酸残基107からおよそ残基110にcAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位、およそアミノ酸残基106からおよそ残基109及びおよそアミノ酸残基296からおよそ残基299にカゼインキナーゼIIリン酸化部位、およそアミノ酸残基69からおよそ残基77にチロシンキナーゼリン酸化部位、及びおよそアミノ酸残基26からおよそ残基31、およそ残基215からおよそ残基220、およそ残基226からおよそ残基231、およそ残基243からおよそ残基248、およそ残基244からおよそ残基249及びおよそ残基262からおよそ残基267に潜在的N-ミリスチル化部位を有する。DNA77624を含むクローン (配列番号：193) は1998年12月22日にATCCに寄託され、寄託番号203553が付与されている。

#### 【0116】

AS. ヒトPRO205 (UNQ179) をコードするcDNAクローンの単離 上述のECD相同性手順を使用し、ヒト網膜ライブラリから誘導されたEST配列を同定した。インビボクローニング手順を使用し全長クローンをさらに同定する試みがなされたが、これは他のPRO205コード化DNA配列を同定できなかった。

Fig90のUNQ179 (配列番号：229) ポリペプチドと実質的に相同な他のポリペプチドをコードするDNA配列は、Genbank提出物AB033089\_1及びHSM802147\_1として見出され得る。

Fig89に太字の下線で示したように、クローンDNA30868 (配列番号：89) は、不完全な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405-407に見かけの翻訳開始部位を有する。予測される部分長PRO1868ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ179、配列番号：229) は343アミノ酸長であり、約39285ダルトンの算定分子量と6.06のpIを持つ。

Fig90に示すUNQ179 (配列番号：229) の分析により、およそアミノ酸残基1から20にシグナルペプチド、およそアミノ酸残基318-322にN-グリコシル化部位、およそアミノ酸残基21-29およそアミノ酸残基211-220にチロシンキナーゼリン酸化部位、およそ残基63-69及び317-323にN-ミリスチル化部位、及びおよそ残基260-271に原核生物膜リポタンパク質脂質付着部位があることが明らかになった。DNA30868を含むcDNAクローン (配列番号：228) はDNA30868-1156との命名されて2000年3月2日にATCCに寄託され、寄託番号が付与されている。

AT. ヒトPRO21 (UNQ21) をコードするcDNAクローンの単離

天然配列PRO21ポリペプチドUNQ21 (Fig92、配列番号：231) をコードするDNA36638 (Fig91、配列番号：230) は、米国特許第5,955,420号に先に記載されている。さらなるクローニング及び特徴付けの情報はSchnei

der等, Cell 54(6):787-93(1988)及びManfiolletti等, Mol. Cell. Biol., 13(8):4976-85(1993)に見出すことができる。

太字の下線で示したように、クローンDNA36638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168-170に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置2187-2198の停止コドン(TAG)終端する(Fig 91)。予測されるPRO21ポリペプチド前駆体(すなわちUNQ21、配列番号:231)は673アミノ酸長であり、74512ダルトンの算定分子量と5.45のpIを持つ。DNA36638-1056と称されるDNA36638を含むcDNAクローンは1997年11月12日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209456が付与されている。Fig 92のUNQ179ポリペプチド(配列番号:231)の分析により、およそアミノ酸残基1-27にシグナルペプチド、およそアミノ酸残基619-635に膜貫通ドメイン、およそ残基417-421及び488-492にN-グリコシル化部位、およそアミノ酸残基126-132、135-141、146-152、173-179、214-220、253-259、346-352、374-380、440-446、479-485、497-503、517-523、612-618にN-ミリスチル化部位、およそアミノ酸残基130-142、168-180、209-221及び248-260にアスパラギン酸及びアスパラギンヒドロキシル化部位、およそアミノ酸残基139-151にビタミンK依存性カルボキシル化ドメイン及びEGF様ドメインシステインパターンシグネチャーがあることが明らかになった。

AU. ヒトPRO269(UNQ236)をコードするcDNAクローンの単離  
ヒト胎児腎臓ライブラリにおいて、プローブオリゴヌクレオチドと以下のプライマー対の一方を使用するインビトロクロニング手順を組み合わせて上述のECD相同性手順を使用し、全長DNA配列DNA38260(Fig 93; 配列番号:232)と誘導PRO269天然配列タンパク質UNQ236(Fig 94、配列番号:233)を同定した。使用したハイブリッド形成プローブ及び正方向及び逆方向PCRプライマーは以下の通りである:

正方向PCRプライマー(.f1):

5'-TGGAAGGAGATGCGATGCCACCTG-3' (配列番号:234)

正方向PCRプライマー(.f2): 5'-TGACCAGTGGGAAGGACAG-3' (配列番号:235)

正方向PCRプライマー(.f3): 5'-ACAGAGCAGAGGGTGCCTTG-3' (配列番号:236)

逆方向PCRプライマー(.r1):

5'-TCAGGGACAAGTGGTGTCTCTCCC-3' (配列番号:237)

逆方向PCRプライマー(.r2):

5'-TCAGGGAAGGAGTGTGCAGTTCTG-3' (配列番号:238)

ハイブリッド形成プローブ:

5'-ACAGCTCCCGATCTCAGTTACTTGCATCGCGGACGAAATCGGCGCTCGCT-3' (配列番号:239)

太字の下線で示したように、クローンDNA38260(配列番号:232)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314-316に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置1784-1786の停止コドン(TAG)で終端する(Fig 93)。予測されるPRO269ポリペプチド前駆体は490アミノ酸長であり(すなわちUNQ236、Fig 94、配列番号:233)(Fig 30)、51636の算定分子量と6.29のpIを持つ。DNA38260を含むcDNAクローン(配列番号:232)は1997年10月17日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209397が付与されている。

Fig 94のUNQ236ポリペプチド(配列番号:223)の分析により、およそアミノ酸残基1-16にシグナル配列、およそ残基399-418に膜貫通ドメイン、およそ



アミノ酸残基 189-193 及び 381-385 に N-グルコシル化部位、およそアミノ酸残基 289-293 にグリコサミノグリカン付着部位、およそアミノ酸残基 98-102 及び 434-438 に cAMP- 及び cGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位、およそアミノ酸残基 30-36、35-41、58-64、59-65、121-127、151-157、185-191、209-215、267-273、350-356、374-380、453-459、463-469 及び 477-483 に N-ミリストル化部位、及びおよそアミノ酸残基 262-274 にアスパラギン酸及びアスパラギンヒドロキシル化部位があることが明らかになった。

#### 【0117】

AV. ヒト PRO344 (UNQ303) をコードする cDNA クローンの単離  
ヒト胎児腎臓ライブラリにおいて、プローブオリゴヌクレオチドと以下のプライマー対の一方を使用するインビボクロニング手順を組み合わせて上述の ECD 相同性手順を使用し、全長 DNA 配列 DNA40592 (Fig95; 配列番号: 240) と誘導 PRO344 天然配列タンパク質 UNQ303 (Fig96、配列番号: 241) を同定した。使用したハイブリッド形成プローブ及び正方向及び逆方向 PCR プライマーは以下の通りである:

正方向 PCR プライマー (34398.f1):

5'-TACAGGCCAGTCAGGACCAGGGG-3' (配列番号: 242)

正方向 PCR プライマー (34398.f2):

5'-AGCCAGCCTCGCTCTCGG-3' (配列番号: 243)

正方向 PCR プライマー (34398.f3):

5'-GTCTGCGATCAGGTCTGG-3' (配列番号: 244)

逆方向 PCR プライマー (34398.r1):

5'-GAAAGAGGCAATGGATTCCG-3' (配列番号: 245)

逆方向 PCR プライマー (34398.r2):

5'-GACTTACACTTGCCAGCACAGCAC-3' (配列番号: 246)

ハイブリッド形成プローブ (34398.p1):

5'-GGAGCACCACCAACTGGAGGGTCCGGAGTAGCGAGCGCCCGAAG-3' (配列番号: 247)

クローン DNA40592 (配列番号: 240) 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 227-229 に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 956-958 の停止コドン (TAG) で終端する (Fig95)。予測される PRO344 ポリペプチド前駆体 (すなわち UNQ303、配列番号: 241) は 243 アミノ酸長であり (Fig96)、25298 の算定分子量と 6.44 の pI を持つ。Fig96 の UNQ303 ポリペプチド (配列番号: 241) の分析により、およそアミノ酸残基 1-15 にシグナル配列、およそアミノ酸残基 11-17、68-74 及び 216-222 に N-ミリストル化部位、及びおよそアミノ酸残基 77-80 に細胞付着部位があることが明らかになった。DNA40592 を含む cDNA クローン (配列番号: 240) は 1997 年 11 月 21 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 209492 が付与されている。

#### 【0118】

AX. ヒト PRO333 (UNQ294) をコードする cDNA クローンの単離  
インビボクロニング手順を組み合わせて上述の ECD 相同性手順を使用し、部分長配列 DNA41374 (配列番号: 248、Fig97) を同定した。

太字の下線で示したように、クローン DNA41374 (配列番号: 248) は、不完全な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 1185-1187 に見かけの翻訳終止部位 (すなわち停止コドン、TGA) を有する。予測される部分長 PRO333 ポリペプチド (すなわち UNQ294、配列番号: 249) は 394 アミノ酸長であり、43725 の算定分子量と 8.36 の pI を持つ。

Fig98 の UNQ294 (配列番号: 249) ポリペプチドの分析により、およそアミノ酸残基 1-14 にシグナル配列、およそアミノ酸残基 359-376 に膜貫通ドメイン

10

20

30

40

50

、およそアミノ酸残基 166-172、206-212、217-223、246-252、308-314、312-318、361-367 に N-ミリスチル化部位、及びアミノ酸残基 315-323 に免疫グロブリンと主要組織適合性複合体タンパク質シグネチャーがあることが明らかになった。DNA 41374 を含む cDNA クローン（配列番号：240）は ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号が付与されている。

AY. ヒト PRO381 (UNQ322) をコードする cDNA クローンの単離  
ヒト胎児腎臓ライブラリにおいて上述の ECD 相同性手順を使用し、全長 DNA 配列 DNA 44194 (Fig 99、配列番号：250) と誘導 PRO381 天然配列タンパク質 UNQ322 (Fig 100、配列番号：251) を同定した。

使用したハイブリッド形成プローブ及び正方向及び逆方向 PCR プライマーは以下の通りである： 10

正方向 PCR プライマー (39651.f1)：

5'-CTTCCTTGCTTCAGCAACATGAGGC-3' (配列番号：252)

逆方向 PCR プライマー (39651.r1)：

5'-GCCAGAGCAGGAGGAATGATGAGC-3' (配列番号：253)

ハイブリッド形成プローブ (39651.p1)：

5'-GTGGAACGCGTCTTGACTCTGTTCTGCTCACTTCTTGATTGGGGCTTTG-3' (配列番号：254)

)

太字の下線で示したように、クローン DNA 44194 (配列番号：250) 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 174-176 に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 807-809 の停止コドン (TAG) で終端する。予測される PRO381 ポリペプチド前駆体（すなわち UNQ322、Fig 100、配列番号：251）は 211 アミノ酸長であり、24172 の算定分子量と 5.99 の pI を持つ。Fig 100 に示す UNQ322 (配列番号：251) タンパク質は次の特徴を有する：およそアミノ酸残基 1 からおよそ 20 にシグナル配列、およそアミノ酸残基 156 に潜在的 N-グルコシル化部位、およそアミノ酸残基 143 からおよそ 146、およそ残基 156 からおよそ 159、およそ残基 178 からおよそ 181、およそ残基 200 からおよそ 203 に潜在的カゼインキナーゼリン酸化部位、およそアミノ酸残基 78 からおよそ 114 及びおよそ残基 118 からおよそ 131 に小胞体標的配列、およそアミノ酸残基 140 からおよそ 159 に EF-腕カルシウム結合ドメイン、及びおよそアミノ酸残基 183 からおよそ 203 に S-100/I CaBP 型カルシウム結合ドメインが存在する。DNA 44194 を含む cDNA クローン（配列番号：250）は 1998 年 4 月 28 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 209808 が付与されている。

20

30

40

50

【0119】

AZ. マウス PRO720 (UNQ388) をコードする cDNA クローンの単離  
DNA 53517 (配列番号：255) の調製については、上述の「X. ヒト PRO770 (UNQ408) をコードする cDNA クローンの単離」に記載されている。太字の下線で示したように、クローン DNA 53517 (配列番号：255) 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 36-38 に見かけの翻訳開始部位を有し、369-371 の停止コドン (TAA) で終端する。予測される PRO720 ポリペプチド前駆体（すなわち UNQ388、配列番号：256）は 111 アミノ酸長であり (Fig 102)、11936 の算定分子量と 5.21 の pI を持つ。

Fig 102 の UNQ388 (配列番号：256) ポリペプチドの分析により、およそアミノ酸残基 1-23 にシグナル配列、およそアミノ酸残基 70-76 及び 75-81 に N-ミリスチル化部位、及び 66-77 及び 68-79 に原核生物膜リポタンパク質脂質付着部位があることが示される。DNA 53517 を含む cDNA クローン（配列番号：255）は 1998 年 4 月 23 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 209802 が付与されている。

BA. ヒト PRO866 (UNQ435) をコードする cDNA クローンの単離

ヒト胎児腎臓ライブラリにおいて上述の ECD 相同性手順を使用し、全長 DNA 配列 DNA

A 5 3 9 7 1 (F i g 1 0 3、配列番号：2 5 7)と誘導 P R O 8 6 6 天然配列タンパク質 U N Q 4 3 5 (F i g 1 0 4、配列番号：2 5 8)を同定した。

使用したハイブリッド形成プローブ及び正方向及び逆方向 P C R プライマーは以下の通りである：

正方向 P C R プライマー(4 4 7 0 8. f 1)：

5'-CAGCACTGCCAGGGAAGAGGG-3' (配列番号：2 5 9)

正方向 P C R プライマー(4 4 7 0 8. f 2)：

5'-CAGGACTCGCTACGTCCG-3' (配列番号：2 6 0)

正方向 P C R プライマー(4 4 7 0 8. f 3)：

5'-CAGCCCCCTTCTCCTCTTTCTCCC-3' (配列番号：2 6 1)

逆方向 P C R プライマー(4 4 7 0 8. r 1)：

5'-GCAGTTATCAGGGACGCACTCAGCC-3' (配列番号：2 6 2)

逆方向 P C R プライマー(4 4 7 0 8. r 2)：

5'-CCAGCGAGAGGCAGATAG-3' (配列番号：2 6 3)

逆方向 P C R プライマー(4 4 7 0 8. r 3)：

5'-CGGTACCGTGTCTCGGGATG-3' (配列番号：2 6 4)

ハイブリッド形成プローブ(4 4 7 0 8. p 1)：

5'-CAGCCCCCTTCTCCTCTTTCTCCACGTCCTATCTGCCTC-3' (配列番号：2 6 5)

太字の下線で示したように、クローン D N A 5 3 9 7 1 (配列番号：2 5 7)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 2 7 5 - 2 7 7 に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 1 2 6 8 - 1 2 7 0 の停止コドン (T A A) で終端する。予測される天然配列 P R O 8 6 6 ポリペプチド前駆体 (すなわち U N Q 4 3 5、配列番号：2 5 8) は 3 3 1 アミノ酸長であり (F i g 1 0 4)、3 5 8 4 4 の算定分子量と 5. 4 5 の p I を持つ。F i g 1 0 4 に示す U N Q 4 3 5 (配列番号：2 5 8) タンパク質は約 3 5 8 4 4 の算定分子量と約 5. 4 5 の p I を持つ。さらなる分析により、およそアミノ酸残基 1 からおよそ残基 2 6 にシグナル配列、およそアミノ酸残基 1 3 1 - 1 3 5 にグリコサミノグリカン付着部位、およそアミノ酸残基 1 4 4 - 1 4 8 に c A M P - 及び c G M P - 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位、及びアミノ酸残基 2 6 - 3 2、7 4 - 8 0、1 3 2 - 1 3 8、1 3 4 - 1 4 0、1 9 0 - 1 9 6、2 8 7 - 2 9 3 及び 2 9 0 - 2 9 6 に N - ミリスチル化部位があることが明らかになった。D N A 5 3 9 7 1 を含む c D N A クローン (配列番号：2 5 7) は 1 9 9 8 年 4 月 6 日に A T C C に寄託され、寄託番号 2 0 9 7 5 0 が付与されている。

#### 【0 1 2 0】

B B. ヒト P R O 8 4 0 (U N Q 4 3 3) をコードする c D N A クローンの単離

ヒト甲状腺ライブラリから単離された組織について酵母菌スクリーニング手順を使用し、P C R オリゴヌクレオチドを作成するためのテンプレートとなる E S T 配列を得、D N A 5 3 9 8 7 (F 配列番号：2 6 6、F i g 1 0 5) と誘導 P R O 8 4 0 天然配列タンパク質 U N Q 4 3 3 (配列番号：2 6 7、F i g 1 0 6) を単離した。

また F i g 1 0 6 の U N Q 4 3 3 (配列番号：2 6 7) と実質的に相同なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、受託番号 H E E P S S A R C \_ 1 として G e n b a n k から入手できる。

太字の下線で示したように、F i g 1 0 5 に示す D N A 5 3 9 8 7 (配列番号：2 6 6) はオープンリーディングフレームを含み、およそヌクレオチド位置 1 8 - 2 0 に翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 1 3 2 9 - 1 3 3 1 の停止コドン (T G A) で終端する (F i g 4 3)。ヌクレオチド残基 9 0 - 9 2 の第 2 のメチオニンコドンが実際の翻訳開始部位である可能性があり、あるいはこれは内部メチオニンをコードする。予測される P R O 8 4 0 ポリペプチド (すなわちより長い翻訳) は U N Q 4 3 3 (配列番号：2 6 7) と命名され、4 3 7 アミノ酸長であり (F i g 1 0 6)、4 9 8 5 1 ダルトンの算定分子量と 6. 4 7 の p I を持つ。

D N A 5 3 9 8 7 を含むクローン (配列番号：2 6 6) は、寄託番号 2 0 9 8 5 8 で、1

10

20

30

40

50

998年5月12日にATCCに寄託されている。

Fig 106のUNQ433ポリペプチド（配列番号：267）の分析により、およそアミノ酸残基1-46にシグナル配列、およそアミノ酸残基319-338に膜貫通ドメイン、およそ残基200-204にN-グルコシル化部位、アミノ酸残基23-27にcAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位、アミノ酸残基43-52にチロシンキナーゼリン酸化部位、及び残基17-23、112-118、116-122及び185-191にN-ミリスチル化部位があることが明らかになった。

BC. ヒトPRO982（UNQ483）をコードするcDNAクローンの単離

上述のシグナルアルゴリズム手順を使用し、ESTクラスター配列番号43715を同定した。次いでこの配列を、上述のシグナルアルゴリズム手順下で記載されたようにして広範な種々のESTデータベースと比較して、さらにMerck EST番号AA24389を同定した。このESTに対応する全長クローンによって、全長DNA配列DNA57700（Fig 107、配列番号：268）及び誘導PRO982天然配列タンパク質UNQ483（Fig 108、配列番号：269）を同定した。

太字の下線で示したように、Fig 107のDNA57700配列（配列番号：268）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26-28に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置401-403の停止コドン（TAA）で終端する。予測されるPRO982ポリペプチド前駆体（すなわちUNQ982、配列番号：191）は124アミノ酸長であり、約14198ダルトンの算定分子量及び約9.01の算定pIを持つ（Fig 108）。Fig 108のUNQ483（配列番号：269）ポリペプチドのさらなる分析により、およそアミノ酸残基1からおよそ21にシグナルペプチド、及びおよそアミノ酸残基1からおよそ残基59に潜在的アナフィラトキシンドメインがあることが示される。DNA57700を含むcDNAクローン（配列番号：268）は1999年1月12日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203583が付与されている。

#### 【0121】

BD. ヒトPRO836（UNQ545）をコードするcDNAクローンの単離

上述のシグナルアルゴリズム手順を使用し、ESTクラスターを同定し、次いでこれを上述のシグナルアルゴリズム手順下で記載されたようにして広範な種々のESTデータベースと比較して、さらにIncyte EST2610075、大腸腫瘍組織から得られたESTを同定した。このESTに対応する全長クローンにより、全長配列DNA59620（Fig 109、配列番号：270）及び誘導PRO836天然配列タンパク質UNQ545（Fig 110、配列番号：271）を同定した。

太字の下線で示したように、Fig 109に示すヌクレオチド配列DNA59620（配列番号：270）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65-67に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置1448-1450の停止コドン（TGA）で終端する。予測されるPRO836ポリペプチド前駆体（すなわちUNQ545、Fig 110、配列番号：271）は461アミノ酸長である。Fig 110に示すUNQ545（配列番号：271）は約52085ダルトンの算定分子量及び約5.36のpIを持つ。さらなる分析により、およそアミノ酸残基1からおよそ29にシグナルペプチド、およそアミノ酸残基193から236にN-グルコシル化部位、及びおよそ残基15、19、234、251、402及び451にN-ミリスチル化部位、およそアミノ酸残基364からおよそ372にYJL126w/YLR351c/yhcXファミリーのタンパク質に保存されたドメイン、及びおよそアミノ酸残基68から約340にSLS1タンパク質と配列同一性を有する領域があることが明らかになった。DNA59620を含むcDNAクローン（配列番号：270）は1998年6月16日にATCCに寄託され、寄託番号209989が付与されている。

#### 【0122】

BE. ヒトPRO1159（UNQ589）をコードするcDNAクローンの単離

上述のシグナルアルゴリズム手順を使用し、ESTクラスター配列77245を同定し、

次いでこれを上述のシグナルアルゴリズム手順下で記載されたようにして広範な種々のESTデータベースと比較して、さらにIncycyte EST番号376776を同定した。このESTに対応する全長クローンの分析により、全長配列DNA60627 (Fig 111、配列番号: 272) 及び誘導PRO1159天然配列タンパク質UNQ589 (Fig 112、配列番号: 273) を同定した。

太字の下線で示したように、クローンDNA60627 (配列番号: 272) 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92-94に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置362-364の停止コドン (TAG) で終端する (Fig 111)。予測されるPRO1159ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ589、配列番号: 273) は90アミノ酸長である (Fig 112)。Fig 112に示すUNQ589 (配列番号: 273) は約9840ダルトンの算定分子量及び約10.13のpIを持つ。

Fig 112に示すUNQ589 (配列番号: 273) 配列の分析により、以下の存在が証明された: およそアミノ酸残基1からおよそ残基15にシグナルペプチド、及びおよそアミノ酸残基38に潜在的N-グルコシル化部位。クローンDNA60627 (配列番号: 272) は1998年8月4日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203092が付与されている。

BF. ヒトPRO1358 (UNQ707) をコードするcDNAクローンの単離 上述のシグナルアルゴリズム手順を使用し、ESTクラスター配列を同定し、次いでこれを上述のシグナルアルゴリズム手順下で記載されたようにして広範な種々のESTデータベースと比較して、さらにIncycyte EST088718、肝臓組織ライブラリから得られる断片を同定した。このESTに対応する全長クローンの分析により、全長配列DNA64890 (Fig 113、配列番号: 274) 及び誘導PRO1358天然配列タンパク質UNQ707 (Fig 114、配列番号: 275) を同定した。

太字の下線で示したように、Fig 113に示すDNA64890 (配列番号: 274) クローンは、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86から88に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置1418から1420の停止コドン (TAA) で終端する (Fig 113)。予測されるPRO1358ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ707、配列番号: 275) は444アミノ酸長であり、シグナルペプチドはおよそアミノ酸残基1-18にある。UNQ707 (配列番号: 275) は約50719ダルトンの算定分子量及び約8.82の算定pIを持つ。DNA64890-1612と称されるDNA64890 (配列番号: 274) を含むcDNAクローンは1998年8月18日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203131が付与されている。

BG. ヒトPRO1325 (UNQ685) をコードするcDNAクローンの単離 上述のシグナルアルゴリズム手順を使用し、ESTクラスター配列番号139524を同定し、次いでこれを上述のシグナルアルゴリズム手順下で記載されたようにして広範な種々のESTデータベースと比較して、さらにIncycyte EST3744079を同定した。このESTに対応する全長クローンの分析により、全長配列DNA66659 (Fig 115、配列番号: 276) 及び誘導PRO1325天然配列タンパク質UNQ685 (Fig 116、配列番号: 277) を同定した。

太字の下線で示したように、クローンDNA66659 (Fig 115、配列番号: 276) 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51-53に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置2547-2549の停止コドン (TAG) で終端する。予測されるPRO1325ポリペプチド前駆体 (すなわちUNQ685、配列番号: 227) は832アミノ酸長である。Fig 116に示すUNQ685 (配列番号: 227) は約94454ダルトンの算定分子量及び約6.94のpIを持つ。UNQ685 (配列番号: 227) の分析により、およそアミノ酸1からおよそアミノ酸18にシグナルペプチド、およそアミノ酸292からおよそアミノ酸317、およそアミノ酸451からおよそアミノ酸470、およそアミノ酸501からおよそアミノ酸520、お

よそアミノ酸 607 からおよそアミノ酸 627、およそアミノ酸 751 からおよそアミノ酸 770 に膜貫通ドメイン、およそアミノ酸 497 からおよそアミノ酸 518 にロイシンジッパーパターン配列、及びおよそアミノ酸 27 からおよそアミノ酸 30、およそアミノ酸 54 からおよそアミノ酸 57、およそアミノ酸 60 からおよそアミノ酸 63、およそアミノ酸位置 123 からおよそアミノ酸位置 126、およそアミノ酸位置 141 からおよそアミノ酸位置 144、およそアミノ酸位置 165 からおよそアミノ酸位置 168、およそアミノ酸位置 364 からおよそアミノ酸位置 367、およそアミノ酸位置 476 からおよそアミノ酸位置 479、およそアミノ酸位置 496 からおよそアミノ酸位置 499、およそアミノ酸位置 572 からおよそアミノ酸位置 575、およそアミノ酸位置 603 からおよそアミノ酸位置 606 及びおよそアミノ酸位置 699 からおよそアミノ酸位置 702 に N-グルコシル化部位があることが明らかになった。DNA 66659 を含む cDNA クローン（配列番号：276）は 1998 年 9 月 22 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 203269 が付与されている。

#### 【0123】

BH. ヒト PRO1338 (UNQ693) をコードする cDNA クローンの単離  
酵母菌スクリーニングを使用して EST 配列を得、ついで、ECD 相同性下で上述したものと類似した方法で公的及び私的な種々の EST データベースと比較し、胆嚢炎のある胆嚢組織から得られた EST である Incyte EST2615184 を同定した。対応する全長配列の分析により、DNA 66667（配列番号：278、Fig 117）及び誘導 PRO1338 天然配列タンパク質 UNQ693（配列番号：279、Fig 118）を単離した。

太字の下線で示したように、Fig 117 に示す DNA 66667（配列番号：278）は、単一のオープンリーディングフレームを含み、およそヌクレオチド残基 115-117 に翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 2263-2265 の停止コドン (TAA) で終端する (Fig 77)。予測される PRO1338 ポリペプチド前駆体（すなわち UNQ693、配列番号：118）は 716 アミノ酸長であり (Fig 118)、80716 ダルトンの算定分子量と 6.06 の pI を持つ。

Fig 118 の UNQ693 ポリペプチド（配列番号：278）の分析により、およそアミノ酸残基 1 から 25 にシグナルペプチド、およそアミノ酸残基 629-648 に膜貫通ドメイン、およそアミノ酸残基 69-73、96-100、106-110、117-121、385-389、517-521、582-586 及び 611-615 に N-グルコシル化部位、およそ残基 573-582 にチロシンキナーゼリン酸化部位、及びおよそアミノ酸残基 16-22、224-230、464-470、637-643 及び 698-704 に N-ミリスチル化部位があることが明らかになった。

DNA 66667-1596 と称される DNA 66667 を含む cDNA クローン（配列番号：278）は 1998 年 9 月 22 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 203267 が付与されている。

BI. ヒト PRO1434 (UNQ739) をコードする cDNA クローンの単離 ヒト網膜組織ライブラリについて上述の ECD 相同性手順を使用し、全長 DNA 配列 DNA 68818 (Fig 119、配列番号：280) と誘導 PRO1434 天然配列タンパク質 UNQ739 (Fig 120、配列番号：281) を同定した。

この手順において合成されたハイブリッド形成プローブ及び PCR プライマー（正方向及び逆方向）は以下の通りである：

正方向 PCR プライマー：

5'-GAGGTGCTCGCTGTGAAGCCAACGG-3' (配列番号：282)

逆方向 PCR プライマー：

5'-CGCTCGATTCTCCATGTGCCTTCC-3' (配列番号：283)

ハイブリッド形成プローブ：

5'-GACGGAGTGTGTGGACCTGTGTACGAGCCTGATCAGTGTGTCC-3' (配列番号：284)

太字の下線で示したように、クローン DNA 68818（配列番号：280）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 581-583 に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置 1556-1558 の停止コドン (TAG) で終端する (Fig 119)。予測される PRO1434 ポリペプチド前駆体 (すなわち UNQ739、配列番号: 281) は 325 アミノ酸長である (Fig 120)。Fig 120 に示す UNQ739 タンパク質 (配列番号: 281) は約 35296 ダルトンの算定分子量と約 5.37 の pI を持つ。さらなる分析により、およそアミノ酸残基 1-27 にシグナル配列、およそアミノ酸残基 80-84 にグリコサミノグリカン付着部位、およそアミノ酸残基 10-16、102-108、103-109 に M-ミリスチル化部位、およそアミノ酸残基 114-117 に細胞付着配列、及びおよそアミノ酸残基 176-188 に EGF 様ドメインシステインパターンシグネチャーがあることが明らかになった。

DNA 68818-2536 と称される DNA 68818 を含むクローン (配列番号: 280) は 1999 年 2 月 9 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 203657 が付与されている。

10

#### 【0124】

BJ. ヒト PRO4333 (UNQ1888) をコードする cDNA クローンの単離  
 上述の ECD 相同性手順下で上述したものと類似した方法で、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、リンフォトキシナーベータレセプターと相同性を示す EST を同定した。

EST をオリゴヌクレオチドプライマー及びプローブを作成するためのテンプレートとして、ECD 相同性手順下で上述したものと類似した方法でヒト胎児腎臓ライブラリをスクリーニングした。

20

上述の手順で作成されたオリゴヌクレオチドは以下の通りである：

正方向 PCR プライマー： (配列番号：287)

5'-GCAAGAATTCAGGGATCGGTCTGG-3'

プローブ： (配列番号：288)

5'-CTGTGTTCCCTGCAACCACTGTGGCCAGGCATGGAGTTGTCTAAGG-3'

逆方向： (配列番号：289)

5'-AGATGGCATCACTGGTGGCTGAAC-3'

正方向： (配列番号：290)

5'-CAGAAGGCAAATTGTTTCAGCCACCAG-3'

逆方向： (配列番号：291)

5'-ACAGTTTCCAGACCGATCCCTGAATTC-3'

30

その結果、全長 DNA 配列 DNA 84210 (配列番号: 285、Fig 121) が単離された。太字の下線で示したように、Fig 121 に記載した DNA 84210 (配列番号: 285) クローンは、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 185-187 に見かけの翻訳開始部位、ヌクレオチド位置 1436-1438 に停止コドン (TAA) を有する。予測される PRO4333 ポリペプチド前駆体 (すなわち UNQ1888、配列番号: 286) は 417 アミノ酸長である。Fig 121 に示す UNQ1888 タンパク質 (配列番号: 286) は、約 45305 ダルトンの算定分子量と約 5.12 の算定 pI を持つ。

40

Fig 121 の UNQ1888 ポリペプチド (配列番号: 286) の分析により、およそアミノ酸残基 1-25 にシグナルペプチド、およそ残基 169-192 に膜貫通ドメイン、およそ残基 105-109、214-218、319-323、350-354、368-372、379-383 に N-グルコシル化部位、およそ残基 200-204 及び 238-242 に cAMP-及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位、およそ残基 207-214 にチロシンキナーゼリン酸化部位、およそ残基 55-61、215-218 及び 270-276 に N-ミリスチル化部位、およそ残基 259-270 に原核生物膜リポタンパク質脂質付着部位、及びおよそ残基 89-96 に TNFR/NGFR ファミリーシステインリッチ領域があることが明らかになった。

50

## 【0125】

BK. ヒトPRO4302 (UNQ1866) をコードするcDNAクローンの単離  
ヒト組織から単離した組織について上述のアミラーゼスクリーニング手順を使用してEST配列を得、ついでこれを種々のESTデータベースと比較し、アミラーゼスクリーニング手順及び／又はECD相同性手順下で、上述の方法によりコンセンサス配列を作成した。このコンセンサス配列のさらなる分析により、Incycyte EST番号2408081H1を単離した。EST番号2408081H1に対応する全長クローンを分析し、全長天然配列クローンDNA92218 (配列番号：292) 及び誘導PRO4302全長天然配列タンパク質UNQ1866 (配列番号：293) を単離した。

太字の下線で示したように、Fig123に示す全長クローンDNA92218 (配列番号：292) は、単一のオープンリーディングフレームを含み、およそヌクレオチド位置174-176に見かけの翻訳開始部位と、ヌクレオチド位置768-770に停止シグナル(TAG)を有する。予測されるPRO4302ポリペプチド前駆体(すなわちUNQ1866、配列番号：293)は198アミノ酸長であり、約22285ダルトンの算定分子量と約9.35のpIを持つ。UNQ1866 (Fig124、配列番号：293)の分析により、およそアミノ酸残基1からおよそ残基23にシグナルペプチド、およそアミノ酸残基111からおよそ残基130に膜貫通ドメイン、残基26-30にcAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位、残基44-47及び58-61にカゼインキナーゼIIリン酸化部位、残基36-43にチロシンキナーゼリン酸化部位、及び残基124-130、144-150及び189-195にN-ミリスチル化部位があることが明らかになった。

DNA92218-2554と称されるDNA92218を含むcDNAクローン (配列番号：292) は1999年3月9日にATCCに寄託され、寄託番号203834が付与されている。

BL. ヒトPRO4430 (UNQ1947) をコードするcDNAクローンの単離  
上述のシグナルアルゴリズム手順を使用し、ESTクラスター配列を同定し、次いで上述のシグナルアルゴリズム手順下で記載されたようにして広範な種々のESTデータベースと比較して、さらにコンセンサス配列を同定した。このコンセンサス配列を更に分析して、全長配列DNA96878 (Fig125、配列番号：294) 及び誘導PRO4430天然配列タンパク質UNQ1947 (Fig126、配列番号：295) を同定した。

太字の下線で示したように、Fig125に示す天然配列DNA配列DNA96878 (配列番号：294) 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56-58に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置431-433に見られる停止コドン(TGA)で終端する。予測されるPRO4430ポリペプチド前駆体(すなわちUNQ1947、Fig126、配列番号：295)は125アミノ酸長である。Fig126のUNQ4430タンパク質 (配列番号：295) は約13821ダルトンの算定分子量及び約8.6の算定pIを持つ。さらなる分析により、およそアミノ酸残基1からおよそ18にシグナル配列、およそ残基77-80、再度およそ残基88-91にN-グルコシル化部位、およそ残基67-70にカゼインキナーゼIIリン酸化部位、およそ残基84-89にN-ミリスチル化部位、及びおよそ残基85-98にLys-6/40

u-PARドメインの存在が明らかになった。  
DNA96878-2626と称され、DNA96878を含むクローン (配列番号：294) は1999年3月4日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号23-PTAが付与されている。

## 【0126】

BM. ヒトPRO5727 (UNQ2448) をコードするcDNAクローンの単離  
種々の周知のTNF-レセプターを使用し、公的及び私的なESTデータベース (例えば、上述のESD相同性手順を参照) をスクリーニングし、Incycyteクローン5091511Hを単離した。ついで、子宮腫瘍組織から得られたこのEST配列を以下に示すクローニングオリゴの作成のためのテンプレートとし、次いでこれを用いて関心ある配列を



含むヒト胸腺DNAライブラリをPCRにより同定した。これらのオリゴヌクレオチドは以下の通りである：

正方向プライマー(509-1)：

5'-GAGGGGCTGGGTGAGATGTG-3' (配列番号：298)

逆方向プライマー(509-4AS)：

5'-TGCTTTTGTACCTGCGAGGAGG-3' (配列番号：299)

全長DNA98853ポリペプチドをコードするDNA配列を単離するために、インバースロング(inverse long distance)PCR法を実施した(Fig 129)。PCRプライマーは一般に20から30ヌクレオチドの範囲であった。インバースロングPCRのために、プライマー対を、各プライマーの5'から3'方向が互いに離間する方向に向くように設計した。

DNA98853のクローニングのための一对のインバースロングPCRプライマーを合成した：

プライマー1(左プライマー)(509-P5)

5'-CATGGTGGGAAGGCCGTAACG-3' (配列番号：300)

プライマー2(右プライマー)(509-P6)

5'-GATTGCCAAGAAAATGAGTACTGGGACC-3' (配列番号：301)

インバースロングPCR反応では、テンプレートはプラスミドcDNAライブラリである。その結果、PCR生成物は、中間部に、両端に関心ある挿入配列を有する全ベクター配列を含む。PCR反応後、PCR混合物をテンプレートプラスミドのみを消化するDpn Iで処理し、続いてライブラリクローニングベクターのサイズより大きなPCR生成物をアガロースゲル精製した。インバースロングPCRで使用したプライマーはまた5'-リン酸化されているので、精製した生成物を次いでセルフライゲーションし、大腸菌コンピテント細胞中で形質転換させた。5'ベクタープライマー及び適切な遺伝子特異的プライマーを使用するPCRによりコロニーをスクリーニングし、より大きな5'配列を有するクローンを同定した。ポジティブクローンから調製されたプラスミドを配列決定した。必要に応じて、プロセスを繰り返し、先のラウンドで得られた新規な配列に基づき、より多くの5'配列を得ることもできる。

インバースロングPCRの目的は関心ある遺伝子の完全な配列を得ることである。ついで、全長コード化領域を含むクローンを一般的なPCRにより得た。

DNA98853(配列番号：296)の全長コード化領域をクローニングするために使用されるプライマー対は以下の通りである：

正方向プライマー(Cla-MD-509)

5'-GGAGGATCGATACCATGGATTGCCAAGAAAATGAG-3' (配列番号：302)

逆方向プライマー(509.TAA.not)

5'-GGAGGAGCGGCCGCTTAAGGGCTGGGAACCTCAAGGGGCAC-3' (配列番号：303)

クローニングに対して、Cla I部位とNot I部位はそれぞれ正方向プライマー及び逆方向プライマーに含まれていた。

PCR生成物の精度を確保するために、非依存性PCR反応を実施し、いくつかのクローン化産物を配列決定した。

上述のようにして単離されたクローンを配列決定したDNAにより、DNA98853(配列番号：296、Fig 127)の全長DNA配列と誘導PRO5727天然配列タンパク質UNQ2448(配列番号：297、Fig 128)が得られた。

太字の下線で示したように、クローンDNA98853(配列番号：296)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に見かけの翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド位置901-903の停止コドン(TAA)で終端する(Fig 128)。予測されるPRO5727ポリペプチド前駆体(すなわちUNQ2448、配列番号：297)は299アミノ酸長であり(Fig 128)、32929ダルトンの算定分子量及び4.95のpIを持つ。Fig 128に示すUNQ2448ポリペプチド(配列番号：297)は、約3.3キロダルトンの算定分子量及び約4.72のpIを持つ。

潜在的N-グルコシル化部位は、F i g 1 2 8に示すアミノ酸配列のアミノ酸74と77の間に存在する。潜在的N-ミリストイル化部位は、F i g 1 2 8に示すアミノ酸配列のアミノ酸24と29の間に存在する。潜在のカゼインキナーゼI Iリン酸化部位は、F i g 1 2 8に示すアミノ酸配列のアミノ酸123-126、185-188、200-203、252-255、257-260、271-274及び283-286に存在する。潜在的膜貫通ドメインはF i g 1 2 8に示す配列のアミノ酸137と158の間に存在する。現在、上記ポリペプチドはシグナル配列を含んでいないと考えられている。DNA98853-1739と称され、DNA98853を含むcDNAクローン（配列番号：296）は1999年4月6日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号1999年4月6日が付与されている。

10

#### 【0127】

##### 実施例2

混合リンパ球反応（MLR）アッセイにおける刺激活性（番号24）

この実施例は、本発明のポリペプチドが刺激されたTリンパ球の増殖の刺激剤として活性であることを示す。リンパ球の増殖を刺激する化合物は、免疫反応の増強が望まれる場合に治療的に有用である。治療薬は本発明のポリペプチドのアンタゴニスト、例えばポリペプチドに対するマウス-ヒトキメラ、ヒト化又はヒト抗体の形態を取ってもよい。

このアッセイの基本的プロトコルは、Current Protocols in Immunology, unit 3.12; J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober編, 国立衛生研究所, John Wiley & Sons, Incから出版のものに記載されている。

20

より詳細には、このアッセイの一変形例では、末梢血液単核細胞（PBMC）を哺乳動物個体、例えばヒトのボランティアからロイコフェレーシスにより単離する（一人のドナーには刺激物PBMCを供給し、他のドナーにはレスポンダーPBMCを供給する）。望まれるならば、単離後に、細胞をウシ胎児血清及びDMSO中で凍結する。凍結細胞をアッセイ用培地（37℃、5%CO<sub>2</sub>）で一晩解凍し、ついで洗浄し、3x10<sup>6</sup>細胞/mlのアッセイ用培地（RPMI；10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン／ストレプトマイシン、1%グルタミン、1%HEPES、1%非必須アミノ酸、1%ピルバート）に再懸濁させる。

30

刺激剤PBMCは細胞を光にさらす（約3000ラド）ことにより調製される。該アッセイは、100μlの1%又は0.1%に希釈された試験試料、50μlの光にさらされた刺激剤細胞、及び50μlのレスポンダーPBMC細胞の混合物を三重ウェルに蒔くことにより調製される。100マイクロタイターの細胞培養培地又は100マイクロリッターのCD4-IgGを対照として使用する。ついで、ウェルを37℃、5%CO<sub>2</sub>で4日間インキュベートする。5日目に、各ウェルにトリチウム化チミジン（1.0mCi／ウェル；Amersham）をパルス適用する。6時間後、細胞を3回洗浄し、次いで標識の取込を評価する。

このアッセイの他の変形例では、PBMCをBalb／cマウス及びC57B6マウスの脾臓から単離する。細胞を、アッセイ用培地（RPMI；10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン／ストレプトマイシン、1%グルタミン、1%HEPES、1%非必須アミノ酸、1%ピルバート）において新鮮に収集された脾臓から顕微鏡検査用に引き出し、リンホライト（Lympholyte）M（Organon Teknika）上にこれらの細胞をオーバーレイすることによりPMBCを単離し、2000rpmで20分間遠心分離し、集め、アッセイ用培地中で単核細胞層を洗浄し、アッセイ用培地に1x10<sup>7</sup>細胞/mlになるように細胞を再懸濁させる。ついで、アッセイが上記のようにして行われる。本発明の化合物におけるこのアッセイの結果を次の表に示す。対照に対して正に増加しているとポジティブであると考えられ、180%以上の増加が好ましい。しかしながら、対照より多い値は全て、試験用タンパク質についての刺激効果を示す。

40

#### 【0128】

50

| PRO     | 表7        |               |
|---------|-----------|---------------|
|         | PRO濃度     | 対照に対する増加パーセント |
| PRO356  | 0.1%      | 133.8         |
| PRO356  | 0.1%      | 208.9         |
| PRO356  | 1.0%      | 251.6         |
| PRO356  | 1.0%      | 332.1         |
| PRO273  | 12.4 nM   | 112           |
| PRO273  | 124 nM    | 192.7         |
| PRO769  | 23.86 nM  | 76.3          |
| PRO769  | 238.6 nM  | 226           |
| PRO1184 | 16.88 nM  | 81.6          |
| PRO1184 | 168.82 nM | 194.4         |
| PRO1346 | 3.34 nM   | 86.6          |
| PRO1346 | 33.41 nM  | 188.5         |
| PRO1246 | 0.07 nM   | 145           |
| PRO1246 | 0.7 nM    | 180.9         |
| PRO269  | 0.1%      | 122.4         |
| PRO269  | 1%        | 194.1         |
| PRO344  | 0.1%      | 148.6         |
| PRO344  | 1%        | 259.9         |
| PRO333  | 0.1%      | 187.8         |
| PRO333  | 1%        | 220           |
| PRO381  | 14.5 nM   | 87.3          |
| PRO381  | 14.5 nM   | 135.4         |
| PRO381  | 145 nM    | 248.1         |
| PRO381  | 145 nM    | 290.8         |
| PRO533  | 0.06 nM   | 163           |
| PRO533  | 0.61 nM   | 382.9         |
| PRO720  | 0.1 nM    | 198.4         |
| PRO720  | 1.0 nM    | 293.5         |
| PRO866  | 0.1 nM    | 131.8         |
| PRO866  | 1.04 nM   | 223.2         |

10

20

30

50

## 【0129】

## 実施例 3

無毛モルモットの炎症誘発アッセイ（番号32）

このアッセイはPROポリペプチドが血管透過性を誘導する能力を示すかどうかを決定するためのものである。このアッセイにおいてポジティブであると試験されたポリペプチドは、例えば局所的免疫システム細胞湿潤を増強することで恩恵を受け得る病状を含む血管透過性を増強することで恩恵を受ける病状の治療に有用であることが期待される。

350 g又はそれ以上の無毛モルモットにケタミン（75－80 mg/kg）と5 mg/kgのキシラジンを筋肉内投与して麻酔をかけた。PROポリペプチド又は試験ポリペプチドを含まない生理緩衝液を含む試験試料を、注射部位当たり100 µlで試験動物の背の皮膚に皮内注射した。動物当たりおよそ16－24の注射部位があった。ついで1 mlのエバンスブルー染料（PBS中1%）を心臓内注射した。化合物に対する皮膚血管透過性応答（すなわち、注射部位の斑点）について、試験動物の投与1、6及び/又は24時間後に注射部位からの青色の漏出の直径（mm）を測定することで視覚によりスコアをつけた。注射部位の青さのmm直径を観察して、記録し、同一の動物対照に対して4標準偏

差を超えるスコアを持つ値に対して血管漏出の重症度を記録した。少なくとも5 mmの直径の斑点は、精製タンパク質を試験する場合はアッセイでは正であると考えられ、血管漏出又は浸透性を誘発する能力を示している。7 mm直径を超える応答があると、条件培地試料に対してポジティブであると考えられる。ヒト V E G F が正の対照として使用され、 $0.1 \mu\text{g} / 100 \mu\text{l}$  で4-8 mmの直径、 $1 \mu\text{g} / 100 \mu\text{l}$  で15-23 mm直径の応答を誘発した。

試験したポリペプチドを初期ストック溶液の1%まで希釈する。U N Q 5 8 5 は10 mMの H E P E S / 140 mMの N a C l / 4%のマンニトール /  $1 \text{ mg} / \text{ml}$  の B S A、p H 6.8で希釈し、U N Q 3 3 4 は140 mMの N a C l、10 mMの H e p e s、4%のマンニトール、p H 7.4に希釈した。

10

表8

| ポリペプチド  | 原液濃度      | 時間 (hr) | 直径 (mm) |
|---------|-----------|---------|---------|
| PRO1155 | 20,384 nM | 1       | 6       |
| PRO1155 | 20,384 nM | 6       | 6       |
| PRO533  | 1024 nM   | 1       | 5.4     |
| PRO533  | 1024 nM   | 6       | 7       |
| PRO21   | 22,000 nM | 1       | 2.0     |
| PRO21   | 22,000 nM | 6       | 14.0    |

## 【0130】

20

## 実施例 4

## 皮膚血管透過性アッセイ (番号64)

このアッセイはある P R O ポリペプチドが動物の注入部位において単核細胞、好酸球及び P M N 浸潤を誘発することにより免疫反応を刺激し炎症反応を誘発することを示す。この皮膚血管透過性アッセイは次のようにして実施される。体重が350グラム又はそれ以上の無毛モルモットにケタミン ( $75-80 \text{ mg} / \text{Kg}$ ) 及び  $5 \text{ mg} / \text{kg}$  の5キシラジンを筋肉注射 (I M) して麻酔をかけた。精製された P R O ポリペプチド又は条件培地試験試料を、注射部位あたり  $100 \mu\text{L}$  で試験動物の背中に皮内注射した。動物当たり約10-30、好ましくは約16-24の注射部位があった。1 mLのエバンスブルー色素 (生理的緩衝食塩水中に1%) を心臓内注射した。ついで注射部位における斑点を注入後1時間、6時間及び24時間に測定 (直径mm) した。動物は注入後6時間で屠殺した。それぞれの皮膚注射部位を生体組織検査し、パラホルムアルデヒドで固定した。ついで皮膚を組織病理学検査のために調製した。それぞれの部位について、皮膚中への炎症細胞浸潤を評価した。可視可能な炎症細胞の炎症を持つ部位をポジティブスコアとする。炎症細胞は好中球、好酸球、単球、リンパ球であり得る。

30

少なくとも注射部位の最小血管周囲の浸潤をポジティブスコアとし、注射部位で浸潤のなかった場合をネガティブスコアとする。

表9

| UNQ     | 時間(時間) | 湿潤    |
|---------|--------|-------|
| PRO172  | 24     | ポジティブ |
| PRO200  | 24     | ポジティブ |
| PRO200  | 24     | ポジティブ |
| PRO216  | 24     | ポジティブ |
| PRO272  | 24     | ポジティブ |
| PRO362  | 24     | ポジティブ |
| PRO1007 | 24     | ポジティブ |
| PRO1031 | 24     | ポジティブ |
| PRO1283 | 24     | ポジティブ |
| PRO1343 | 24     | ポジティブ |
| PRO1358 | 6      | ポジティブ |
| PRO1325 | 6      | ポジティブ |
| PRO1434 | 24     | ポジティブ |
| PRO4333 | 6      | ポジティブ |

10

## 【0131】

## 実施例5

混合リンパ球反応 (MLR) アッセイにおける阻害活性 (番号67)

この実施例は、一又は複数のPROポリペプチドが刺激されたTリンパ球の増殖阻害剤として活性であることを示す。リンパ球の増殖を阻害する化合物は、免疫反応の抑制が好ましい場合に治療的に有用である。

20

このアッセイの基本的プロトコルは、Current Protocols in Immunology, unit 3.12; J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober 編, 国立衛生研究所, John Wiley & Sons, Incから出版のものに記載されている。

より詳細には、このアッセイの一変形例では、末梢血液単核細胞 (PBMC) を哺乳動物個体、例えばヒトのボランティアからロイコフェレーシスにより単離する (一人のドナーには刺激剤PBMCを供給し、他のドナーにはレスポンダーPBMCを供給する)。望まれるならば、単離後に、細胞をウシ胎児血清及びDMSO中で凍結する。凍結細胞をアッセイ用培地 (37°C、5%CO<sub>2</sub>) で一晚解凍し、ついで洗浄し、3 x 10<sup>6</sup> 細胞/ml のアッセイ用培地 (RPMI; 10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1%グルタミン、1%HEPES、1%非必須アミノ酸、1%ピルバート) に再懸濁させる。刺激剤PBMCは細胞を光にさらす (約3000ラド) ことにより調製される。

30

このアッセイは、

100:1の1%又は0.1%に希釈された試験試料、

50:1の光にさらされた刺激物細胞、及び

50:1のレスポンダーPBMC細胞、

の混合物を三重ウェルに蒔くことにより調製される。100マイクロリッターの細胞培養培地又は100マイクロリッターのCD4-IgGを対照として使用する。ついで、ウェルを37°C、5%CO<sub>2</sub>で4日間インキュベートする。5日目に、各ウェルにトリチウム化チミジン (1.0mCi/ウェル; Amersham) をパルス適用する。6時間後、細胞を3回洗浄し、ついで標識の取込を評価する。

40

このアッセイの他の変形例では、PBMCをBalb/cマウス及びC57B6マウスの脾臓から単離する。細胞を、アッセイ用培地 (RPMI; 10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1%グルタミン、1%HEPES、1%非必須アミノ酸、1%ピルバート) において新鮮に収集した脾臓から顕微鏡検査用に引き出し、リンホライトM (Organon Teknika) 上にこれらの細胞をオーバーレイすることによりPBMCを単離し、2000rpmで20分間遠心分離し、集め、アッセイ用培地にお

50

ける単核細胞層を洗浄し、アッセイ用培地に  $1 \times 10^7$  細胞 / ml になるように細胞を再懸濁させる。ついで、アッセイは上記のようにして行われる。

対照以下に減少していると阻害化合物としてポジティブであると考えられ、80%以下の減少が好ましい。しかしながら、対照より少ない値は全て、試験用タンパク質の阻害効果を示す。

【0132】

表10

| <u>PRO</u> | <u>PRO濃度</u> | <u>対照に対する減少パーセント</u> |
|------------|--------------|----------------------|
| PRO204     | 0.1%         | 86                   |
| PRO204     | 1.0%         | 35                   |
| PRO212     | 0.59 nM      | 0                    |
| PRO212     | 5.9 nM       | 52.6                 |
| PRO212     | 0.87 nM      | 82.7                 |
| PRO212     | 8.7 nM       | 66                   |
| PRO212     | 1.9 nM       | 81.6                 |
| PRO212     | 19 nM        | 61.5                 |
| PRO212     | 0.46 nM      | 66.1                 |
| PRO212     | 4.6 nM       | 59.5                 |
| PRO212     | 2.1 nM       | 0                    |

10

20

|        |           |       |    |
|--------|-----------|-------|----|
| PRO212 | 2.1 nM    | 116.2 |    |
| PRO212 | 21 nM     | 0     |    |
| PRO212 | 21 nM     | 62.2  |    |
| PRO216 | 0.13 nM   | 74.3  |    |
| PRO216 | 1.3 nM    | 63.3  |    |
| PRO226 | 0.12 nM   | 67.9  |    |
| PRO226 | 1.2 nM    | 40.6  |    |
| PRO235 | 0 nM      | 83.6  |    |
| PRO235 | 0.02 nM   | 69.7  | 10 |
| PRO240 | 5.3 nM    | 68.2  |    |
| PRO240 | 53 nM     | 68.2  |    |
| PRO240 | 35 nM     | 72.2  |    |
| PRO240 | 350 nM    | 64    |    |
| PRO245 | 19.1 nM   | 53    |    |
| PRO245 | 191 nM    | 54    |    |
| PRO245 | 0.93 nM   | 71.8  |    |
| PRO245 | 0.93 nM   | 80.9  |    |
| PRO245 | 9.3 nM    | 49.6  |    |
| PRO245 | 9.3 nM    | 51.9  | 20 |
| PRO273 | 31.46 nM  | 81    |    |
| PRO273 | 314.56 nM | 67    |    |
| PRO332 | 0.35 nM   | 74.2  |    |
| PRO332 | 3.5 nM    | 68    |    |
| PRO332 | 0.35 nM   | 20.2  |    |
| PRO332 | 3.5 nM    | 61.2  |    |
| PRO361 | 1.5 nM    | 63.2  |    |
| PRO361 | 15 nM     | 64.7  |    |
| PRO363 | 8.6 nM    | 76.9  |    |
| PRO363 | 86 nM     | 63.6  | 30 |
| PRO363 | 8.6 nM    | 64.4  |    |
| PRO363 | 86 nM     | 2.1   |    |
| PRO364 | 0.31 nM   | 68.1  |    |
| PRO364 | 3.1 nM    | 67.4  |    |
| PRO364 | 1.7 nM    | 92.8  |    |
| PRO364 | 17 nM     | 68.4  |    |
| PRO364 | 1.7 nM    | 94.2  |    |
| PRO364 | 17 nM     | 63.3  |    |
| PRO526 | 0.12 nM   | 68.5  | 40 |
| PRO526 | 1.2 nM    | 62.5  |    |
| PRO531 | 0.2 nM    | 66.1  |    |

|         |          |      |    |
|---------|----------|------|----|
| PRO531  | 2 nM     | 54.3 |    |
| PRO531  | 0.2 nM   | 70.4 |    |
| PRO531  | 2 nM     | 68.4 |    |
| PRO701  | 0.74 nM  | 72.5 |    |
| PRO701  | 0.74 nM  | 90.2 |    |
| PRO701  | 7.4 nM   | 64.8 |    |
| PRO701  | 7.4 nM   | 69   |    |
| PRO770  | 0.69 nM  | 65.8 |    |
| PRO770  | 6.9 nM   | 67.4 | 10 |
| PRO788  | 12.96 nM | 88.4 |    |
| PRO788  | 129.6 nM | 57.7 |    |
| PRO788  | 2.9 nM   | 64.4 |    |
| PRO788  | 29 nM    | 67.4 |    |
| PRO865  | 0.27 nM  | 67.9 |    |
| PRO865  | 2.7 nM   | 63.7 |    |
| PRO1083 | 7.1 nM   | 80.5 |    |
| PRO1083 | 71 nM    | 63.7 |    |
| PRO1083 | 7.1 nM   | 40.9 |    |
| PRO1083 | 71 nM    | 65   | 20 |
| PRO1114 | 0.37 nM  | 44.9 |    |
| PRO1114 | 3.7 nM   | 42.4 |    |
| PRO1192 | 12.1 nM  | 31.6 |    |
| PRO1192 | 121 nM   | 32.6 |    |
| PRO1195 | 0.5 nM   | 67   |    |
| PRO1195 | 5 nM     | 66.8 |    |
| PRO1250 | 0.05 nM  | 75.4 |    |
| PRO1250 | 0.5 nM   | 57.2 |    |
| PRO1250 | 0.05 nM  | 94.6 |    |
| PRO1250 | 0.5 nM   | 61.2 | 30 |
| PRO1312 | 8.5 nM   | 52   |    |
| PRO1312 | 85 nM    | 49.3 |    |
| PRO1312 | 14.2 nM  | 73.1 |    |
| PRO1312 | 142 nM   | 62.9 |    |
| PRO1287 | 0.8 nM   | 79.1 |    |
| PRO1387 | 8 nM     | 52.3 |    |
| PRO1410 | 4 nM     | 89   |    |
| PRO1410 | 40 nM    | 64.8 |    |
| PRO1418 | 6.4 nM   | 67.7 |    |
| PRO1418 | 6.4 nM   | 81.1 | 40 |
| PRO1418 | 64 nM    | 56.3 |    |



|         |           |       |
|---------|-----------|-------|
| PRO1418 | 64 nM     | 64.9  |
| PRO1868 | 39.4 nM   | 65.8  |
| PRO1868 | 394 nM    | 50    |
| PRO1917 | 2.1 nM    | 70.7  |
| PRO1917 | 2.1 nM    | 82.5  |
| PRO1917 | 21 nM     | 60.7  |
| PRO1917 | 21 nM     | 62.6  |
| PRO205  | 0.7 nM    | 71.5  |
| PRO205  | 7 nM      | 3.5   |
| PRO840  | 24.4 nM   | 137.2 |
| PRO982  | 244 nM    | 58.9  |
| PRO836  | 2.5 nM    | 60.7  |
| PRO836  | 25 nM     | 60.6  |
| PRO1159 | 11.06 nM  | 80.4  |
| PRO1159 | 110.55 nM | 57.6  |
| PRO1159 | 11.06 nM  | 81.9  |
| PRO1159 | 110.55 nM | 46.2  |
| PRO1338 | 0.14 nM   | 80.7  |
| PRO1338 | 1.4 nM    | 65.5  |
| PRO4302 | 13.56 nM  | 115.8 |
| PRO4302 | 135.57 nM | 2.4   |
| PRO4430 | 24.2 nM   | 55.9  |
| PRO4430 | 242 nM    | 49.9  |
| PRO5727 | 19.6 nM   | 69.2  |
| PRO5727 | 196 nM    | 54.5  |

10

20

## 【0133】

## 実施例 6

## インサイツハイブリッド形成

30

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位置測定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位置測定、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の補助に有用である。

インサイツハイブリッド形成は、Lu 及び G i l l e t t, C e l l V i s i o n 1 : 1 6 9 - 1 7 6 ( 1 9 9 4 ) のプロトコルの最適化バージョンに従って、PCR 生成 <sup>33</sup>P-標識リボプローブを用いて実施される。簡単には、ホルマリン固定、パラフィン包埋ヒト組織を切片化し、脱パラフィンし、プロテイナーゼ K ( 2 0 g / m l ) で 1 5 分間 3 7 °C で脱タンパクし、さらに上掲の Lu 及び G i l l e t t に記載されたようにしてインサイツハイブリッド形成のために加工した。[ <sup>33</sup>-P ] U T P -標識アンチセンスリボプローブを PCR 産物から生成し、5 5 °C で終夜ハイブリッド形成する。スライドを K o d a k N T B 2 核トラックエマルジョンに浸漬して 4 週間露出する。

40

<sup>33</sup>P-リボプローブ合成

6. 0 μ l ( 1 2 5 m C i ) の <sup>33</sup>P-UTP ( A m e r s h a m B F 1 0 0 2 , S A < 2 0 0 0 C i / m m o l ) をスピード真空乾燥させた。乾燥 <sup>33</sup>P-UTP を含む各管に以下の成分を添加した：2. 0 μ l の 5 x 転写バッファー；1. 0 μ l の D T T ( 1 0 0 m M ) ；2. 0 μ l の N T P 混合物 ( 2. 5 m M : 各 1 0 μ l の 1 0 m M G T P , C T P 及び A T P + 1 0 μ l の H <sub>2</sub> O ) ；1. 0 μ l の U T P ( 5 0 μ M ) ；1. 0 μ l の R n a s i n ；1. 0 μ l の D N A テンプレート ( 1 μ g ) ；1. 0 μ l の H <sub>2</sub> O 。

50

管を37℃で1時間インキュベートした。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。90 μLのTE (10 mM トリス pH 7.6 / 1 mM のEDTA pH 8.0) を添加し、混合物をDE81ペーパー上にピペットした。残りの溶液をMicrocon-50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、100 μLのTEを添加した。1 μLの最終生成物をDE81紙にピペットし6 mlのBIOFLUOR II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 Mrk IIIを3 μLの負荷バッファに添加した。95℃の加熱ブロック上で3分間加熱した後、ゲルを即座に氷上に置いた。ゲルのウェルをフラッシングし、試料を負荷し、180-250ボルトで45分間走らせた。ゲルをサララップでラップし、-70℃の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。

10

### 【0134】

#### <sup>33</sup>P-ハイブリッド形成

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4%パラホルムアルデヒド中で10分間固定し、0.5 x SSCで5分間室温で洗浄した(25 ml 20 x SSC + 975 ml SQ H<sub>2</sub>O)。0.5 μg/mlのプロテイナーゼK中、37℃で10分間の脱タンパクの後(250 mlの予備加熱RNase無しRNaseバッファ中の10 mg/mlストック12.5 μL)、切片を0.5 x SSCで10分間室温で洗浄した。切片を、70%、95%、100%エタノール中、各2分間脱水した。

20

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

プレハイブリッド化 スライドをBoxバッファ(4 x SSC、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(3.75 gデキストラン硫酸+6 ml SQ H<sub>2</sub>O)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、18.75 mlのホルムアミド、3.75 mlの20 x SSC及び9 mlのSQ H<sub>2</sub>O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。

30

ハイブリッド形成 スライド当たり1.0 x 10<sup>6</sup> c.p.のプローブ及び1.0 μLのRNA (50 mg/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 μLのハイブリッド形成バッファを添加した。ボルテックスの後、50 μLの<sup>33</sup>P混合物をスライド上のプレハイブリッド50 μLに添加した。スライドを55℃で終夜インキュベートした。

洗浄 洗浄は、2 x SSC、EDTAで2 x 10分間、室温で実施し(400 mlの20 x SSC + 16 mlの0.25 M EDTA、V<sub>f</sub> = 4 L)、次いでRNase A処理を37℃で30分間行った(250 ml RNaseバッファ中10 mg/mlを500 μL - 20 μg/ml)。スライドを2 x 10分間、2 x SSC、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 x SSC、EDTA (20 mlの20 x SSC + 16 mlのEDTA、V<sub>f</sub> = 4 L)。

40

種々のヒト組織からのポリA<sup>+</sup> RNA (レーン当たり2 μg)を含有するマルチ組織プロットをClontechから購入した(Palo Alto, CA)。DNAプローブをランダムプライムDNAラベルビーズ(Pharmacia Biotech)により[α-<sup>32</sup>P]-dCTPでラベルした。ハイブリッド形成はExpresshyb (Clontech)を使用し、68℃で1時間行った。ついで、プロットを2 x SSC / 0.

50

0.5% SDS 溶液を用い、室温で40分間洗浄し、次に新鮮な溶液に変えて、0.1% SDS / 0.1% SDS 溶液を用い、55℃で40分間洗浄した。プロットをホスホイメージャー (phosphor imager) にさらした。

# 【0135】

DNA 29101 (VEGFB9)

DNA 29101 (配列番号: 1) を3種の別個のインサート実験で検査した。そ

こでは、次のプローブを使用した:

VEGFB9-p1 (配列番号: 194)

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCGGGAATCCAACCTGAGTAG-3'

VEGFB9-p2 (配列番号: 195)

5'-CTATGAAATTAACCCCTACTAAAGGAGCGGCTATCCTCCTGTGCTC-3'

IS97-029:

軟骨原基の縁 (例えば外縁周辺) における発育中の下肢骨、発育中の腱、血管平滑筋及び細胞包含発育中の骨格筋細胞及び筋管における発現。発現は、次の組織でも観察された: 骨端の成長板: リンパ節一周縁洞: 胸腺-胸腺皮質の被膜下領域、おそらく、被膜下上皮細胞又はこの領域で見られる増殖中の二重ネガティブ胸腺のいずれか; 気管平滑筋; 脳 (小脳皮質) - 皮質ニューロンにおける病巣発現: 小腸-平滑筋: 甲状腺-甲状腺上皮; 肝臓-管板; 胃-壁平滑筋; 胎児の皮膚-鱗状上皮の基底層; 胎盤-栄養膜絨毛の間細胞; 脊髄-動脈及び静脈の壁を除いて発現なし。脾臓と副腎では発現なし。

上述の発現パターンは、DNA 29101 が細胞分化/増殖に関与していることを示唆している。 20

IS97-037

過剰排卵したラット卵巢での発現は、アンチセンス及びセンスプローブの双方において全ての切片でネガティブであった。何れのメッセージもこのモデルでは発現されず、あるいはヒトプローブはラットと交差反応しなかった。

# 【0136】

IS97-087

高発現レベルは以下の部位で観察された: チンパンジー卵巢-成熟小胞の顆粒膜細胞、低強度シグナルが包膜細胞で観察; チンパンジー上皮小体-主細胞全体で高発現; ヒト胎児精巣-発育中の細管を囲む間質細胞全体に中程度の発現; ヒト胎児肺-発育中の気管支の軟骨細胞で高発現、及び分岐している気管支上皮において低レベル発現。 30

検査した胎児組織 (E12-E16週) は: 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、及び下肢を含む。検査した成人組織は: 肝臓、腎臓、副腎、心筋層、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺、皮膚、大脳皮質 (rm)、海馬 (rm)、小脳 (rm)、陰茎、眼、膀胱、胃、胃腸肉腫、大腸、大腸癌腫及び骨盤癌腫を含む。また検査したものはアセトアミノフェン誘発肝臓障害及び肝硬変であった。

DNA 30871:

IS97-044: 胎児組織において、胎児の大脳皮質、脊髄、脊髄神経節のニューロン、並びに胎児胃壁の腸ニューロンに強いシグナルが観察された。さらに、大動脈の根本周囲の細胞 (おそらくは刺激伝導系)、副腎髄質、神経血管束の間質細胞、腎臓実質及び骨格筋細胞間に位置する細胞においてもシグナルが観察された。全ての他の胎児組織はネガティブであった。 40

成人組織では何の発現も観察されなかった。検査した胎児組織 (12-16週) は: 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、及び下肢を含む。検査した成人組織は: 肝臓、腎臓、副腎、心筋層、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺及び皮膚を含む。

上述の分析で使用したプローブは以下の通りである。

DNA 30871-p1 (配列番号: 196)

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCTCCCGTCTCCTCTGCTCCTC-3'

DNA 30871-p2 (配列番号: 197)

5'-CTATGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGACCTCGGCATCTTCGTCACATT-3'

DNA 30942:

DNA 30942 (配列番号: 13) を4つに分かれたインサイツ研究において検査し (実施例7の発病した組織研究における2つを含む)、次のプローブを使用した:

DNA 30942-p1 (配列番号: 198)

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCTCGCTGCTGTGCCTGGTGTG-3'

DNA 30942-p2 (配列番号: 199)

5'-CTATGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGACCGCTGCAGCCTCTTGATGGA-3'

【0137】

IS97-043:

胎児組織では何の発現も観察されなかった。検査した胎児組織は: 胎盤、臍帯、脳、脊髄、視神経、気管、肺、心臓、胸腺、肝臓、脾臓、食道、小腸、膵臓、副腎、甲状腺、体壁及び下肢を含む。

成人組織では何の発現も観察されなかった。検査した成人組織は: 肝臓、腎臓、副腎、心筋層、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺及び皮膚を含む。

DNA 33087 (IS97-051):

胎児組織において、DNA 33087 (配列番号: 18) の発現は、内軟骨及び骨膜性骨形成の全ての部位で骨芽細胞において、また発育中の肺動脈及び大動脈幹で観察された。検査した胎児組織は: 胎盤、臍帯、脳、脊髄、眼、視神経、気管、肺、心臓、胸腺、肝臓、脾臓、食道、小腸、膵臓、副腎、甲状腺、体壁及び下肢を含む。

検査した成人組織では何の発現も観察されず、以下を含む: 肝臓、腎臓、副腎、心筋層、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺及び皮膚。

可能な役割は、骨マトリクス沈積及び/又は骨芽細胞成長の制御である。

多ブロックにおける全ての成人組織はβ-アクチンに対してポジティブであった。

この手順で使用したプローブは以下の通りである:

DNA 33087-p1 (配列番号: 200):

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCCGAGTGTTCCTCAAGA-3'

DNA 33087-p2 (配列番号: 201):

5'-CTATGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGACAAGTTTACTAGCCCATCCAT-3'

DNA 33087-p3 (配列番号: 202):

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCTGGATGGGCTAGTAAACTTGA-3'

DNA 33087-p4 (配列番号: 203):

5'-CTATGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGACCTTCTGCTCCTTCTTGT-3'

【0138】

DNA 34387 (IS97-109):

DNA 34387 (配列番号: 25) の発現パターンは胎児及び成人ヒトの以下の部位で観察された:

胎児-甲状腺上皮、小腸上皮、生殖腺、膵臓上皮、肝臓の肝細胞及び腎尿細管。また発育中の長骨の血管組織でも見られた。

成人-胎盤細胞栄養芽層、腎尿細管上皮、膀胱上皮、副甲状腺及び上皮腫瘍に中程度のシグナル。

検査した胎児組織 (E12-E16週) は: 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、及び下肢を含む。

検査した成人組織は: 腎臓 (正常及び末期)、副腎、心筋層、大動脈、脾臓、リンパ節、胆嚢、膵臓、肺、皮膚、眼 (網膜を含む)、前立腺、膀胱、肝臓 (正常、肝硬変、急性機能不全) を含む。

10

20

30

40

50

検査した非ヒト霊長類組織は以下のものを含む：

チンパンジー組織：唾液腺、胃、甲状腺、副甲状腺、皮膚、胸腺、卵巣、リンパ節。

アカゲザル組織：大脳皮質、海馬、小脳、陰茎。

この手順で使用したプローブは以下の通りである。

DNA 3 4 3 8 7-p 1 (配列番号：206)

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCGAGATATGCACCCAATGTC-3'

DNA 3 4 3 8 7-p 2 (配列番号：207)

5'-CTATGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGATCCAGAATCCGAAGAACA-3'

【0139】

DNA 3 5 6 3 8：

IS 9 7-0 7 8：

DNA 3 5 6 3 8 (配列番号：35) の発現は胎児及び胎盤血管のサブセットの内側の内皮に観察された。内皮発現はこれらの組織ブロックに限られていた。発現はまた胎盤の中間栄養芽細胞にわたって観察された。

検査した胎児組織 (E 1 2-E 1 6 週) は：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、骨盤及び下肢を含む。

検査した成人組織は：肝臓、腎臓、副腎、心筋層、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺、皮膚、大脳皮質 (rm)、海馬 (rm)、小脳 (rm)、陰茎、眼、膀胱、胃、胃癌、大腸、大腸癌腫、甲状腺 (チンパンジー)、副甲状腺 (チンパンジー)、卵巣 (チンパンジー) 及び軟骨肉腫。アセトアミノフェン誘導肝臓傷害及び肝硬変から得られた組織も検査した。

上述の手順で使用したオリゴは以下の通りである。

DNA 3 5 6 3 8-p 1 (配列番号：208)

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCGGGAAGATGGCGAGGAGAG-3'

DNA 3 5 6 3 8-p 2 (配列番号：209)

5'-CTATGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGACCAAGGCCACAAACGAAATC-3'

DNA 3 9 5 2 3：

次のプローブを以下のインサイツ研究で使用した。

DNA 3 9 5 2 3-p 1 (配列番号：210)

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGCACGGCCACAGACA-3'

DNA 3 9 5 2 3-p 2 (配列番号：211)

5'-CTATGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGAGACCCTGCGCTTCTCGTTCCA-3'

【0140】

I 9 8-0 5 2：

正常なヒト皮膚 (新生児の包皮) 及び成人の乾癬性皮膚の DNA 3 9 5 2 3 (配列番号：45) は、双方とも、上部に重なる皮膚の表皮細胞の前駆体である基底膜に沿った単層の、基底層の上皮細胞において特異的な強い発現を示した。

上部に重なっている層 (有棘層、顆粒層等) の上皮細胞では何の発現もなかった。シグナルの強さは乾癬皮膚でわずかに増加した。また、正常及び乾癬皮膚の双方の真皮 (表皮直下にある結合組織) でも発現が明らかであった。間質性線維芽細胞であるコラーゲンマトリクス内の紡錘形細胞において発現が最も顕著であった。

脳では、小脳切片は、表在性皮質ニューロンで強い特異的な発現をし、皮質ニューロンの特定集団に独特なパターンが示唆された。

炎症した、また正常な腸：正常なヒトの大腸及びクローン病又は潰瘍性大腸炎のある腸では、絨毛の固有層内に多巣性パターンで特異的な中程度から強い発現があった。インサイツで標識された細胞は線維芽細胞として最もよく描写される紡錘状 (spindle) 間質細胞であった。腸の上皮細胞では発現はなく、発病した腸においても明らかに増加した (強度又は頻度) 発現はなかった。特に、炎症をした腸において病変部と発現の間には相関もなかった。

10

20

30

40

50

ヒト胎児腎臓では、多巢性の発育中細管において特異的な弱いあるいは中程度の発現があった；これらの病巣における細管上皮に発現があった。

皮膚におけるDNA39523（配列番号：45）の発現と表皮細胞の基底上皮細胞への特異的な局在化は、基底上皮細胞の分化／維持における潜在的な役割を示唆している。発現が基底層に直接隣接する細胞で起こっているという事実と合わせて、この発現パターンは、該細胞が表皮における白血球の輸送を調節していることを示唆している。その結果、DNA39523（配列番号：45）は、表皮中への樹状突起／ランゲルハンス細胞又はリンパ球の輸送のための構成的に発現されるシグナルでありうる。このような輸送は正常な皮膚で生じる正常な生理的事象であり、皮膚の免疫監視に関与していると思われる。

炎症性腸疾患におけるDNA39523（配列番号：45）の発現は、正常な組織よりも増加しておらず、その発現の炎症性病変部との相関はなかった。同様に、乾癬皮膚病変部の基底表皮細胞における発現も正常な新生児の皮膚でみられる発現と等しいか、わずかに多いにすぎなかった（しかし、年齢が一致した対照成人皮膚は研究時点では入手できなかった）。

IS97-128：

DNA39523（配列番号：45）の発現はマウス胚皮膚の上皮並びにヒト胎児皮膚の基底上皮及び上皮で観察された。チンパンジー舌の鱗状粘膜の基底上皮ペグ（p e g s）もポジティブであった。胎児腎臓の発育中の糸球体、成人腎臓細管、及び末期腎臓疾患の「甲状腺化」上皮の細胞のサブセットにおいても発現が観察された。しかしながら、腎細胞癌では、おそらく上皮細胞全体において低い発現が見られた。さらに、発現は、間質細胞では（1）胎児肺で低レベルで、また（2）胃腸腺の先端部分でも観察された。胎児小腸絨毛の固有層、正常大腸粘膜、及び大腸癌における間質細胞にわたって高い発現が示された。肉腫のヒラン化（h y l a n i z e d）ストローマにおける良性結合組織細胞に強い発現が生じた。胎盤絨毛及び脾赤髄における間質細胞においても発現が生じた。脳では、皮質ニューロンで発現が生じた。

DNA39523（配列番号：45）は発育中の骨を囲む結合組織においてと胎児の神経鞘細胞にわたっても発現した。

検査した胎児組織（E12-E16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。試験した成人組織は：肝臓、腎臓、副腎、心筋層、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺、皮膚、大脳皮質（r m）、海馬（r m）、眼、胃、胃癌、大腸、大腸癌、甲状腺（チンパンジー）、副甲状腺（チンパンジー）、卵巣（チンパンジー）及び軟骨肉腫を含む。アセトアミノフェン誘導肝臓傷害及び肝硬変から得られた組織も検査した。

【0141】

IS98-092：

サル大脳皮質の外層（I及びII）における多数の細胞にDNA39523（配列番号：45）の発現が存在した。より深い皮質層の細胞の小さなサブセットも、このケモカイン相同体のmRNAを発現した。海馬の分子層内と歯状回の内部辺縁の境界の散在細胞はDNA39523（配列番号：45）の発現を示した。大脳皮質内では発現は検出されなかった。DNA39523（配列番号：45）の発現は、ケモカイン相同体が通常は発現される領域において細胞死が起こった梗塞脳では観察されなかった。DNA39523（配列番号：45）は、おそらくは大脳皮質の外層のニューロンのサブセットのマーカーとなり、おそらくはニューロン移動障害を明らかにしうる。異常なニューロン移動は、幾つかの発作性疾患及び精神分裂病の原因となりうる。

IS98-128：

DNA39523（配列番号：45）は、生後（P）10日及び成体マウス脳内に興味ある特定のハイブリッド形成パターンを示した。P10マウスの1つの矢状断面において、海馬の分子層及び歯状回の内辺縁に強いシグナルが散乱して観察された。プレ鉤状回の細胞は中程度に標識された；シグナルは強い帯域を、後部板状皮質の外層を通過して後頭皮質に至るまで伸ばし、そこでシグナルはバックグラウンドレベルまで低下する。ポジティブ

ニューロンの小セットが P 1 0 運動皮質の深い領域で検出された；P 1 0 皮質の外層内のニューロンはバックグラウンドレベルを越えるシグナルを示さなかった。中程度のハイブリッド形成シグナルもまた下丘で検出された。成体マウス脳におけるケモカイン相同体シグナルは、3つの冠状断面において異なるレベルで評価した。強いシグナルが隔壁及び橋核の散在ニューロン及び三叉神経の運動根で検出された；中程度のシグナルが海馬の分子層及び後部板状皮質の外層に見られた。

I S 9 9 - 0 2 7 :

ボレカイン ( b o l e k i n e ) ( B R A K としても知られ、D N A 3 9 5 2 3 ( 配列番号 : 4 5 ) が有意な相同性を有するケモカインである) は、c y s - x - c y s ( C X C ) モチーフと、アミノ末端 g l u - l e u - a r g ( E L R ) が存在しないことにより特徴付けられるケモカインのサブグループに属する。非 - E L R C X C ケモカイン ( S D F - 1 、 I P 1 0 、 M i g 及び P F 4 を含む) は B 及び T リンパ球を含む白血球のサブセットに対して走化性を示す。またそれらは、アンギオスタティック ( a n g i o s t a t i c ) 活性も有する。 10

D N A 3 9 5 2 3 ( 配列番号 : 4 5 ) は生後 ( P ) 1 日のマウスの脳で検出され、ボレカインシグナルは海馬 ( ラクノサム分子層 ( s t r a t u m l a c u n o s u m m o l e c u l a r e ) 及び歯状回の門部) 及び前側嗅覚核 ( o l f a c t o r y n u c l e u s ) で検出されたが、発育中の大脳皮質と小脳では検出されなかった。P 1 0 により、シグナルは大脳皮質の層 1 及び 2 の細胞のサブセットに存在する。またより深い層における細胞の小集団でも D N A 3 9 5 2 3 ( 配列番号 : 4 5 ) を発現している。海馬におけるパターンは P 1 脳と類似していた。弱いシグナルが小脳、特に小葉 I X 及び X に存在している。シグナルはまた背側線条体及び小丘にも存在している。 20

成人マウス脳において、ボレカインポジティブ細胞は成人大脳皮質で検出することは困難であるが、シグナルは前側嗅覚核と海馬に存在している。しかし、虚血マウス脳においては、ボレカインシグナルは境界域に誘発されている。

発育中の大脳皮質では、ボレカインの発現はニューロン遊走の最終段階及びシナプス形成と軸索突起の確立に相関している。他の C X C キモカインは中枢神経系でのパターンニングとニューロン遊走 ( S D F - 1 ) 及びニューロン活動の調節 ( I L - 8 及び G R O - a ) における役割を担っている。

ボレカインの発現は脳の虚血性再灌流傷害において誘発されるが、他の炎症状態では誘発されない。 30

【 0 1 4 2 】

D N A 4 7 3 6 5 ( I S 9 7 - 1 4 2 ) : 胎児組織において、D N A 4 7 6 3 5 ( 配列番号 : 9 1 ) の発現は、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、胎児網膜にわたって見られる。胎児ニューロンにわたって低レベルの発現。

次のプローブを上述の分析で使用した :

D N A 4 7 3 6 5 - p 1 ( 配列番号 : 2 1 4 ) :

5' - G G A T T C T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G C A A C C C G A G C A T G G C A C A G C A C - 3'

D N A 4 7 3 6 5 - p 2 ( 配列番号 : 2 1 5 ) :

5' - C T A T G A A A T T A A C C C T C A C T A A A G G G A T C T C C C A G C C G C C C T T C T C - 3'

D N A 4 9 4 3 5 ( I S 9 7 - 1 3 6 ) :

D N A 4 9 4 3 5 ( 配列番号 : 1 1 1 ) の中程度の発現が胎児脳の皮質ニューロンにわたって観察された。発現は胎児網膜の内面にわたってもまた観察され、発達中のレンズにも見られることがあった。発現は胎児皮膚、軟骨、小腸、胎盤絨毛及び臍帯にわたって見られた。成人組織では、胆嚢上皮に極めて高レベルの発現があった。D N A 4 9 4 3 5 ( 配列番号 : 1 1 1 ) の中程度の発現は、成人腎臓、胃及び大腸上皮で見られた。

検査したヒト胎児組織 ( E 1 2 - E 1 6 週 ) は : 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、精巣及び下肢を含む。検査した成人ヒト組織は : 腎臓 ( 正常及び末期段階 ) 、副腎、脾臓、リンパ節、膵臓、肺、眼 ( 網膜を含む ) 、膀胱、肝臓 ( 正常、肝硬変、急性機能不全 ) 40 50

を含む。

検査した非ヒト霊長類組織は、チンパンジー組織の副腎、及びアカゲザル組織の脳皮質、海馬及び小脳を含む。

上述の分析で使用したプローブは以下の通りであった：

DNA 49435-p 1 (配列番号：218)：

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCGGATCCTGGCCGGCCTCTG-3'

DNA 49435-p 2 (配列番号：219)：

5'-CTATGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGAGCCCGGCATGGTCTCAGTTA-3'

【0143】

DNA 54228 (IS98-105)：

DNA 54228 (配列番号：133) の発現は骨スピクラ：胎児骨幹端、胎児頭蓋冠（頭蓋）及びヒト異常増殖の骨組織（骨肉腫及び軟骨肉腫）で観察された。軟骨肉腫及び骨肉腫の骨化スピクラ及び胎児骨の骨幹端の小骨スピクラに、弱いが一貫したシグナルがあった。ヒト肺、肝臓、胸腺、腎臓、甲状腺、脳、脾臓、副腎、脳、軟骨、肺、肝臓、腸、生殖腺、心臓及び皮膚を含む胎児組織では何のシグナルも検出されなかった。

上述の手順で使用したプローブは以下の通りであった：

hmDETI-p 1 (配列番号：220)

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCACCACCACCCAGGAGC-3'

hmDETI-p 2 (配列番号：221)

5'-CTATGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGAATGAAGTGGGACGTTTGAGT-3'

DNA 54228-p 1 (配列番号：222)：

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCTTCTTTCTTACCACCACC-3'

DNA 54228-p 2 (配列番号：223)：

5'-CTATGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGATCTGCCTTGGCTTTTGACAC-3'

DNA 54231 (mFIZZ3)：

IS98-070：

DNA 54231 (配列番号：139) は脂肪細胞に特異的な中程度のシグナルを示した。このシグナルは、首において気管の回りの腸間膜脂肪と間質性脂肪に存在する。発現パターンは成体脂肪に対して特異的であるようである。

IS98-109：

DNA 54231 (配列番号：139) の発現は脂肪細胞に特異的であり、腹膜腸間膜、腎盂の脂肪被膜及び乳房肉趾を含む、この研究でこのような細胞が見出される場所には何れにも存在した。正常なマウス脳、肝臓、腎臓、乳腺、脾臓、脾臓、骨髄、胃、十二指腸、空腸、回腸、大腸、盲腸、精巣、皮膚又は肺における何れの他の細胞型においても発現はなかった。

脂肪細胞に対するこの分子の選択的分布は、肥満において何れも重要である、脂肪細胞の産生／生成又は脂肪代謝の何れかにおける役割を示唆している。

上述の手順に使用したプローブは以下の通りである：

DNA 54231-p 1 (配列番号：224)：

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCCGAGGGGGACAGGAGCTAATA-3'

DNA 54231-p 2 (配列番号：225)：

5'-CTATGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGAGTCCCAAGAGCCACAGG-3'

【0144】

DNA 59294 (IS98-138)：

DNA 59294 (配列番号：149) は、正常成人及び胎児組織及び炎症、主に慢性リンパ球炎症を持つ組織からなるパネルで評価した。要約すると、発現は、筋肉、成人の或る種の型の平滑筋及び骨格及びヒト胎児の平滑筋に特異的であった。ヒト成人における発現は、大腸及び胆嚢を含む管器官の平滑筋において評価された。血管及び気管支の平滑筋

10

20

30

40

50



では発現されなかった。ヒト成人骨格筋は評価しなかった。胎児組織において、骨格筋、体幹骨格及び肢における中程度から高度の拡散した発現があった。腸壁の平滑筋では弱い発現があったが、心筋では発現されなかった。

成人組織において、大腸、慢性炎症性腸疾患を持つ5検体において平滑筋（筋層）で低レベルの拡散した発現があった。胆嚢において、胆嚢の平滑筋で弱から低レベルの発現があった。

ヒト胎児組織では、骨格筋において中程度の拡散した発現が、また平滑筋において弱から低レベル発現があった。しかしながら、胎児心臓又は肝臓、脾臓、C N S、腎臓、腸、肺を含む他の任意の器官では発現はなかった。

検出可能な発現のなかった試験された付加的なヒト組織には、慢性肉芽腫炎症及び慢性気管支炎（5患者）の肺、末梢神経、前立腺、心臓、胎盤、肝臓（傷害及び硬変を誘発するアセトアミノフェンを含む疾患多重ブロック）、脳（大脳及び小脳）、扁桃（反応性過形成）、末梢リンパ節、胸腺が含まれる。

上述の手順に使用したプローブは以下の通りである：

6 2 6 . p 1 (配列番号：2 2 6)：

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCGAATGGACTGGCCTCACA-3'

6 2 6 . p 2 (配列番号：2 2 7)：

5'-CTATGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGAAGGATGGTCTCGGGCTGCTG-3'

DNA 3 0 8 6 8 (I S 9 7-0 4 4)

DNA 3 0 8 6 8 発現は次の胎児組織：脊髄、自律神経節、腸管神経、仙骨神経叢、末梢及び脳神経で見出された。

検査した胎児組織は次のものであった：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、脾臓、脳、眼、脊髄、体壁、骨盤、及び下肢。検査した成人組織は：肝臓、腎臓、副腎、心筋層、大動脈、脾臓、リンパ節、脾臓、肺及び皮膚を含む。

上述の手順に使用したプローブは以下の通りである：

DNA 3 0 8 6 8 . p 1 (C 1 1 1-G)： (配列番号：3 0 4)

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCAGACAGGGCAAGCAGAATG-3'

DNA 3 0 8 6 8 . p 2 (C 1 1 1-H)： (配列番号：3 0 5)

5'-CTATGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGAAGGGGATGACTGGAGGAAC-3'

【 0 1 4 5 】

DNA 5 3 5 1 7：

I S 9 8-0 7 0：

正常な成体マウスの肺におけるDNA 5 3 5 1 7（配列番号：2 5 5）の発現は、大きな気道（気管支／細気管支）の粘膜上皮細胞のサブセット内にパッチ状の発現がある。また、大きな気道に隣接する粘膜下間質の希な離散した細胞内でも発現があった。これらの細胞は、典型的には正の病巣内に1-3であるが、大きな脈管に隣接し、平滑筋細胞、末梢神経又はシュワン細胞、又はリンパ管でありうる。

アレルギー性炎症を持つマウス成体肺（好酸性、リンパ性血管炎、細気管支炎及び肺炎）において、肺の大気道（気管支／細気管支）の全ての粘膜上皮細胞に強い拡散した発現があった。また、肺胞の内側の上皮細胞のサブセットを提示する離散細胞にも強い発現があった；これらの細胞はII型肺細胞である。また、正常な肺におけるように、大気道に隣接する粘膜下間質の希な離散細胞内に存在する発現がある。

正常な成体マウスの小腸及び大腸において、粘膜下、筋膜及び腸間膜に存在する多巢性の少しの離散したシングルの細胞内に強い発現がある。シグナルを発現する細胞は殆ど常にこれらの領域内の神経、静脈、動脈三連構造に付随している。これらの細胞は紡錘形をしており、末梢神経、そのような神経に付随するシュワン細胞又は脈管又はリンパに付随する支持細胞のあるタイプの何れかである。興味深いことに筋膜内にある同定可能な腸筋層間神経叢内には発現はない。

炎症性大腸（IL10R KOマウスからのもの）において、発現パターンは同様である

が、発現レベルは有意に減少していた。

I S 9 8 - 0 9 3 :

さらに、DNA 5 3 7 1 5 (配列番号: 2 5 5) の分布を正常なマウス組織で広範囲なスクリーニングを行い評価した。正常な肺において、発現は変化するが、存在するときはマウスの肺の気管支上皮細胞及び I I 型肺胞細胞に限定されていた。炎症性肺におけるこれらの細胞 (気管支粘膜肥大/過形成を伴うアレルギー性炎症: 喘息モデル) では顕著な増加があった。腸における DNA 5 3 7 1 5 (配列番号: 2 5 5) の発現は大腸において最も顕著であり、粘膜下及び筋膜 (m u c o s a m u s c u l a r i s)、腸の筋壁と粘膜との間の血管新生化組織層内の少しの離散細胞に存在していた。これらの細胞の正確な同定は表されていないが、それらの紡錘状 (s p i n d l o i d) 形態及び粘膜下の毛細管及び小血管の密接な関連性により次の可能性が示唆される: 血管周皮細胞又は非有髄神経線維のサブセット。

腸粘膜下の離散細胞における DNA 5 3 7 1 5 (配列番号: 2 5 5) の発現は大腸に制限され、空腸、回腸、近位十二指腸又は胃の切片では見られなかった。発現は次の正常なマウス組織: 肝臓、腎臓、脾臓、骨髄、肺、膵臓、胃、近位十二指腸、空腸、回腸、脳、皮膚、精巣又は乳腺では検出されなかった。

DNA 5 3 7 1 5 (配列番号: 2 5 5) は肺の粘膜免疫を増強又は刺激する役割を担っている可能性がある。

上述の手順に使用したプローブは以下の通りである:

DNA 5 3 5 1 7. p 1 (C 3 0 1 - P): (配列番号: 3 0 8)

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCCCAGGATGCCAACTTTGA-3'

DNA 5 3 5 1 7. p 2 (C 3 0 1 - Q): (配列番号: 3 0 9)

5'-CTATGAAATTAACCCCTACTAAAGGGAAGGAGGCCCATCTGTTCATAG-3'

【0 1 4 6】

実施例 7

疾患組織と細胞におけるインサイツハイブリッド形成

実施例 6 のインサイツハイブリッド形成法を使用し、特定の病気にかかったヒト個体から単離された発病組織における、遺伝子発現の測定、転写物の組織分布の分析、本発明の遺伝子/DNA 及びタンパク質の特異的 mRNA の合成における変化の追跡を行った。これらの結果は、本発明の遺伝子が発病組織のどこにより特異的に発現されるかを示しており、本発明の阻害又は刺激化合物 (及びそのアゴニスト又はアンタゴニスト) の病気における治療効果の特定の局在性が予測される。ハイブリッド形成は、一又は複数の次の組織及び試料を使用して、実施例 6 の方法に従って実施される:

(a) リンパ球及び抗原提示細胞 (樹状細胞、ランゲルハンス細胞、マクロファージ及び単球、NK 細胞);

(b) リンパ組織: 正常及び反応性リンパ節、胸腺、気管支関連リンパ組織 (BAL T)、粘膜関連リンパ組織 (MAL T);

(c) ヒト疾患組織:

- ・関節炎及び変性関節疾患を患っている患者の滑膜と関節;
- ・潰瘍性大腸炎及びクローン病を含む炎症性腸疾患を患っている患者の大腸;
- ・乾癬及び他の形態の皮膚炎からの皮膚病変部;
- ・慢性及び急性気管支炎、肺炎、間質性肺炎、胸膜炎からのリンパ節組織及び BAL T を含む肺組織;
- ・喘息からの組織リンパ節及び BAL T を含む肺組織;
- ・鼻炎又は副鼻孔炎を患っている患者の鼻及び洞組織;
- ・多発性硬化症、アルツハイマー病及び卒中からの脳及び脊髄;
- ・腎炎、糸球体腎炎及び全身性エリテマトードスからの腎臓;
- ・感染及び非感染肝炎及びアセトアミノフェン誘導性肝硬変からの肝臓;
- ・新生物/癌からの組織。

発現は細胞又は組織試料に関連した疾患における本発明の化合物 (及びそのアゴニスト又

はアンタゴニスト)の治療効果の局在化を示す一又は複数の細胞又は組織試料において観察される。

先に報告された非疾患組織分布と発現が重複する場合に使用したオリゴヌクレオチドの配列は実施例6に記載する。

【0147】

DNA30942:

IS98-021:発現は、正常なチンパンジー胸腺の単核食細胞、並びに胃癌(1/1)、結腸直腸癌(1/1)、乳癌(2/5)及び肺癌(1/4)で観察された。骨肉腫及びあまり分化していない脂肪肉腫の悪性細胞により発現。精巣テラトーマ及び乳癌(1/5)の悪性細胞におけるありうるシグナル。肺癌の一つにおいて、散在シグナルが肺リンパ組織内の高内皮細静脈で見られる。検査した胎児組織(E12-E16週)は: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、及び下肢を含む。検査した成人組織は:肝臓、腎臓、副腎、心筋層、大動脈、脾臓、肺、皮膚、軟骨肉腫、眼、胃、胃癌、大腸、大腸癌腫、腎細胞癌腫、前立腺、膀胱粘膜及び胆嚢を含む。また、アセトアミノフェン誘導肝臓傷害及び肝硬変から得られた組織も検査した。検査したアカゲザル組織は:大脳皮質(rm)、海馬(rm)を含む。検査したチンパンジー組織は:甲状腺、副甲状腺、卵巣、神経、舌、胸腺、副腎、胃粘膜及び唾液腺を含む。

IS98-085:発現が8つの腺癌と7つの扁平上皮肺癌に観察された。アクチンは全ての腫瘍で強くポジティブであり、全てがインサイツハイブリッド形成分析に適していることが示されている。DNA30942の発現は次の6つの腫瘍で観察された:

6727-95/扁平上皮癌-新生物上皮上に強い発現

9558-95/扁平上皮癌-新生物上皮上に発現

12235-95/腺癌-インサイツ及び浸潤腫瘍細胞上に発現

6545-95及び4187-96/扁平上皮癌-腫瘍ストローマの細胞上で発現、腫瘍細胞では発現は見られなかった;

12954-94/扁平上皮癌-間質細胞上に弱い発現。

IS99-112:

DNA30942(配列番号:13)のインサイツ発現を多くの慢性炎症状態及びリンパ器官で評価した。要約すると、DNA30942(配列番号:13)は、慢性喘息の気管支粘膜関連リンパ組織(BALT)、肺門リンパ節、扁桃腺の高内皮細静脈(HEV)で強く発現し、大腸粘膜でパッチ状の発現が、腸粘膜関連リンパ組織(GALT)HEVで弱い不統一な発現があった。

リンパ組織では、慢性喘息のある場合、気管支粘膜関連リンパ組織(BALT)、肺門リンパ節、扁桃腺の単一断片、及びIBD(GALT/MALT)の切片において腸粘膜関連リンパ組織で強い特異的な発現が観察された。これらの各リンパ器官において、発現は高内皮細静脈(HEV)に特に存在していた。

慢性喘息肺の組織では、BALT HEVにおける発現に加えて、特異的発現が炎症性気管支の粘膜下にある高又は反応性の膨張した内皮細胞が裏打ちする小毛細管で観察された。この領域はBALTと密接に関連していないが、気管支への炎症細胞輸送のための粘膜下部位に特異的である。これらの領域には、好酸球の有意な粘膜下浸潤があった。発病した肺(COPD及び慢性間質性肺炎)の他の切片では、DNA30942(配列番号:13)は何ら発現しておらず、これらの切片はいくつかのアーチファクト(スライドからの組織の損失)を有していた。

乾癬組織では、乾癬プラークにおけるいくつかの小真皮毛細管に弱い発現があった。扁桃腺組織では、濾胞に関連するHEVにおける発現に加えて、網状扁桃腺陰窩上皮内に強い発現があった。また、発現は小上皮内毛細管の血管にも存在していた。発現はまたいくつかの上皮細胞内にもあった。これは重要な免疫学的部位であり、抗原提示に関与し、耐性誘発において役割を担っている。

クローン病及び潰瘍性大腸炎を患っている患者から単離された組織では、全ての場合では

10

20

30

40

50

ないがそのいくつかの場合にパッチ状分布を伴って粘膜に発現が存在した。G A L T の H E V における発現は他のリンパ組織でみられるよりも顕著に弱いシグナルとして存在しており、粘膜に強いがパッチ状の発現が存在する切片においてさえ一貫して存在はしていなかった。

アセトアミノフェン誘導肝臓傷害及び肝硬変から単離された組織では、慢性リンパ性炎症を有する肝門管の領域内の小毛細管に弱い発現があった。

#### 【0148】

DNA33460 (IS98-015) :

DNA33460 (配列番号: 20) の発現は、胎児眼の発育中の外眼性筋肉に直ぐ隣接している緩い結合組織の細胞にわたって観察された。軟部組織肉腫上に中程度の発現。検査した胎児組織 (E12-E16週) は: 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、及び下肢を含む。検査した成人組織は: 肝臓、腎臓、腎細胞癌腫、副腎、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺、心筋層、皮膚、大脳皮質 (rm)、海馬 (rm)、小脳 (rm)、膀胱、前立腺、胃、胃癌、大腸、大腸癌腫、甲状腺 (チンパンジー)、副甲状腺 (チンパンジー)、卵巣 (チンパンジー) 及び軟骨肉腫を含む。また、アセトアミノフェン誘導肝臓傷害及び肝硬変から得られた組織も検査した。

この手順で使用したプローブは以下の通りである:

DNA33460-p1 (配列番号: 204) :

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCAGCACTGCCGGGATGTCAAC-3'

DNA33460-p2 (配列番号: 205) :

5'-CTATGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGAGTTTGGGCCTCGGAGCACTG-3'

DNA34387 (IS98-083) :

発現は肺癌腫瘍で観察され、8つ全ての扁平上皮癌及び6/8の腺癌においてポジティブであった。発現レベルは腺癌で低から中程度であり、扁平上皮癌で非常に強かった。腫瘍ストローマ、肺胞又は正常な呼吸上皮では何の発現も見られなかった。おそらくリンパ節で低レベル発現。

発現は肺癌で観察された。遺伝子を肺腫瘍パネルの Taqman 分析で増幅した。発現は8つの扁平上皮癌及び6/8の腺癌で観察された。発現はインサイツ及び湿潤成分においても見られた。腺癌における発現レベルは低から中程度であった。一般的に発現は扁平上皮癌でより高く、その2つでは発現は強かった。おそらくリンパ節では低レベル発現。

#### 【0149】

DNA35638 :

IS98-124 :

この研究では、炎症ヒト組織 (乾癬、IBD、炎症腎臓、炎症肺、肝炎 (肝臓ブロック)、正常な扁桃腺、成人及びチンパンジーの多ブロック) における DNA35638 (配列番号: 35) を検査した。DNA35638 (配列番号: 35) は、この出願の他の箇所、免疫賦活性 (MLRにおけるT細胞の増殖及び同時刺激の増強) 及び炎症誘発特性 (インビボにおける好中球湿潤の誘発) を有していることが示されている。

この研究では、非炎症組織と比べて、炎症ヒト組織の血管中におけるこの分子の差次的な発現を評価した。要約すると、発現は、扁桃腺の毛包周囲洞を含む毛細管、慢性硬化性腎炎の検体における細動脈、乾癬皮膚の表層真皮血管、慢性炎症を患っている肺の大血管の内皮/内膜に存在していた。DNA35638 (配列番号: 35) は、正常な皮膚 (ヒト包皮検体)、正常な肺、炎症 (8IBD検体) 又は正常な大腸、慢性的に炎症した肝臓又は肝硬変、正常な成人心臓組織、又は副腎では、(この方法で検出可能な程には) 発現しなかった。

DNA39523 :

I98-052 :

ヒト正常皮膚 (新生児の包皮) 及び成人乾癬皮膚の双方において、DNA39523 (配列番号: 45) は、基底層の上皮細胞-上部に重なる皮膚の表皮細胞の前駆体であり、基

底膜に沿った単層において所定強さの発現を示した。

上部に重なっている層（有棘層、顆粒層等）の上皮細胞では何の発現もなかった。シグナルの強さは乾癬皮膚でわずかに増加した。また、正常及び乾癬皮膚の双方の真皮（表皮直下にある結合組織）でも発現が明らかであった。間質性線維芽であるコラーゲンマトリクス内の紡錘形細胞において発現は最も明らかであった。

炎症した、また正常な腸：正常なヒトの大腸及びクローン病又は潰瘍性大腸炎のある腸では、絨毛の固有層内の多巢性パターンにおいて、特に中程度ないしは強い発現があった。インサイツで標識された細胞は線維芽細胞として最もよく表される紡錘状（spindle）間質細胞であった。腸の上皮細胞では発現せず、発病した腸においても明らかに増加した（強度又は頻度）発現はなかった。特に、炎症をした腸の病変部と発現との間には相関もなかった。

10

皮膚におけるDNA39523（配列番号：45）の発現、及び表皮細胞の基底上皮細胞までの特異的な局在性により、基底上皮細胞の分化／維持における潜在的な役割が示唆される。発現が基底層に直接隣接する細胞で起こっているという事実と合わせて、この発現パターンにより、該細胞が表皮への白血球の輸送を調節していることが示唆される。その結果、DNA39523（配列番号：45）は、表皮における樹状突起／ランゲルハンス細胞又はリンパ球の輸送のための構成的に発現されるシグナルでありうる。このような輸送は正常な皮膚で生じる正常な生理的事象であり、皮膚の免疫監視に関与していると思われる。

炎症性腸疾患におけるDNA39523（配列番号：45）の発現は、正常な組織よりも増加しておらず、炎症性病変部に対するその発現の相関はなかった。同様に、乾癬皮膚病変部の基底表皮細胞における発現も正常な新生児の皮膚でみられる発現と等しいか、わずかに多いにすぎなかった（しかし、年齢が一致した対照成人皮膚は研究時点では入手できなかった）。

20

#### 【0150】

DNA45416（IS98-140）：

DNA45416（配列番号：79）の発現を、種々のヒト及び非ヒト霊長類組織で評価し、高度に特異的であることが見出された。発現は、肺の肺胞マクロファージ及び肝臓洞様毛細血管のクップファー細胞にのみ存在した。これらの細胞での発現は、これら独特の細胞集団が活性化されたときに有意に増加した。組織マクロファージのこれら2つの亜集団は異なる器官に局在化し、それらは類似の生物学的機能を有する。これら両方の型の食細胞は、病原、老化細胞及びタンパク質を含む血流又は気道からの物質を除去するフィルターとして作用し、共に広範な重要なプロ炎症サイトカインを分泌することができる。

30

炎症肺（7患者試料）では、発現は反応性肺胞マクロファージ細胞集団において顕著であり、肺胞内に1個又は凝集体で存在する大きくて青白く、しばしば空胞を持つ細胞として定義され、正常で非反応性マクロファージ（正常サイズの単一の散乱細胞）においては弱からネガティブであった。肺胞マクロファージでの発現は、これらの細胞が数及びサイズともに増大（活性化）したとき、炎症の間に増加した。これらの組織の間質炎症及び気管支周辺リンパ細胞過形成の領域に組織球が存在するにも関わらず、発現は肺胞マクロファージに制限されていた。多くの炎症肺も幾分の炎症抑制を有していた；発現は神経向性の顆粒球に存在しなかった。

40

肝臓においては、急性中心小葉性壊死（アセトアミノフェン毒性）又はかなり顕著な門脈周囲の炎症を持つ肝臓において反応性／活性化クップファー細胞に強い発現があった。しかしながら、正常肝臓、又は中程度の炎症、又は穏和から中程度の小葉過形成／肥大のみを持つ肝臓におけるクップファー細胞では発現がなかった。よって、肺と同様に、活性化／反応性細胞において発現の増加があった。

炎症した腸、過形成／反応性扁桃腺又は正常リンパ節に存在する組織球／マクロファージにおいて、この分子の発現は無かった。全てが組織球炎症又は常在性マクロファージ集団を含むこれらの組織で発現がないことは、肺胞マクロファージ及び肝臓クップファー細胞として定義される独特のマクロファージサブセット集団に制限された発現を強く支持する

50

。しかしながら、DNA 454216（配列番号：79）の発現は、脾臓又は骨髄では評価できなかった。

検出可能な発現を示さなかった評価したヒト組織は：炎症性腸疾患（中程度から重症の7患者試料）、反応性過形成を持つ扁桃腺、末梢リンパ節、乾癬皮膚（穏和から中程度の疾患を持つ2患者試料）、心臓、末梢神経を含む。検出可能な発現を示さなかった評価したチンパンジー組織は：舌、胃、胸腺を含む。

上述の研究で使用したプローブは以下の通りである：

628.p1（配列番号：212）：

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCTCCAAGCCACAGTGACAA-3'

628.p2（配列番号：213）：

5'-CTATGAAATTAACCCTCACTAAAGGGACCTCCACATTTCTGCCAGTA-3'

【0151】

DNA 41374：

IS-98-077：

DNA 41374（配列番号：248）は胸腺Tリンパ球で発現した。

要約：評価した多くの組織で、胸腺Tリンパ球に弱い拡散した発現が検出されただけであった。制限された分布パターンは、Tリンパ球又はTリンパ球に密接に関連している細胞、例えば抗原提示細胞（樹状細胞集団等）による発現を示唆している。かなりのリンパ性炎症を有し、反応性濾胞形成が存在する炎症ヒト組織（炎症性腸疾患及び慢性リンパ間質性肺炎／気管支炎）において、有意な数のTリンパ球を含む領域に検出可能な発現はなかった。検出可能な発現がなかった試験した組織は：ヒト正常組織：胎盤、肺、脾臓、副腎、皮膚、腎臓、眼、肝臓；ヒト発病組織：肝臓疾患：慢性肝炎、慢性胆管炎、急性小葉中心壊死（アセトアミノフェン毒性）；異常増殖（腫瘍多ブロック）；骨肉腫、扁平上皮癌；ヒト胎児組織：脳、脊髄、肺、腎臓、腎臓、軸及び肢筋骨格血管、臍帯；非ヒト霊長類：舌、甲状腺、副甲状腺、胃、唾液腺を含む。

IS 98-125

DNA 41374（配列番号：248）はTリンパ球特定領域にて、ヒト扁桃腺及び非ヒト霊長類胸腺において低レベルの発現をした。制限された分布パターンは、Tリンパ球又はTリンパ球に密接に関連している細胞、例えば抗原提示細胞（樹状細胞集団等）による発現を示唆している。かなりのリンパ性炎症を有し、反応性濾胞形成が存在する炎症ヒト組織（炎症性腸疾患及び慢性リンパ間質性肺炎／気管支炎）において、有意な数のTリンパ球を含む領域に検出可能な発現はなかった。

炎症肺：（慢性リンパ及び肉芽種性間質性肺炎）：対照センスプローブと比較して間質に弱い又はネガティブなシグナル。正常なチンパンジー胸腺（ヒト胸腺は入手できず）及びヒト扁桃腺で弱い発現があった。後者において、発現は毛包周囲縁部を含むこの構造のTリンパ球領域及び副皮質に主として発現した。

次のヒト組織：炎症性腸疾患（8患者検体）、慢性的炎症及び正常な肺（6患者検体）、慢性硬化性腎炎（1）、慢性的及び急性的炎症及び正常及び肝硬変の肝臓（10検体、多ブロック）、正常及び乾癬皮膚、末梢リンパ節（非反応性）で検出可能な発現はなかった。

上述の手順で使ったプローブは以下の通りである：

41374.p1（C337-G）：（配列番号：306）

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCTCCACAGAACCTCGCCATCA-3'

41374.p2（C337-H）：（配列番号：307）

5'-CTATGAAATTAACCCTCACTAAAGGGATGGGCAAGACTCACAAGCAG-3'

【0152】

DNA 53517：

IS 98-070：

正常な成体マウスの肺におけるDNA 53517（配列番号：255）の発現は、大きな気道（気管支／細気管支）の粘膜上皮細胞のサブセット内にパッチ状の発現がある。また

10

20

30

40

50

、大きな気道に隣接する粘膜下間質の希な離散した細胞内でも発現があった。これらの細胞は、典型的に正の病巣内に1-3であるが、大きな脈管に隣接し、平滑筋細胞、末梢神経又はシュワン細胞、又はリンパ管を提示する。

アレルギー性炎症を持つマウス成体肺（好酸性、リンパ性血管炎、細気管支炎及び肺炎）において、肺の大気道（気管支／細気管支）の全ての粘膜上皮細胞に強い拡散発現があった。また、肺胞を裏打ちする上皮細胞のサブセットを提示する離散細胞に強い発現があり；これらの細胞はI I型肺細胞である。また、正常な肺におけるように、大気道に隣接する粘膜下間質に希な離散細胞内に存在する発現がある。

正常な成体マウスの小及び大腸において、粘膜下、筋膜及び腸間膜に存在する多巢性の少しの離散したシングルの細胞内に強い発現がある。シグナルを発現する細胞は殆ど常にこれらの領域内の神経、静脈、動脈三連構造に付随している。これらの細胞は紡錘形をしており、末梢神経、そのような神経に付随するシュワン細胞又は脈管又はリンパに付随する支持細胞のあるタイプの何れかである。興味深いことに筋膜内にある同定可能な腸筋層間神経叢内には発現はない。

炎症性大腸（I L 1 0 R K Oマウスからのもの）において、発現パターンは同様であるが、発現レベルは有意に減少していた。

I S 9 8 - 1 3 5 :

D N A 5 3 7 1 5（配列番号：2 5 5、マウスF I Z Z - 1）は次のヒト組織：胃癌、炎症肺（3患者）（脈管、肺胞、大きな気道及び粘液腺）、大動脈、心臓、胎盤及び胆嚢において検出プローブとして使用された。

マウスD N A 5 3 7 1 5（配列番号：2 5 5）の発現は正常なマウス肺の大きな気道上皮に存在し、炎症したマウス肺（気道上皮、I I型肺胞肺細胞）で顕著に増加した。また、血管チャンネルに沿った大腸粘膜下における離散細胞にも発現があった。

D N A 8 4 2 1 0 :

インサイツ研究に使用したプローブを次に示す：

8 4 2 1 0 . p 1 (F-7 9 6 1 9) : (配列番号：3 1 0)

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCGCGGTCGCAGGACATTCAGTA-3'

8 4 2 1 0 . p 2 (F-7 9 6 2 0) : (配列番号：3 1 1)

5'-CTATGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGAAGTCTTTGGGTTCCAGCACAC-3'

D N A 8 4 2 1 0（配列番号：2 8 5）は胎児腎臓、主に発育中の糸球体及び皮質領の細管で発現し、胎児肺及び脊髄では弱かった。また発育中の軟骨及び骨に隣接する間質細胞にも発現があった。成人組織において、弱い発現が正常な気管支上皮、5つの肺腫瘍（2つは扁平上皮癌で3つは腺癌）の一つ（腺癌）、及び軟骨肉腫において見られた。皮膚及びその付属物で発現する可能性もあるが、切片は折り畳まれており、評価することは困難である。

I S 9 9 - 1 0 2 :

悪性メラノーマ、肺腫瘍、大腸腫瘍、細胞ペレット、マウス組織、胎児組織におけるD N A 8 4 2 1 0（配列番号：2 8 5）の発現。

D N A 8 4 2 1 0（配列番号：2 8 5）の発現は、いくつかの成人（異常増殖及び非異常増殖）及び胎児組織において見られた。正常な成人組織に関する限り、D N A 8 4 2 1 0（配列番号：2 8 5）は皮膚の表皮（ほとんどが基底部に位置する細胞）及び皮膚付属物、例えば毛髪の濾胞及びそれらに関する皮脂腺で見られる。また発現は、気管支上皮及び粘膜下気管支腺でも見られる。ヒト胎児組織において、D N A 8 4 2 1 0（配列番号：2 8 5）の発現は、皮膚及び皮膚付属物、肺、腎皮質及び膀胱で見られる。また、発育中の骨及び軟骨に隣接する間葉細胞でも見られる。マウス胚で見られたハイブリッド形成シグナルはない。D N A 8 4 2 1 0（配列番号：2 8 5）の発現は6つの結腸直腸腺癌の一つ（弱）、3つの肺腺癌の2つ（一つは強を示すが、かなりの限局的発現であり、一つは非常に弱いポジティブである）、3つの肺扁平上皮細胞癌の0、及び一つの軟骨肉腫の一つ（弱）で見られる。また、5つの悪性メラノーマの5つで発現が見られ、発現の強度は非常に弱から強の範囲である。またこれらの切片は正常な表皮及び皮膚付属物におけるD N

10

20

30

40

50

A 8 4 2 1 0 (配列番号: 2 8 5) の発現を示す。

【0153】

実施例 8

ハイブリッド形成プローブとしての PRO ポリペプチドの使用

以下の方法は、PRO ポリペプチドをコードする核酸配列のハイブリッド形成プローブとしての使用を記載する。

全長又は成熟 PRO ポリペプチドのコード化配列を含む DNA は、ヒト組織 cDNA ライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリにおける同種 DNA 類 (天然発生変異体をコードするものなど) のスクリーニングのためのプローブとして用いられる。

いずれかのライブラリ DNA を含むフィルターのハイブリッド形成及び洗浄は、以下の高い緊縮条件で実施した。放射性標識 PRO-誘導プローブ (例えば、PRO 200、PRO 204、PRO 212、PRO 216、PRO 226、PRO 240、PRO 235、PRO 245、PRO 172、PRO 273、PRO 272、PRO 332、PRO 526、PRO 701、PRO 361、PRO 362、PRO 363、PRO 364、PRO 356、PRO 531、PRO 533、PRO 1083、PRO 865、PRO 770、PRO 769、PRO 788、PRO 1114、PRO 1007、PRO 1184、PRO 1031、PRO 1346、PRO 1155、PRO 1250、PRO 1312、PRO 1192、PRO 1246、PRO 1283、PRO 1195、PRO 1343、PRO 1418、PRO 1387、PRO 1410、PRO 1917、PRO 1868、PRO 205、PRO 21、PRO 269、PRO 344、PRO 333、PRO 381、PRO 720、PRO 866、PRO 840、PRO 982、PRO 836、PRO 1159、PRO 1358、PRO 1325、PRO 1338、PRO 1434、PRO 4333、PRO 4302、PRO 4430 又は PRO 5727) 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、pH 6.8、2xデンハート液、及び10%デキストラン硫酸の溶液中で、42℃において20時間行った。フィルターの洗浄は、0.1xSSC及び0.1%SDSの水溶液中、42℃で行った。

次いで、全長天然配列 PRO ポリペプチドをコードする DNA と所望の配列同一性を有する DNA は、この分野で知られた標準的な方法を用いて同定できる。

【0154】

実施例 9

大腸菌における PRO ポリペプチドの発現

この実施例は、大腸菌における組み換え発現による PRO ポリペプチドの非グリコシル化形態の調製を例示する。

PRO ポリペプチドをコードする DNA 配列は、選択された PCR プライマーを用いて最初に増幅する。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を用いることができる。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)) を参照) 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、脱リン酸化される。PCR 増幅した配列は、次いで、ベクターに結合させる。ベクターは、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、trp プロモーター、polyhis リーダー (最初の 6 つの STII コドン、polyhis 配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む)、PRO コード化領域、ラムダ転写終結区、及び argU 遺伝子を含む。

ライゲーション混合物は、次いで、上掲の Sambrook 等に記載された方法を用いた選択した大腸菌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 配列分析で確認される。

選択されたクローンは、抗生物質を添加した LB ブロスなどの液体培地で終夜成長させることができる。終夜培養は、続いて大規模培養の播種に用いられる。次に細胞を最適光学



密度まで成長させ、その間に発現プロモーターが作動する。

更に数時間の培養の後、細胞を遠心分離して採集することができる。遠心分離で得られた細胞ペレットは、この分野で知られた種々の試薬を用いて可溶化され、次いで可溶化PROポリペプチドタンパク質を金属キレート化カラムを用いてタンパク質を緊密に結合させる条件下で精製することができる。

以下の手法を用いて、大腸菌においてポリHisタグ形態でPROポリペプチドを発現させてもよい。PROポリペプチドをコードするDNAを選択したPCRプライマーを用いて最初に増幅する。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いでPCR増幅された、ポリHisタグ配列を発現ベクターに結合させ、それを株52 (W3110 fuhA (tonA) longalE rpoH ts (httpRts) clpP (lacIq)) に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用する。形質転換体は、最初に50mg/mlのカルベニシリンを含有するLB中、30℃で振盪しながら3-5のOD<sub>600</sub>に達するまで成長させる。ついで培養をCRAP培地 (3.57gの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.71gのクエン酸ナトリウム・2H<sub>2</sub>O、1.07gのKCl、5.36gのDifco酵母抽出物、500mL水中の5.36gのSheffield hycase SF、並びに110mMのMPOS、pH7.3、0.55% (w/v)のグルコース及び7mMのMgSO<sub>4</sub>の混合で調製) 中に50-100倍希釈し、30℃で振盪させながら約20-30時間成長させる。試料を取り出してSDS-PAGE分析により発現を確認し、バルク培養を遠心分離して細胞をペレット化する。細胞ペレットを精製及び再折りたたみまで凍結させる。

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

#### 【0155】

試料を、20mMのトリス、pH8.6、0.3MのNaCl、2.5Mの尿素、5mMのシステイン、20mMのグリシン及び1mMのEDTAからなる新たに調製した再折りたたみバッファー中でゆっくりと希釈することによりタンパク質を再折りたたみさせる。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が50-100マイクログラム/mlとなるように選択する。リフォールディング溶液を4℃で12-36時間ゆっくり攪拌する。リフォールディング反応はTFAを最終濃度0.4% (約3のpH) で添加することにより停止させた。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を0.22ミクロンフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度2-10%になるまで添加する。再折りたたみされたタンパク質を、Poros R1/H逆相カラムで、0.1% TFAの移動バッファーと10-80%のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかける。A280吸収を持つ画分のアリコートでSDSポリアクリルアミドゲルで分析し、相同な再折りたたみされたタンパク質を含有する画分をプールする。一般的に、殆どのタン

パク質の正しく再折りたたみされた種は、これらの種が最もコンパクトであり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。タンパク質の誤って折りたたまれた形態を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。

所望の折りたたまれたPROポリペプチドタンパク質を含有する画分をプールし、溶液に向けた窒素の弱い気流を用いてアセトニトリルを除去する。タンパク質を、透析又は調製バッファーで平衡化したG25 Superfine (Pharmacia) 樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、0.14Mの塩化ナトリウム及び4%のマニトールを含む20mMのHepes、pH6.8に処方した。

10

#### 【0156】

##### 実施例10

哺乳動物細胞でのPROポリペプチドの発現

この実施例は、哺乳動物細胞における組み換え発現による潜在的にグリコシル化した形態のPROポリペプチドの調製を例示する。

発現ベクターとしてベクターpRK5 (1989年3月15日公開のEP 307, 247参照)を用いる。場合によっては、PRODNAを選択した制限酵素を持つpRK5に結合させ、上掲のSambrook等に記載されたようなライゲーション方法を用いてPRODNAを挿入させる。得られたベクターは、例えばpRK5-PROと呼ばれる。

一実施態様では、選択された宿主細胞は293細胞とすることができる。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)は、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び／又は抗生物質を添加したDMEMなどの培地中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化する。約10µgのpRK5-PRODNAを約1µgのVARNA遺伝子コード化DNA [Thimmappaya等, Cell, 31:543 (1982)]と混合し、500µLの1mMトリス-HCl、0.1mMEDTA、0.227M CaCl<sub>2</sub>に溶解させる。この混合物に、滴状の、500µLの50mM HEPES (pH7.35)、280mMのNaCl、1.5mMのNaPO<sub>4</sub>を添加し、25℃で10分間析出物を形成させる。析出物を懸濁し、293細胞に加えて37℃で約4時間定着させる。培地を吸引し、2mlのPBS中20%グリセロールを30秒間添加する。293細胞を、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートする。

20

30

形質移入の約24時間後、培地を除去し、培地(単独)又は200µCi/ml<sup>35</sup>S-システイン及び200µCi/ml<sup>35</sup>S-メチオニンを含む培地で置換する。12時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15%SDSゲルに充填する。処理したゲルを乾燥させ、本発明のPRO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さらす。形質転換した細胞を含む培地に、更なるインキュベーションを施し(無血清培地で)、培地を選択されたバイオアッセイで試験する。

これに換わる技術において、pRK5-PROは、Somparyac等, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて293細胞に一過的に導入される。293細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700µgのpRK5-PROを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄する。DNA-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートする。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培地で洗浄し、組織培地、5µg/mlウシインシュリン及び0.1µg/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入する。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する。次いで発現された本発明のポリペプチド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選択した方法によって精製する。

40

他の実施態様では、本発明のポリペプチドをCHO細胞で発現させることができる。pRK5-PROは、CaPO<sub>4</sub>又はDEAE-デキストランなどの既知の試薬を用いてCH

50

O細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地（単独）又は<sup>35</sup>S-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。本発明のポリペプチドの存在を決定した後、培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約6日間インキュベートし、次いで条件培地を収集する。次いで、本発明の発現されたPROを含む培地を濃縮して、任意の選択した方法によって精製することができる。

また、本発明のエピトープタグポリペプチドは、宿主CHO細胞において発現させてもよい。本発明の所望のポリペプチドをコードするDNAはpRK5ベクター外でサブクロニングしてもよい。サブクローン挿入物は、PCRを施してバキュロウイルス発現ベクター中のポリ-Hisタグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。本発明のポリ-hisタグポリペプチド挿入物は、次いで、安定なクローンの選択のためのDHFR等の選択マーカーを含むSV40誘導ベクターにサブクロニングできる。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。本発明の発現されたポリ-hisタグポリペプチドを含む培地を、次いで濃縮し、Ni<sup>2+</sup>-キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。

10

#### 【0157】

##### 実施例11

##### 酵母菌でのPROの発現

以下の方法は、酵母菌中でのPROの組換え発現を記載する。

20

第1に、ADH2/GAPDHプロモーターからのPROポリペプチドの細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。本発明のポリペプチドをコードするDNA及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してPROの細胞内発現を指示する。分泌のために、PROをコードするDNAを選択したプラスミドに、ADH2/GAPDHプロモーターをコードするDNA、天然配列PROシグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌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）本発明のポリペプチドの発現のためのリンカー配列とともにクロニングすることができる。

酵母菌株AB110等の酵母菌を、次いで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清を、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。

30

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

##### 実施例12

##### バキュロウイルス感染昆虫細胞でのPROの発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中におけるPROの組換え発現を記載する。

40

PROをコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させる。このようなエピトープタグは、ポリ-hisタグ及び免疫グロブリンタグ（IgGのFc領域など）を含む。pVL1393（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。簡単には、本発明のポリペプチド又はPROポリペプチドをコードするDNAのコード化配列の所望部分〔例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列〕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、側方に位置する（選択された）制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、次いで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクロニングされる。

50

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold（商品名）ウイルスDNA（Pharmingen）を、スポドプテラ・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）（「Sf9」）細胞（ATCC CRL 1711）中にリポフェクチン（GIBCO-BRLから市販）を用いて同時形質移入することにより作成される。28℃で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いる。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilly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する。

次に、本発明の発現されたポリ-hisタグポリペプチドは、例えばNi<sup>2+</sup>-キレートアフィニティクロマトグラフィーにより次のように精製することができる。抽出は、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細胞から調製する。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー（25mLのHepes、pH 7.9; 12.5mMのMgCl<sub>2</sub>; 0.1mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1%のNP-40; 0.4MのKCl）中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理した。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のNaCl、10%グリセロール、pH 7.8）で50倍希釈し、0.45μmフィルターで濾過する。Ni<sup>2+</sup>-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る。濾過した細胞抽出物を、毎分0.5mLでカラムに負荷する。カラムを分画回収が始まる点であるA<sub>280</sub>のベースラインまで負荷バッファーで洗浄する。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー（50mMリン酸塩; 300mMのNaCl、10%グリセロール、pH 6.0）で洗浄する。A<sub>280</sub>のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で0から500mMイミダゾール勾配で展開する。1mLの分画を回収し、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ（Qiagen）に抱合したNi<sup>2+</sup>-NTAでのウェスタンブロットで分析する。本発明の溶離したHis<sub>10</sub>-タグポリペプチドを含む画分をプールして負荷バッファーで透析する。

あるいは、IgGタグ（又はFcタグ）PROポリペプチドの精製は、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既知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

#### 【0158】

##### 実施例 13

##### PROに結合する抗体の調製

この実施例は、本発明のポリペプチドに特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

モノクローナル抗体の生産のための技術はこの分野で知られており、例えば、上掲のGodingに記載されている。用いられ得る免疫原は、本発明の精製ポリペプチド、本発明のポリペプチドを含む融合タンパク質、及び細胞表面に本発明の組換えポリペプチド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行うことができる。

Balb/c等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に1-100マイクログラムの量で注入した本発明のポリペプチド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。免疫化したマウスを、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。本発明のポリペプチドに特異的な抗体の検出のためのELISAアッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「ポジティブ（陽性）」な動物に、本発明のポリ

ペプチドの最後の静脈内注射を注入することができる。3から4日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出す。次いで脾臓細胞を（35%ポリエチレングリコールを用いて）、ATCC番号CRL1597で入手可能なP3X63AgU.1等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させる。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン）培地を含む96ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害する。

#### 【0159】

ハイブリドーマ細胞を、本発明のポリペプチドに対する反応性についてELISAでスクリーニングする。本発明のポリペプチドに対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ（陽性）」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。10

ポジティブハイブリドーマ細胞を同系のBalb/cマウスに腹腔内注入し、抗-PRO200、抗-PRO204、抗-PRO212、抗-PRO216、抗-PRO226、抗-PRO240、抗-PRO235、抗-PRO245、抗-PRO172、抗-PRO273、抗-PRO272、抗-PRO332、抗-PRO526、抗-PRO701、抗-PRO361、抗-PRO362、抗-PRO363、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO531、抗-PRO533、抗-PRO1083、抗-PRO865、抗-PRO770、抗-PRO769、抗-PRO788、抗-PRO1114、抗-PRO1007、抗-PRO1184、抗-PRO1031、抗-PRO1346、抗-PRO1155、抗-PRO1250、抗-PRO1312、抗-PRO1192、20 抗-PRO1246、抗-PRO1283、抗-PRO1195、抗-PRO1343、抗-PRO1418、抗-PRO1387、抗-PRO1410、抗-PRO1917、抗-PRO1868、抗-PRO205、抗-PRO21、抗-PRO269、抗-PRO344、抗-PRO333、抗-PRO381、抗-PRO720、抗-PRO866、抗-PRO840、抗-PRO982、抗-PRO836、抗-PRO1159、抗-PRO1358、抗-PRO1325、抗-PRO1338、抗-PRO1434、抗-PRO4333、抗-PRO4302、抗-PRO4430又は抗-PRO5727モノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインA又はプロテインGへの結合性に基づくアフィニティクロマトグラフィーを用いることもできる。30

#### 【0160】

材料の寄託

次の材料をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801 ユニバーシティ・ブルバード、マナッサス、VA20110-2209米国（ATCC）に寄託した：

| 材料            | UNQ | PRO  | ATCC寄託番号 | 寄託日         |
|---------------|-----|------|----------|-------------|
| DNA29101-1276 | 174 | 200  | 209653   | 1998年3月5日   |
| DNA30871-1157 | 178 | 204  | 209380   | 1997年10月16日 |
| DNA30942-1134 | 186 | 212  | 209254   | 1997年9月16日  |
| DNA33087-1158 | 190 | 216  | 209381   | 1997年10月16日 |
| DNA33460-1166 | 200 | 226  | 209376   | 1997年10月16日 |
| DNA34387-1133 | 214 | 240  | 209260   | 1997年9月16日  |
| DNA35558-1167 | 209 | 235  | 209374   | 1997年10月16日 |
| DNA35638-1141 | 219 | 245  | 209265   | 1997年9月16日  |
| DNA35916-1161 | 146 | 172  | 209419   | 1997年10月28日 |
| DNA39523-1192 | 240 | 273  | 209424   | 1997年10月31日 |
| DNA40620-1183 | 239 | 272  | 209388   | 1997年10月17日 |
| DNA40982-1235 | 293 | 332  | 209433   | 1997年11月17日 |
| DNA44184-1319 | 330 | 526  | 209704   | 1998年3月26日  |
| DNA44205-1285 | 365 | 701  | 209720   | 1998年3月31日  |
| DNA45410-1250 | 316 | 361  | 209621   | 1998年2月5日   |
| DNA45416-1251 | 317 | 362  | 209620   | 1998年2月5日   |
| DNA45419-1252 | 318 | 363  | 209616   | 1998年2月5日   |
| DNA47365-1206 | 319 | 364  | 209436   | 1997年11月7日  |
| DNA47470-1130 | 313 | 356  | 209422   | 1997年10月28日 |
| DNA48314-1320 | 332 | 531  | 209702   | 1998年3月26日  |
| DNA49435-1219 | 334 | 533  | 209480   | 1997年11月21日 |
| DNA50921-1458 | 540 | 1083 | 209859   | 1998年5月12日  |
| DNA53974-1401 | 434 | 865  | 209774   | 1998年4月14日  |
| DNA54228-1366 | 408 | 770  | 209801   | 1998年4月23日  |
| DNA54231-1366 | 407 | 769  | 209802   | 1998年4月23日  |
| DNA56405-1357 | 430 | 788  | 209849   | 1998年5月6日   |
| DNA57033-1403 | 557 | 1114 | 209905   | 1998年5月27日  |
| DNA57690-1374 | 491 | 1007 | 209950   | 1998年6月9日   |

10

20

|               |      |      |        |             |
|---------------|------|------|--------|-------------|
| DNA59220-1514 | 598  | 1184 | 209962 | 1998年6月9日   |
| DNA59294-1381 | 516  | 1031 | 209866 | 1998年5月14日  |
| DNA59776-1600 | 701  | 1346 | 203128 | 1998年8月18日  |
| DNA59849-1504 | 585  | 1155 | 209986 | 1998年6月16日  |
| DNA60775-1532 | 633  | 1250 | 203173 | 1998年9月1日   |
| DNA61873-1574 | 678  | 1312 | 203132 | 1998年8月18日  |
| DNA62814-1521 | 606  | 1192 | 203093 | 1998年8月4日   |
| DNA64885-1529 | 630  | 1246 | 203457 | 1998年11月3日  |
| DNA65404-1551 | 653  | 1283 | 203244 | 1998年9月9日   |
| DNA65412-1523 | 608  | 1195 | 203094 | 1998年8月4日   |
| DNA66675-1587 | 698  | 1343 | 203282 | 1998年9月22日  |
| DNA68864-1629 | 732  | 1418 | 203276 | 1998年9月22日  |
| DNA68872-1620 | 722  | 1387 | 203160 | 1998年8月25日  |
| DNA68874-1622 | 728  | 1410 | 203277 | 1998年9月22日  |
| DNA76400-2528 | 900  | 1917 | 203573 | 1999年1月12日  |
| DNA77624-2515 | 859  | 1868 | 203553 | 1998年12月22日 |
| DNA30868-1156 | 179  | 205  | —      | 2000年3月2日   |
| DNA36638-1056 | 21   | 21   | 209456 | 1997年11月12日 |
| DNA38260-1180 | 236  | 269  | 209397 | 1997年10月17日 |
| DNA40592-1242 | 303  | 344  | 209492 | 1997年11月21日 |
| DNA41374-1312 | 294  | 333  | —      | —           |
| DNA44194-1317 | 322  | 381  | 209808 | 1998年4月28日  |
| DNA53517-1366 | 388  | 720  | 209802 | 1998年4月23日  |
| DNA53971-1359 | 435  | 866  | 209750 | 1998年4月7日   |
| DNA53987-1438 | 433  | 840  | 209858 | 1998年3月12日  |
| DNA57700-1408 | 483  | 982  | 203583 | 1999年1月12日  |
| DNA59620-1463 | 545  | 836  | 209989 | 1998年6月16日  |
| DNA60627-1508 | 589  | 1159 | 203092 | 1998年8月4日   |
| DNA64890-1612 | 707  | 1358 | 203131 | 1998年8月18日  |
|               |      |      |        |             |
| DNA66659-1593 | 685  | 1325 | 203269 | 1998年9月22日  |
| DNA66667-1596 | 693  | 1338 | 203267 | 1998年9月22日  |
| DNA68818-2536 | 739  | 1434 | 203657 | 1999年2月9日   |
| DNA84210-2576 | 1888 | 4333 | 203818 | 1999年3月2日   |
| DNA92218-2554 | 1866 | 4302 | 203834 | 1999年3月9日   |
| DNA96878-2626 | 1947 | 4430 | 23-PTA | 1999年5月5日   |
| DNA98853-1739 | 2448 | 5727 | 203906 | 1999年4月6日   |

10

20

30

40

50

## 【0161】

これらの寄託は、特許手続きの目的のための微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則（ブダペスト条約）の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存培養物が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテク社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、何れが最初に来ようとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則（特に参照番号886OG638の37CFR第1.14条を含む）に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

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

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると  
考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機  
能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、  
本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの材料の寄託は、ここに含まれる文書に  
よる説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不  
十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制  
限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明  
を様々に変形することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の  
請求の範囲内に入るものである。

【図面の簡単な説明】

10

【F i g 1】DNA 2 9 1 0 1－1 2 7 6（配列番号：1）を示す図である。

【F i g 2】天然配列 P R O 2 0 0 ポリペプチド U N Q 1 7 4（配列番号：2）を示す図  
である。

【F i g 3】DNA 3 0 8 7 1－1 1 5 7（配列番号：11）を示す図である。

【F i g 4】天然配列部分長 P R O 2 0 4 ポリペプチド U N Q 1 7 8（配列番号：12）  
を示す図である。

【F i g 5】DNA 3 0 9 4 2－1 1 3 4（配列番号：13）を示す図である。

【F i g 6】天然配列 P R O 2 1 2 ポリペプチド U N Q 1 8 6（配列番号：14）を示す  
図である。

【F i g 7】DNA 3 3 0 8 7－1 1 5 8（配列番号：18）を示す図である。

20

【F i g 8】天然配列 P R O 2 1 6 ポリペプチド U N Q 1 9 0（配列番号：19）を示す  
図である。

【F i g 9】DNA 3 3 4 6 0－1 1 6 6（配列番号：20）を示す図である。

【F i g 10】天然配列 P R O 2 2 6 ポリペプチド U N Q 2 0 0（配列番号：21）を示  
す図である。

【F i g 11】DNA 3 4 3 8 7－1 1 3 8（配列番号：25）を示す図である。

【F i g 12】天然配列 P R O 2 4 0 ポリペプチド U N Q 2 1 4（配列番号：26）を示  
す図である。

【F i g 13】DNA 3 5 5 5 8－1 1 6 7（配列番号：30）を示す図である。

【F i g 14】天然配列 P R O 2 3 5 ポリペプチド U N Q 2 0 9（配列番号：31）を示  
す図である。

30

【F i g 15】DNA 3 5 6 3 8－1 1 4 1（配列番号：35）を示す図である。

【F i g 16】天然配列 P R O 2 4 5 ポリペプチド U N Q 2 1 9（配列番号：36）を示  
す図である。

【F i g 17】DNA 3 5 9 1 6－1 1 6 1（配列番号：40）を示す図である。

【F i g 18】天然配列 P R O 1 7 2 ポリペプチド U N Q 1 4 6（配列番号：41）を示  
す図である。

【F i g 19】DNA 3 9 5 2 3－1 1 9 2（配列番号：45）を示す図である。

【F i g 20】天然配列 P R O 2 7 3 ポリペプチド U N Q 2 4 0（配列番号：46）を示  
す図である。

40

【F i g 21】DNA 4 0 6 2 0－1 1 8 3（配列番号：50）を示す図である。

【F i g 22】天然配列 P R O 2 7 2 ポリペプチド U N Q 2 3 9（配列番号：51）を示  
す図である。

【F i g 23】DNA 4 0 9 8 2－1 2 3 5（配列番号：56）を示す図である。

【F i g 24】天然配列 P R O 3 3 2 ポリペプチド U N Q 2 9 3（配列番号：57）を示  
す図である。

【F i g 25】DNA 4 4 1 8 4－1 3 1 9（配列番号：61）を示す図である。

【F i g 26】天然配列 P R O 5 2 6 ポリペプチド U N Q 3 3 0（配列番号：62）を示  
す図である。

【F i g 27】DNA 4 4 2 0 5－1 2 8 5（配列番号：66）を示す図である。

50



- 【F i g 2 8】天然配列 P R O 7 0 1 ポリペプチド U N Q 3 6 5 (配列番号：67) を示す図である。
- 【F i g 2 9】D N A 4 5 4 1 0 - 1 2 5 0 (配列番号：71) を示す図である。
- 【F i g 3 0】天然配列 P R O 3 6 1 ポリペプチド U N Q 3 1 6 (配列番号：72) を示す図である。
- 【F i g 3 1】D N A 4 5 4 1 6 - 1 2 5 1 (配列番号：79) を示す図である。
- 【F i g 3 2】天然配列 P R O 3 6 2 ポリペプチド U N Q 3 1 7 (配列番号：80) を示す図である。
- 【F i g 3 3】D N A 4 5 4 1 9 - 1 2 5 2 (配列番号：86) を示す図である。
- 【F i g 3 4】天然配列 P R O 3 6 3 ポリペプチド U N Q 3 1 8 (配列番号：87) を示す図である。 10
- 【F i g 3 5】D N A 4 7 3 6 5 - 1 2 0 6 (配列番号：91) を示す図である。
- 【F i g 3 6】天然配列 P R O 3 6 4 ポリペプチド U N Q 3 1 9 (配列番号：92) を示す図である。
- 【F i g 3 7】D N A 4 7 4 7 0 - 1 1 3 0 (配列番号：101) を示す図である。
- 【F i g 3 8】天然配列 P R O 3 5 6 ポリペプチド U N Q 3 1 3 (配列番号：102) を示す図である。
- 【F i g 3 9】D N A 4 8 3 1 4 - 1 3 2 0 (配列番号：106) を示す図である。
- 【F i g 4 0】天然配列 P R O 5 3 1 ポリペプチド U N Q 3 3 2 (配列番号：107) を示す図である。 20
- 【F i g 4 1】D N A 4 9 4 3 5 - 1 2 1 9 (配列番号：111) を示す図である。
- 【F i g 4 2】天然配列 P R O 5 3 3 ポリペプチド U N Q 3 3 4 (配列番号：112) を示す図である。
- 【F i g 4 3】D N A 5 0 9 2 1 - 1 4 5 8 (配列番号：116) を示す図である。
- 【F i g 4 4】天然配列 P R O 1 0 8 3 ポリペプチド U N Q 5 4 0 (配列番号：117) を示す図である。
- 【F i g 4 5】D N A 5 3 9 7 4 - 1 4 0 1 (配列番号：123) を示す図である。
- 【F i g 4 6】天然配列 P R O 8 6 5 ポリペプチド U N Q 4 3 4 (配列番号：124) を示す図である。
- 【F i g 4 7】D N A 5 4 2 2 8 - 1 3 6 6 (配列番号：133) を示す図である。 30
- 【F i g 4 8】天然配列 P R O 7 7 0 ポリペプチド U N Q 4 0 8 (配列番号：134) を示す図である。
- 【F i g 4 9】D N A 5 4 2 3 1 - 1 3 6 6 (配列番号：139) を示す図である。
- 【F i g 5 0】天然配列 P R O 7 6 9 ポリペプチド U N Q 4 0 7 (配列番号：140) を示す図である。
- 【F i g 5 1】D N A 5 6 4 0 5 - 1 3 5 7 (配列番号：141) を示す図である。
- 【F i g 5 2】天然配列 P R O 7 8 8 ポリペプチド U N Q 4 3 0 (配列番号：142) を示す図である。
- 【F i g 5 3】D N A 5 7 0 3 3 - 1 4 0 3 (配列番号：143) を示す図である。
- 【F i g 5 4】天然配列 P R O 1 1 1 4 ポリペプチド U N Q 5 5 7 (配列番号：144) 40
- を示す図である。
- 【F i g 5 5】D N A 5 7 6 9 0 - 1 3 7 4 (配列番号：145) を示す図である。
- 【F i g 5 6】天然配列 P R O 1 0 0 7 ポリペプチド U N Q 4 9 1 (配列番号：146) を示す図である。
- 【F i g 5 7】D N A 5 9 2 2 0 - 1 5 1 4 (配列番号：147) を示す図である。
- 【F i g 5 8】天然配列 P R O 1 1 8 4 ポリペプチド U N Q 5 9 8 (配列番号：148) を示す図である。
- 【F i g 5 9】D N A 5 9 2 9 4 - 1 3 8 1 (配列番号：149) を示す図である。
- 【F i g 6 0】天然配列 P R O 1 0 3 1 ポリペプチド U N Q 5 1 6 (配列番号：150) を示す図である。 50

- 【F i g 6 1】DNA 5 9 7 7 6 - 1 6 0 0 (配列番号: 1 5 1) を示す図である。
- 【F i g 6 2】天然配列 P R O 1 3 4 6 ポリペプチド U N Q 7 0 1 (配列番号: 1 5 2) を示す図である。
- 【F i g 6 3】DNA 5 9 8 4 9 - 1 5 0 4 (配列番号: 1 5 6) を示す図である。
- 【F i g 6 4】天然配列 P R O 1 1 5 5 ポリペプチド U N Q 5 8 5 (配列番号: 1 5 7) を示す図である。
- 【F i g 6 5】DNA 6 0 7 7 5 - 1 5 3 2 (配列番号: 1 5 8) を示す図である。
- 【F i g 6 6】天然配列 P R O 1 2 5 0 ポリペプチド U N Q 6 3 3 (配列番号: 1 5 9) を示す図である。
- 【F i g 6 7】DNA 6 1 8 7 3 - 1 5 7 4 (配列番号: 1 6 0) を示す図である。 10
- 【F i g 6 8】天然配列 P R O 1 3 1 2 ポリペプチド U N Q 6 7 8 (配列番号: 1 6 1) を示す図である。
- 【F i g 6 9】DNA 6 2 8 1 4 - 1 5 2 1 (配列番号: 1 6 2) を示す図である。
- 【F i g 7 0】天然配列 P R O 1 1 9 2 ポリペプチド U N Q 6 0 6 (配列番号: 1 6 3) を示す図である。
- 【F i g 7 1】DNA 6 4 8 8 5 - 1 5 2 9 (配列番号: 1 6 7) を示す図である。
- 【F i g 7 2】天然配列 P R O 1 2 4 6 ポリペプチド U N Q 6 3 0 (配列番号: 1 6 8) を示す図である。
- 【F i g 7 3】DNA 6 5 4 0 4 - 1 5 5 1 (配列番号: 1 6 9) を示す図である。
- 【F i g 7 4】天然配列 P R O 1 2 8 3 ポリペプチド U N Q 6 5 3 (配列番号: 1 7 0) 20
- 【F i g 7 5】DNA 6 5 4 1 2 - 1 5 2 3 (配列番号: 1 7 7) を示す図である。
- 【F i g 7 6】天然配列 P R O 1 1 9 5 ポリペプチド U N Q 6 0 8 (配列番号: 1 7 8) を示す図である。
- 【F i g 7 7】DNA 6 6 6 7 5 - 1 5 8 7 (配列番号: 1 7 9) を示す図である。
- 【F i g 7 8】天然配列 P R O 1 3 4 3 ポリペプチド U N Q 6 9 8 (配列番号: 1 8 0) を示す図である。
- 【F i g 7 9】DNA 6 8 8 6 4 - 1 6 2 9 (配列番号: 1 8 4) を示す図である。
- 【F i g 8 0】天然配列 P R O 1 4 1 8 ポリペプチド U N Q 7 3 2 (配列番号: 1 8 5) を示す図である。 30
- 【F i g 8 1】DNA 6 8 8 7 2 - 1 6 2 0 (配列番号: 1 8 6) を示す図である。
- 【F i g 8 2】天然配列 P R O 1 3 8 7 ポリペプチド U N Q 7 2 2 (配列番号: 1 8 7) を示す図である。
- 【F i g 8 3】DNA 6 8 8 7 4 - 1 6 2 2 (配列番号: 1 8 8) を示す図である。
- 【F i g 8 4】天然配列 P R O 1 4 1 0 ポリペプチド U N Q 7 2 8 (配列番号: 1 8 9) を示す図である。
- 【F i g 8 5】DNA 7 6 4 0 0 - 2 5 2 8 (配列番号: 1 9 0) を示す図である。
- 【F i g 8 6】天然配列 P R O 1 9 1 7 ポリペプチド U N Q 9 0 0 (配列番号: 1 9 1) を示す図である。
- 【F i g 8 7】DNA 7 7 6 2 4 - 2 5 1 5 (配列番号: 1 9 2) を示す図である。 40
- 【F i g 8 8】天然配列 P R O 1 8 6 8 ポリペプチド U N Q 8 5 9 (配列番号: 1 9 3) を示す図である。
- 【F i g 8 9】DNA 3 0 8 6 8 - 1 1 5 6 (配列番号: 2 2 8) を示す図である。
- 【F i g 9 0】部分天然配列 P R O 2 0 5 ポリペプチド U N Q 1 7 9 (配列番号: 2 2 9) を示す図である。
- 【F i g 9 1】DNA 3 6 6 3 8 - 1 0 5 6 (配列番号: 2 3 0) を示す図である。
- 【F i g 9 2】天然配列 P R O 2 1 ポリペプチド U N Q 2 1 (配列番号: 2 3 1) を示す図である。
- 【F i g 9 3】DNA 3 8 2 6 0 - 1 1 8 0 (配列番号: 2 3 2) を示す図である。
- 【F i g 9 4】天然配列 P R O 2 6 9 ポリペプチド U N Q 2 3 6 (配列番号: 2 3 3) を 50

示す図である。

【F i g 9 5】DNA 4 0 5 9 2－1 2 4 2（配列番号：2 4 0）を示す図である。

【F i g 9 6】天然配列 P R O 3 4 4 ポリペプチド U N Q 3 0 3（配列番号：2 4 1）を示す図である。

【F i g 9 7】DNA 4 1 3 7 4－1 3 1 2（配列番号：2 4 8）を示す図である。

【F i g 9 8】部分長天然配列 P R O 3 3 3 ポリペプチド U N Q 2 9 4（配列番号：2 4 9）を示す図である。

【F i g 9 9】DNA 4 4 1 9 4－1 3 1 7（配列番号：2 5 0）を示す図である。

【F i g 1 0 0】天然配列 P R O 3 8 1 ポリペプチド U N Q 3 2 2（配列番号：2 5 1）を示す図である。

10

【F i g 1 0 1】DNA 5 3 5 1 7－1 3 6 6（配列番号：2 5 5）を示す図である。

【F i g 1 0 2】天然配列 P R O 7 2 0 ポリペプチド U N Q 3 8 8（配列番号：2 5 6）を示す図である。

【F i g 1 0 3】DNA 5 3 9 7 1－1 3 5 9（配列番号：2 5 7）を示す図である。

【F i g 1 0 4】天然配列 P R O 8 6 6 ポリペプチド U N Q 4 3 5（配列番号：2 5 8）を示す図である。

【F i g 1 0 5】DNA 5 3 9 8 7－1 4 3 8（配列番号：2 6 6）を示す図である。

【F i g 1 0 6】天然配列 P R O 8 4 0 ポリペプチド U N Q 4 3 3（配列番号：2 6 7）を示す図である。

【F i g 1 0 7】DNA 5 7 7 0 0－1 4 0 8（配列番号：2 6 8）を示す図である。

20

【F i g 1 0 8】天然配列 P R O 9 8 2 ポリペプチド U N Q 4 8 3（配列番号：2 6 9）を示す図である。

【F i g 1 0 9】DNA 5 9 6 2 0－1 4 6 3（配列番号：2 7 0）を示す図である。

【F i g 1 1 0】天然配列 P R O 8 3 6 ポリペプチド U N Q 5 4 5（配列番号：2 7 1）を示す図である。

【F i g 1 1 1】DNA 6 0 6 2 7－1 5 0 8（配列番号：2 7 2）を示す図である。

【F i g 1 1 2】天然配列 P R O 1 1 5 9 ポリペプチド U N Q 5 8 9（配列番号：2 7 3）を示す図である。

【F i g 1 1 3】DNA 6 4 8 9 0－1 6 1 2（配列番号：2 7 4）を示す図である。

【F i g 1 1 4】天然配列 P R O 1 3 5 8 ポリペプチド U N Q 7 0 7（配列番号：2 7 5）を示す図である。

30

【F i g 1 1 5】DNA 6 6 6 5 9－1 5 9 3（配列番号：2 7 6）を示す図である。

【F i g 1 1 6】天然配列 P R O 1 3 2 5 ポリペプチド U N Q 6 8 5（配列番号：2 7 7）を示す図である。

【F i g 1 1 7】DNA 6 6 6 6 7－1 5 9 6（配列番号：2 7 8）を示す図である。

【F i g 1 1 8】天然配列 P R O 1 3 3 8 ポリペプチド U N Q 6 9 3（配列番号：2 7 9）を示す図である。

【F i g 1 1 9】DNA 6 8 8 1 8－2 5 3 6（配列番号：2 8 0）を示す図である。

【F i g 1 2 0】天然配列 P R O 1 4 3 4 ポリペプチド U N Q 7 3 9（配列番号：2 8 1）を示す図である。

40

【F i g 1 2 1】DNA 8 4 2 1 0－2 5 7 6（配列番号：2 8 5）を示す図である。

【F i g 1 2 2】天然配列 P R O 4 3 3 3 ポリペプチド U N Q 1 8 8 8（配列番号：2 8 6）を示す図である。

【F i g 1 2 3】DNA 9 2 2 1 8－2 5 5 4（配列番号：2 9 2）を示す図である。

【F i g 1 2 4】天然配列 P R O 4 3 0 2 ポリペプチド U N Q 1 8 6 6（配列番号：2 9 3）を示す図である。

【F i g 1 2 5】DNA 9 6 8 7 8－2 6 2 6（配列番号：2 9 4）を示す図である。

【F i g 1 2 6】天然配列 P R O 4 4 3 0 ポリペプチド U N Q 1 9 4 7（配列番号：2 9 5）を示す図である。

【F i g 1 2 7】DNA 9 8 8 5 3－1 7 3 9（配列番号：2 9 6）を示す図である。

50







MKRASAGGSRLLAWLWLVQAOVAAAPCGVACQYCNPEKVTYTSPPQGLQAVQVDSVJAG  
 RFLIHLNRISHPVAAFRACWVILHLSHNLVARIDAAAFTHQVLEGLDSDNAOL  
 SVSPDATTFFHGLRLHTLHLDRCQLEQLGELGFLRGAALQYLQDNALQALPDDTFRDL  
 GNLTFLHFGNRISVSFERFAHLSHLDRLHLLHNRVAVHVFHAFRGLRMLTFLFGLN  
 NLSLFTALAPLALQALYFLANDMNPVDCDRAFLPWLQGLFKFGSSSEVPCLEGRLAG  
 RDKALFADLQGCATVATVFWIWRATDEWGLFKKCCQDAAKRSLEQRLGAS  
 RRGALCGVPCDSFSGVGLHNSDPEFTFCSGLFARVNRVPCESFPGPTTS  
 RRCRSCNRNTRSHCRIGQAGSGGGGTSDSESSAGLSPLTCLTLPGLQALVNLWVLF  
 C









## 【図 5 8】

MTWLLFLPLFPVVOCTLIIVIIOMLVLLDPLGLVHLGOLLIHFIYLSMSEPLSPSPQ  
GVVVRARHLTPLEYVENPEPTTPTARVFRVFRVRCGGGSAFSEIMOKKKSQEEIKSM  
RTQQAQOEALTEPRFAGVPSGA

## 【図 5 9】

AGGCGGGGAGCAGCTGCAGCTGACCTTGACGCTTGGGGA  
ATGAGACTGGCTCACAACCTGCTTTCTTTCTTACGATTTCCATCTTCTGGGGCTGGGC  
CAGCCCAAGAGCCOCCAAAAGCAAGAGAAAGGGGCAAGGGCGGCTTGGGCCCTTGGGCCCTT  
GGCCCTCAGCGAGTGCCTAGGAGCTGGTGTGACAGGATGAACCGTATGCGCGCATGGAG  
GAGTATGAGAGAACATCAGAGGAGTGGTGGCCAGCTGAGGAACAGCTCAGAGCTGGCC  
CAGAGAAAGTGTGAGGTCACTTGACGCTGTGATGCTCCACAAGAGAGGAGCTGTCTGCC  
TGGGGCTACAGCATCAACACAGACCCCGAGCGTATCCCGTGGACCTCCCGAGAGCAGGG  
TGCCTGTCTGGGCTGTGTGAACCTTCCACATGAGAGAGAGCCGAGCATGGTGGAG  
GTGCGGGTGTTCAGCGAGGTTCTGTGGGCGCGCGGCTTGCCCGCACCCCGCCGACCA  
GGGCTTCCCGCCAGCGCGCATGAGAGACCATCGTGGGCTGACCTGCACTTCTT  
TGAATCACCTGGCCAGAGCCAGGCGAGGCCAGGCCAGGACATCTCTCTGACCTTTGT  
GCCAAGAAAGGCTATGAAAAGTAACACTGACTTTTGAAGCAAG

## 【図 6 0】

MDNPHNLLFLTTISIFLGLQPSPEKSKRRKQGRFGLPARGHOVPLDLVSRMKPYARME  
SYERNIEBVAQLRNSSELAQRKEVNILQWMSNKRSLSPWGSINHDPRIIPVDLPRAR  
CLCLGCVNFTMQEDRSNHSVSPVFSQVFRRLFCPPRPTGFCRQRAVMEITAVGCTCIF

## 【図 6 1】

AGATGGTCAACGACCGGTGGGAAGACCATGGGCGGCGCTGCCCACTTGAGGACCGGCGCG  
GCACAAGCGCAGCGGCGGAGCTGCGGCTACGTGCTGTGCACCGTGTGCTGTGCGCTGG  
CTGTGCTGCTGGCTGTGACTGTGCAC  
GGTGGCTGTCTTCTTCTGAAACACGCCACGCGCGGCGAGCGGCGCCCCCACTGTGCTC  
AGCACTGGGGCTGCGAGCGCCACAGCGGCTTGGTCACTGTGGAAAGGGCGGACAGCTGCG  
CACTCTAGAGATCTCTTATTAACCGCGCGCTGCCCGGACTCTACAGAGACCTTCCAGCGCT  
GAAAGCGCCCAAGCGCGCTGGTGGAGAGCTGACAGAGACCAAGCGCCAGCAGCGCTG  
GTGGCGCACAGGAGCAGAGGCTGCTGGACACGCTGGGCGAGGCTGCGCGCGCTGTGCTG  
GCCCGAGCCTCAGAGCTGCAGACGAGGTGCTAGGGGCTGGGAGGGGACATGGCACGCTG  
GGCCAGGGCTCAGGCGCTGCAGAGTGGAGCGGCGGCTCATCAAGCTTCTCTGTAG  
AGCCAGGGCCACATGGCTCACTGGTGAATCTCGTGCAGGACATCTTGGATGGCTCGAG  
AGGAGCGGGGCTGGCGCGGCGCGGACAGAGGCGGACCTTCAAGAGCGCTGCGCGCTG  
GGAGCCCGGCGCGGGGCTGTGCTCACTGTGCTGGCGCTGCTGGATCTGTGGAGCTGCTC  
CTAAGCGGACAGCAGCAGATGCGCTCTACTCTGTCTTCCACCCACTACCGGCGCGC  
TTCCAGGTGTACTGTGACATGGCACAGGAGGGGCGGCTGGACGCTGTCTCAGCGCGG  
GAGGAGGCTCCGTGAATCTTCTCGGGGCTGGGACGCGTACCGAGACGGCTTTGGCAGG  
CTCACCGGGGAGCAGTGGCTAGGGCTCAAGAGGATCCAGCGCTTACCAACAGAGGCTGCG  
TAGAGCTGCAGCTGACCTGAGAGGATTTGAGAGATGGACAGGCTATGCTGGCTACGG  
AGCTTCCGCGCTGGGCTGTCTTCCGCTGGAGCTCAGGAGAGAGGATACCGCTCAGCGTG  
GCTGACTATTCCGSCATCGACGAGGAGCTCCCTCTGAGAGCAGCGCATGAGGTTCAC  
ACCAAGGACGTGACAGCGGACCATTCAGAGAACACTGTGCGGCTTACCGCGGCTGCC  
TGTGTGTACCGCACTGCCACACTCCACACTCAATGGGAGTACTCTGCGGTGCGCAC  
GCTCTCTATTGCGCAGCGCTGAGAGTGTGCTCTCTGGACCGGCTGGCAACTTGAAGACCC  
TTCTTGAGATATGAGAGCGGCTGGGAGGAGCTGAGAGTGTGTGACCTGTCTCT  
TGGCCTGTGTGCTGCTGCGCGCTCCCGGACCGCCACTCTACTTCTGTGATGTTCT  
TCCACCCACTGTGCTGGGAGGACCACTCTCCAGTAGGAGGGGCGGCGCATCCGTA  
CAGAGAGCTCTTGGGCGGTGAAGTCACACTGCTCTTCCGCTTCCCGACCGGCTCTC  
ATTGGGAGCTCACTGATCTTCTTGGCTTCTGCTGATGGGGCTGGCAACTTGAAGACCC  
AAGCTCTGCTGCGCGCCACTGTGACTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCT  
GGAGTCTGCGCGGAGCACTCTGCGCTGCGCGGCAAAATCCCGGACTATTGGGGAGAG  
AGAGCAGGGGAGCAGCAGCACCTCTGGAGTCTCTTAGCAGATGCTGGGAGTGTGAGCT  
CTCTCAGGCTCAGGCTGAGGCGAGTACTCTCCAGCGCTCCCAATGCGCAACCGCCACCC  
CGTTTCCCTGTGGCCAGAGAACCCACTCTCCGCCAA  
GGGCTCAGCTGTGCTGTGGGCTGGGCTCCCATCTTACAGGCGCTGAGTCAAGAT  
GGGAGCTGCTGTCTTGGGAGCCACGCTCAGAGGCTGAGAGGAGTCTCTCGAGAGGAGC  
CCACCTCTCTCGCGGAGCTGGGGCTGCGAGCTCTTCACTGTCTGTGCGCACCTGCT  
TCTCTGTCTCAATGAGGCCCAACCATCCCGACCGAGCTCCCGCGGCTGCTCTACTCT  
GGGGAGCGCGGGCTGCCATCCCATTTCTCTGCTCTGGAAGTGGGTGGGGCTGTGCA  
CCGTGGGGCTGGAGTGGCTTAATGGGAAGCTCTTGTCTTGGGCTGGGGCTTAGGAG  
GGGTGGAGTGGGCTTGTACACCCCGCCAGCACCAATTTCCAGGAGCTCAGGAGTCTGA  
GGCTCCAGAGTGAAGCCCTTCTCGAGAGGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTG  
GAGGCGAGAGCTTCCATGTACCGCTGGCCACTCGAGCCAGGCGAGCGCGCGCGGAG  
GTGGTCAGGGACAGGAGCACCTCACCGGGCAATGGGCTCGGGGAGCTGGGGCACCA  
GACAGGACCACTGGAGCACTTCTTGTGAATCTCCACACCCAGCAGCGTGTCAAT  
CCCCACTCTTGTGTGCACATGAGAGGTCAGAGGTCAGAGCGGCTCCAGGAGCAGCAGC  
CACAAGGGAGGGCTGGAGCGGAGTCTTCAAGCTGTGCTCAGAGAGCTTGGAGCGGCT  
CGCTTACTGTAGGAGGAGCTTCTTCAAGGCTCTGCTGAGGAGGAGGCTGCG  
AAGGCGCTGGAGTCAAGCTTGGGAGAGCTGCTAGCAGCTCTCTCGCGAGAGAGGAG  
GTGGCTCTCCAAAGGACACCGCATGGAGGTCCTAGGGGCTGTGGGTTCCGTTCTC  
CCTTCCCTCCACTGAAGTTTGTGCTTAAAAAACAATAATTTGACTTGGCACACTGG  
GGGTGTGGGAGAGCGGCTGTGACTGGCTCTCTGTCAGTGCACACAGGTATCATCAC  
ATGCGCAG

## 【図 6 2】

MVNDRWKTMGGAAQLEDRPRKPKRPSQGVYLVCTVLLALAVLLAVRVTVGLVFLNHAP  
GTAPPVSTVGAASANSALVTVBRADSHLSLILDFRCPFLTDSFARLESAGASVLAQAT  
BHQAGPRLVGDGQBELTLLADQLPRLAARSELDTBGMRLKHGTLGQGLSALBSQ  
RLQLLESQGHMHLVNSVSDILDLALQRDLGRPRNKALQRAPARAGTRPBGATGSR  
PRDCLDVLLSGQDDGVVSVFPHYPAFGVQVCMRKTGGGVTFQRREDGVSVFRGND  
AYRDGFRGLTGHWHLKRIHALTTQAAYLEHVDLEDFENGTAIYARGSFVGLFSDVPE  
EDGYLVTVADYSGTAGDSLKHSGMRFTTKDRSDHSEBNKCAAFYRGAWWYRNCHTSNLN  
QVYLRGAHASYADGVNWSWTGWYSLKFSEMKIRPVREDR

## 【図 6 3】

AGTGACTGCAGCTTCTTAGATCCCTCCACTGGTGTCTCTCTTTGCAGGAGCACCGGC  
AGCACAGTGTGTGAGGGGAGGAGGAGCGGCTCTAGCAGTTCCTTGATCTCGCGAGAC  
CACCGGCGCGCGGACAGAGCTGCTCCACAGGCACC  
ATGAGGATCATGCTGCTATTACAGCGATCTTGGGCTTCAGCTAGCTCAGAGCTTGGG  
GCTGTCTGAAGAGACACAGAGAGAGTGGTCTTGGCGGGCGCGCATCAGAGGGAGAT  
CCAGATGCTTACAGCTGCTCCAGAGACTCTTCAAAAGGCCATCACTCTGAGGGATG  
CTCAAGCGCTTGGCGAGCTAGCACAGATCCTAAGGAATCAACATCTCCGAGAAACGT  
GACATGCATGACTCTTTTGTGGGACTTATGGGCAAGAGGAGCGTCCAGCAGAGGAAAG  
ACAGAGCTTTCTTACCTTCAGTGAAGGTTCTCGCGCGCTTCATCCCAATCAGCTTGG  
TCCAGAGAAATGTTTCCCTGGGAACAGAGGAGCAGAGACTTTATAGAACTTCTTACG  
GATGTGATCAAGAGAGCTTCCCGACTTGTGGATCTTCAAGTATCCCGCAGAGAGGAA  
TACGTATCCACTTCCGAGCTTCTGGATGCTATAGGAGAGCTCTTCTCGTGTCCCAAT  
CCCCAGGTGCGCAGCGCTCTGTACCTTCTCTCTCGTGTCTGTGAACAATCTGTGCG  
TGTGACTCTTCTCCATCTTTCTACTAGCGCTGGTGGAAATGCAATGATGAATTC  
CCCCAACCCCAATGGGATGTGACTGTAGAAATACCTAGAGTCTCTGTAGTGTCTTACATTA  
AAAAATAAATGTCTCTTCTTATCTCTGACAAATAAAGGATTTTGATATGAATAAAAAA  
AAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA

## 【図 6 4】

HRIMLLPTAILAFSLAQSPGAVCKEPQEVVPPGGGSKRDPOLVOLLRLPKSHSLRLGL  
LKALQSASTDPKBSPEKRDMDHDFVGLMGKSVQFEGKTGPFVPSVVRPFLPEMLQGL  
SYGKSLCTEDRPL

## 【図 6 5】

CTGACATGGCTGACTCGGAGCAGCTCAGAGCAGGCGAGACTGGGAGACACTTGGGCGG  
GCTTCTGCTGCG  
ATGAGAGCTCTGAGAGCACTCTGCTCTGAGGAAACACAGAGGAGGAGAGAGAGAGAG  
GCTCTGTGTGGAGGAGAACTCAGAGCGGGAGGCGCCCATCTCACTAGAGACACTGAGA  
GATCGCGGCGCTCGCAGGCT  
CTGAATTTCTGCTGCTGTGTCAAAAGATGCTTTTATCTTAACTTTTGTGTTCCCA  
CTTCCGACCCCGGCGTGTATGCTGATCTGACATCTGACATTTGAGAGTGCCATCTCTTGTGGCTG  
ATCACAGAGCTCAACCGCTTCTGCTCTGCTGATGGAGATCAAGTCTGTGCTGCTCT  
GAGGAGGAGGAGCAGGAGGGGTTTCCAGAGAGAACAGTACCTTCAAGAGTGTGCTCT  
TCAAGATGCAAGAGCTATGATGAGGTTTCCAGAGAGAGCTGCTGTGCTGTGCTGCTGCT  
CCGCTCTGGGATATAGAAACCAACCAAGCCTCAGAGTGGCTATCTTCAAAACAGAGTG  
TCTGTATAGAGAGAGTACTGGGTGCTGCTCTTTCAGTAAGGTTATATAATCAACACA  
GACCAAGTTGTGGGACTTGTGCTCAGAAATAGGCGCAGAGTGATCATCTCCGAATTTGGCT  
TGTATACAGTACTATGATGAGTGTGCTGCTGTGTAAGACCTTGGAGCAGAGAGCAATC  
GTACATATTGTCAACAGGCTGATATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGATGCTG  
TGTGGCTGATAGAGAGCTTGTGAGAGAGGCTTCCAGCGAGGCTGAGAGGATGATCATCTCT  
ATGAGCCCTTTGTATGATGACTAGGACAAAGAGGAGGAGAGGATGGAATGAGATCTTA  
TCCCTATATGATGCTGAGAGACTAGGCAAGAGCACTTCAAGAAACCTGTGCTCTGAG  
CCAGAGAGCTGAGGCTCATCTGCTTCAACGATGGGACACAGGTGACCCCAAGGAGGCC  
ATGATAACCATCAAAATATTGTTCAAAATGCTGCTGCTTCTCAAAATGTGAGAGAT  
GCTTATGAGCGCACTCTGATGATGTGGCTATCTCTACTCTCTCTGCTCAATGTTT  
GAGAGGATGAGAGGCTGTGTGTGACAGCTGTGGAGGCGAGGTGGTGTCTTCCAGAGG  
GATTTTGGGCTGTGCTGCTGACACATGAGAGCTTGAAGGCCACATTTTCTCCGCGGTG  
CCTCSACTCTTCAAGGATCTAGGATAAGGTACAAATGAGGCGCAAGCACCCCTTGAAG  
AAGTTCTGTTGAAGCTGCTGCTTTCAGATAAATCAAGAGCTTCAAAAGGTATCAATC  
AGGATATGATGTTTCTGGAGCAAGCTCATCTTTCAGAAAGTCCAGGAGACCTTGGCGAG  
AGGGTTCTGTGAATTTCTCAGGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG  
CAGAGCGAGGAGGCTTCAAAATCTTTCGAGCCCAATGACAGCTGTATGAGAGCTTATACA  
TGCATTTACATTAACCTGGGAGCTGGAGTCAAGTGTGGGCTGCGCTGCTGCTGCTGCTG  
AATTACGTGAGCTGGAAGATGTGGCTGACATGAATCTTACAGTGAATATGAAGGA  
GAGGTCTGACATCAAGGCTCAAAAGCTGTTCAAGGATATCTGAGGAGCCTGAGAGAGCA  
CAGGAGCCCTGGACAGTGTGGCTGGC  
TTCACACAGAGGACATTTGTGCTGGCTCCGAGTGAAGCTTGAAGATCATGACGCTTA  
AAAGAGACATTTTACGCTGGCCAGAGGAGATCATTCACACAGAGAGATAGAAATA  
TCTACACAGGAGTCAACAGTGTACAAATTTTGTATCAGCGGAGAGCTTACGCTCAT  
CCTTAGTAGGAGTGTGGTCTTCCAGACAGATGATCTTCCCTCATTTGCGAGCAGAGCTT  
GGGTGAAGGGCTCTTGAAGGAATGTGCCAAACCAAGTTGTGAAGGAGGACATTTTGA  
AAGACTTGCAGAAATTTGGGAAAGAAAGTGGCTTTAAACTTTTGAACAGGCTCAAGAGCA  
TCTTCTTCTTATCAGAGCAATTTCCATGAAJATGGCTTGTGACACACATTTGAAG  
CAGAGCGAGGAGGCTTCAAAATCTTTCGAGCCCAATGACAGCTGTATGAGACACA  
TCCAGGATTAGAGTAAAGTACTTAAGTACTTCCGCGGCACTGTGCACTGCTGTGAGAA  
AATGAGTATAAAACTATTCTTACATTTGTTTGGCTTTTCCCTCTATTTTTAACTG  
TTAACTTAAAGCCACTAGCTTTTGTATTATATGAGACATATAATGTGAATCTTAGTT  
CCCAATAAATCACTGCTGCTTCTTCCATCTTGGATGTGCTAAATTAAGGCTTCAAGG  
CTACTTTTATCAACTGCTGCTTCTCAAAATCCAGTATGCTGATGCTGCTGCTGCTGCTG  
GATTTCCAGCTTATTAATTTTATGTAAGCAAGTTCAAGGTCAAAGGAGCCCTCTGTG  
CCTCTTCTTGTGTTGTGATAAACAATACTTCCGCAAGCTCTATGCTTATTATCAT  
TCTACTGTTCAACTAAGAGATTTTAAATCTGAAATACTGTTCAATATGATGTTT  
CTAGACCTCCGCAACCACTAAATTTTATTTTATGCTATCACTCATGTGCAATCATAT  
CTATGAGACAAATGTCTCGATGCTCTTCTGGGTAAATTAATTTGTATGATGAGGAGAA  
AGGTTTGTATACACCAACATTTCTTAACTCTGAGTGTGCTTATGATGATGATGATGATG  
AAAAATGGGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG  
CTGAGACTGGGAGTAACTGCTTCCCTACAGTTTGTGCTGAGCTGAGGCTGAGGCTGAGG  
GAGGAGTGTGAGGCTGGGCGGAGTGAACTTTTCCAGTAATGAGGAGAGCTGATATA  
AACTCTCTGAACTGGGACCAAGATCTACAGGCAAGCAGATGCGCCACACAGGCTT

MRRLLVTSLVVVLLWEAGAVPAKVPVKMQVKHWPSEQDPEKAWGARVVEPPEKDDQLV  
VLFPVQKPKLLTTEKPRGQGRGPILPGTKAWMETEDTLGRVLSPEPDHSLYHPPEED  
QGFEPRILVWMPNHOVLGPEEDQDHIYHFO





【图 9 5】

【 図 9 6 】

【図 9 7】

【 図 1 0 1 】

【☒ 1 0 2】

【図 103】

## 【图 9 8】

## 【图 9-9】

【 図 1 0 0 】

【 図 1 0 4 】

## 【图 10

【図 1 0 6】











## 【国際公開パンフレット】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PCT</b><br>WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION<br>International Bureau                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| (51) International Patent Classification :<br><b>C12N 15/12, C07K 14/47, A61K 38/17,<br/>         G01N 33/53, C12Q 1/68, C12N 15/62,<br/>         C07K 16/18</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  | (11) International Publication Number: <b>WO 00/53758</b><br>(43) International Publication Date: 14 September 2000 (14.09.00)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| (21) International Application Number: PCT/US00/05841<br>(22) International Filing Date: 2 March 2000 (02.03.00)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  | (71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| (30) Priority Data:<br>PCT/US99/05028 8 March 1999 (08.03.99) US<br>60/123,618 10 March 1999 (10.03.99) US<br>60/123,957 12 March 1999 (12.03.99) US<br>60/125,775 23 March 1999 (23.03.99) US<br>60/128,849 12 April 1999 (12.04.99) US<br>PCT/US99/08615 20 April 1999 (20.04.99) US<br>60/131,445 28 April 1999 (28.04.99) US<br>60/132,371 4 May 1999 (04.05.99) US<br>60/134,287 14 May 1999 (14.05.99) US<br>PCT/US99/12252 2 June 1999 (02.06.99) US<br>60/141,037 23 June 1999 (23.06.99) US<br>60/144,758 20 July 1999 (20.07.99) US<br>60/145,698 26 July 1999 (26.07.99) US<br>60/146,222 28 July 1999 (28.07.99) US<br>PCT/US99/20111 1 September 1999 (01.09.99) US<br>PCT/US99/20594 8 September 1999 (08.09.99) US<br>PCT/US99/20944 13 September 1999 (13.09.99) US<br>PCT/US99/21090 15 September 1999 (15.09.99) US<br>PCT/US99/21547 15 September 1999 (15.09.99) US<br>PCT/US99/23089 5 October 1999 (05.10.99) US<br>60/162,506 29 October 1999 (29.10.99) US<br>PCT/US99/28214 29 November 1999 (29.11.99) US<br>PCT/US99/28313 30 November 1999 (30.11.99) US<br>PCT/US99/28409 30 November 1999 (30.11.99) US<br>PCT/US99/28301 1 December 1999 (01.12.99) US<br>PCT/US99/28634 1 December 1999 (01.12.99) US<br>PCT/US99/28551 2 December 1999 (02.12.99) US<br>PCT/US99/28564 2 December 1999 (02.12.99) US<br>PCT/US99/28565 2 December 1999 (02.12.99) US<br>PCT/US99/30095 16 December 1999 (16.12.99) US<br>PCT/US99/30999 20 December 1999 (20.12.99) US<br>PCT/US99/31274 30 December 1999 (30.12.99) US<br>PCT/US00/00219 5 January 2000 (05.01.00) US<br>PCT/US00/00277 6 January 2000 (06.01.00) US<br>PCT/US00/00376 6 January 2000 (06.01.00) US<br>PCT/US00/03565 11 February 2000 (11.02.00) US<br>PCT/US00/04341 18 February 2000 (18.02.00) US<br>PCT/US00/04342 18 February 2000 (18.02.00) US<br>PCT/US00/04414 22 February 2000 (22.02.00) US |  | (72) Inventors; and<br>(73) Inventors/Applicants (for US only): ASHKENAZI, Avi, J. [US/US]; 1456 Tarrytown Street, San Mateo, CA 94402 (US); BAKER, Kevin, P. [GB/US]; 14006 Indian Run Drive, Darnestown, MD 20878 (US); GODDARD, Audrey [CA/US]; 110 Congo Street, San Francisco, CA 94131 (US); GURNEY, Austin, L. [US/US]; 1 Debbie Lane, Belmont, CA 94002 (US); HEBERT, Caroline [US/US]; 1809 Vine Street, Berkeley, CA 94703 (US); HENZEL, William [US/US]; 3724 Southwood Drive, San Mateo, CA 94030 (US); KABAKOFF, Rhona, C. [BR/US]; 1084 Granada Drive, Pacifica, CA 94044 (US); LU, Yannel [CN/US]; 1001 Continentals Way #206, Belmont, CA 94002 (US); PAN, James [CA/US]; 2705 Coronet Boulevard, Belmont, CA 94002 (US); PENNICA, Diane [US/US]; 2417 Hale Drive, Burlingame, CA 94010 (US); SHELTON, David, L. [US/US]; 5845 Clover Drive, Oakland, CA 94618 (US); SMITH, Victoria [AU/US]; 19 Dwight Road, Burlingame, CA 94010 (US); STEWART, Timothy, A. [US/US]; 465 Douglass Street, San Francisco, CA 94114 (US); TUMAS, Daniel [US/US]; 3 Rae Court, Orinda, CA 94563 (US); WATANABE, Colin, K. [US/US]; 128 Corliss Drive, Moraga, CA 94556 (US); WOOD, William, F. [US/US]; 35 Southdown Court, Hillsborough, CA 94010 (US); YAN, Minhong [CN/US]; 1910 Garden Drive #114, Burlingame, CA 94010 (US).<br>(74) Agents: SVOBODA, Craig, G. et al.; Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).<br>(81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).<br>Published<br>Without international search report and to be republished upon receipt of that report. |
| (54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF IMMUNE RELATED DISEASES<br>(57) Abstract<br>The present invention relates to a composition containing novel proteins and methods for the diagnosis and treatment of immune related diseases.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

## FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

|    |                          |    |                                       |    |                                           |    |                          |
|----|--------------------------|----|---------------------------------------|----|-------------------------------------------|----|--------------------------|
| AL | Albania                  | ES | Spain                                 | LS | Lesotho                                   | SI | Slovenia                 |
| AM | Armenia                  | FI | Finland                               | LT | Lithuania                                 | SK | Slovakia                 |
| AT | Austria                  | FR | France                                | LU | Luxembourg                                | SN | Senegal                  |
| AU | Australia                | GA | Gabon                                 | LV | Latvia                                    | SZ | Swaziland                |
| AZ | Azerbaijan               | GB | United Kingdom                        | MC | Monaco                                    | TD | Chad                     |
| BA | Bosnia and Herzegovina   | GE | Georgia                               | MD | Republic of Moldova                       | TG | Togo                     |
| BB | Barbados                 | GH | Ghana                                 | MG | Madagascar                                | TJ | Tajikistan               |
| BE | Belgium                  | GN | Guinea                                | MK | The former Yugoslav Republic of Macedonia | TM | Turkmenistan             |
| BF | Burkina Faso             | GR | Greece                                | ML | Mali                                      | TR | Turkey                   |
| BG | Bulgaria                 | HU | Hungary                               | MN | Mongolia                                  | TT | Trinidad and Tobago      |
| BJ | Benin                    | IE | Ireland                               | MR | Mauritania                                | UA | Ukraine                  |
| BR | Brazil                   | IL | Israel                                | MW | Malawi                                    | UG | Uganda                   |
| BY | Belarus                  | IS | Iceland                               | MX | Mexico                                    | US | United States of America |
| CA | Canada                   | IT | Italy                                 | NE | Niger                                     | UZ | Uzbekistan               |
| CF | Central African Republic | JP | Japan                                 | NL | Netherlands                               | VN | Viet Nam                 |
| CG | Congo                    | KE | Kenya                                 | NO | Norway                                    | YU | Yugoslavia               |
| CH | Switzerland              | KG | Kyrgyzstan                            | NZ | New Zealand                               | ZW | Zimbabwe                 |
| CI | Côte d'Ivoire            | KP | Democratic People's Republic of Korea | PL | Poland                                    |    |                          |
| CM | Cameroon                 | KR | Republic of Korea                     | PT | Portugal                                  |    |                          |
| CN | China                    | KZ | Kazakhstan                            | RO | Romania                                   |    |                          |
| CU | Cuba                     | LC | Saint Lucia                           | RU | Russian Federation                        |    |                          |
| CZ | Czech Republic           | LI | Liechtenstein                         | SD | Sudan                                     |    |                          |
| DE | Germany                  | LK | Sri Lanka                             | SE | Sweden                                    |    |                          |
| DK | Denmark                  | LR | Liberia                               | SG | Singapore                                 |    |                          |
| EE | Estonia                  |    |                                       |    |                                           |    |                          |

WO 00/53758

PCT/US00/05841

## COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF IMMUNE RELATED DISEASES

Field of the Invention

5 The present invention relates to compositions and methods for the diagnosis and treatment of immune related diseases.

Background of the Invention

10 Immune related and inflammatory diseases are the manifestation or consequence of fairly complex, often multiple interconnected biological pathways which in normal physiology are critical to respond to insult or injury, initiate repair from insult or injury, and mount innate and acquired defense against foreign organisms. Disease or pathology occurs when these normal physiological pathways cause additional insult or injury either as directly related to the intensity of the response, as a consequence of abnormal regulation or excessive stimulation, as a reaction to self, or as a combination of these.

15 Though the genesis of these diseases often involves multistep pathways and often multiple different biological systems/pathways, intervention at critical points in one or more of these pathways can have an ameliorative or therapeutic effect. Therapeutic intervention can occur by either antagonism of a detrimental process/pathway or stimulation of a beneficial process/pathway.

20 Many immune related diseases are known and have been extensively studied. Such diseases include immune-mediated inflammatory diseases, non-immune-mediated inflammatory diseases, infectious diseases, immunodeficiency diseases, neoplasia, etc.

T lymphocytes (T cells) are an important component of a mammalian immune response. T cells recognize antigens which are associated with a self-molecule encoded by genes within the major histocompatibility complex (MHC). The antigen may be displayed together with MHC molecules on the surface of antigen presenting cells, virus infected cells, cancer cells, grafts, etc. The T cell system eliminates these altered cells which pose a health threat to the host mammal. T cells include helper T cells and cytotoxic T cells. Helper T cells proliferate extensively following recognition of an antigen-MHC complex on an antigen presenting cell. Helper T cells also secrete a variety of cytokines, i.e., lymphokines, which play a central role in the activation of B cells, cytotoxic T cells and a variety of other cells which participate in the immune response.

30 A central event in both humoral and cell mediated immune responses is the activation and clonal expansion of helper T cells. Helper T cell activation is initiated by the interaction of the T cell receptor (TCR) - CD3 complex with an antigen-MHC on the surface of an antigen presenting cell. This interaction mediates a cascade of biochemical events that induce the resting helper T cell to enter a cell cycle (the G0 to G1 transition) and results in the expression of a high affinity receptor for IL-2 and sometimes IL-4. The activated T cell progresses through the cycle proliferating and differentiating into memory cells or effector cells.

35 In addition to the signals mediated through the TCR, activation of T cells involves additional costimulation induced by cytokines released by the antigen presenting cell or through interactions with membrane bound molecules on the antigen presenting cell and the T cell. The cytokines IL-1 and IL-6 have been shown to provide a costimulatory signal. Also, the interaction between the B7 molecule expressed on the

WO 00/53758

PCT/US00/05841

surface of an antigen presenting cell and CD28 and CTLA-4 molecules expressed on the T cell surface effect T cell activation. Activated T cells express an increased number of cellular adhesion molecules, such as ICAM-1, integrins, VLA-4, LFA-1, CD56, etc.

5 T-cell proliferation in a mixed lymphocyte culture or mixed lymphocyte reaction (MLR) is an established indication of the ability of a compound to stimulate the immune system. In many immune responses, inflammatory cells infiltrate the site of injury or infection. The migrating cells may be neutrophilic, eosinophilic, monocytic or lymphocytic as can be determined by histologic examination of the affected tissues. Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

10 Immune related diseases can be treated by suppressing the immune response. Using neutralizing antibodies that inhibit molecules having immune stimulatory activity would be beneficial in the treatment of immune-mediated and inflammatory diseases. Molecules which inhibit the immune response can be utilized (proteins directly or via the use of antibody agonists) to inhibit the immune response and thus ameliorate immune related disease.

#### 15 Summary of the Invention

The present invention concerns compositions and methods for the diagnosis and treatment of immune related disease in mammals, including humans. The present invention is based on the identification of proteins (including agonist and antagonist antibodies) which either stimulate or inhibit the immune response in mammals. Immune related diseases can be treated by suppressing or enhancing the immune response.

20 Molecules that enhance the immune response stimulate or potentiate the immune response to an antigen. Molecules which stimulate the immune response can be used therapeutically where enhancement of the immune response would be beneficial. Such stimulatory molecules can also be inhibited where suppression of the immune response would be of value.

Neutralizing antibodies are examples of molecules that inhibit molecules having immune stimulatory activity and which would be beneficial in the treatment of immune related and inflammatory diseases. Molecules which inhibit the immune response can also be utilized (proteins directly or via the use of antibody agonists) to inhibit the immune response and thus ameliorate immune related disease.

Accordingly, the PRO polypeptides and anti-PRO antibodies and fragments thereof are useful for the diagnosis and/or treatment (including prevention) of immune related diseases. Antibodies which bind to stimulatory proteins are useful to suppress the immune system and the immune response. Antibodies which bind to inhibitory proteins are useful to stimulate the immune system and the immune response. The PRO polypeptides and anti-PRO antibodies also useful to prepare medicines and medicaments for the treatment of immune related and inflammatory diseases.

35 In one embodiment, the invention provides for isolated nucleic acid molecules comprising nucleotide sequences that encodes a PRO polypeptide.

In one aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about

40

WO 00/53758

PCT/US00/05841

87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule encoding a PRO polypeptide having a full-length amino acid sequence as disclosed herein, an amino acid sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a transmembrane protein, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In other aspects, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule comprising the coding sequence of a full-length PRO polypeptide cDNA as disclosed herein, the coding sequence of a PRO polypeptide lacking the signal peptide as disclosed herein, the coding sequence of an extracellular domain of a transmembrane PRO polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or the coding sequence of any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In a further aspect, the invention concerns an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule comprising the coding sequence of a full-length PRO polypeptide cDNA as disclosed herein, the coding sequence of a PRO polypeptide lacking the signal peptide as disclosed herein, the coding sequence of an extracellular domain of a transmembrane PRO polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or the coding sequence of any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

WO 00/53758

PCT/US00/05841

alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule that encodes the same mature polypeptide encoded by any of the human protein cDNAs deposited with the ATCC as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In another aspect, the invention provides for isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding a PRO polypeptide with is either transmembrane domain-deleted or transmembrane domain-inactivated, or is complementary to such encoding nucleotide sequence, wherein the transmembrane domain(s) of such polypeptides are disclosed herein. Therefore, soluble extracellular domains of the herein described PRO polypeptides are contemplated.

Another embodiment is directed to fragments of a PRO polypeptide coding sequence, or the complement thereof, that may find use as, for example, hybridization probes, for encoding fragments of a PRO polypeptide that may optionally encode a polypeptide comprising a binding site for an anti-PRO polypeptide antibody or as antisense oligonucleotide probes. Such nucleic acid fragments are usually at least about 20 nucleotides in length, alternatively at least about 30 nucleotides in length, alternatively at least about 40 nucleotides in length, alternatively at least about 50 nucleotides in length, alternatively at least about 60 nucleotides in length, alternatively at least about 70 nucleotides in length, alternatively at least about 80 nucleotides in length, alternatively at least about 90 nucleotides in length, alternatively at least about 100 nucleotides in length, alternatively at least about 110 nucleotides in length, alternatively at least about 120 nucleotides in length, alternatively at least about 130 nucleotides in length, alternatively at least about 140 nucleotides in length, alternatively at least about 150 nucleotides in length, alternatively at least about 160 nucleotides in length, alternatively at least about 170 nucleotides in length, alternatively at least about 180 nucleotides in length, alternatively at least about 190 nucleotides in length, alternatively at least about 200 nucleotides in length, alternatively at least about 250 nucleotides in length, alternatively at least about 300 nucleotides in length, alternatively at least about 350 nucleotides in length, alternatively at least about 400 nucleotides in length, alternatively at least about 450 nucleotides in length, alternatively at least about 500 nucleotides in length, alternatively at least about 600 nucleotides in length, alternatively at least about 700 nucleotides in length, alternatively at least about 800 nucleotides in length, alternatively at least about 900 nucleotides in length, alternatively at least about 1000 nucleotides in length, alternatively at least about 1500 nucleotide in length, alternatively at least about 2000 nucleotides in length, alternatively at least about 2500 nucleotide in length, alternatively at least about 3000 nucleotide in length, alternatively at least about 4000 nucleotide in length, alternatively at least about 5000 nucleotides in length, or more, wherein in this context the term "about" means the referenced nucleotide sequence length plus or minus 10% of that referenced length. It is noted that novel fragments of a nucleotide sequence encoding the respective PRO polypeptide may be determined in a routine manner by aligning the respective nucleotide encoding a PRO polypeptide with other known nucleotide sequences using any of a number of well known sequence alignment programs and determining which nucleotide sequence fragment(s) are novel. All such nucleotide sequences encoding the respective PRO polypeptides are contemplated herein. Also contemplated are the nucleotide molecules which encode fragments of the PRO polypeptides, preferably those polypeptide fragments that comprise a binding site for an anti-PRO polypeptide antibody.



WO 00/53758

PCT/US00/05841

In another embodiment, the invention provides isolated PRO polypeptides encoded by any of the isolated nucleic acid sequences hereinabove identified.

In a certain aspect, the invention concerns an isolated PRO polypeptide, comprising an amino acid sequence having at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81% amino acid sequence identity, alternatively at least about 82% amino acid sequence identity, alternatively at least about 83% amino acid sequence identity, alternatively at least about 84% amino acid sequence identity, alternatively at least about 85% amino acid sequence identity, alternatively at least about 86% amino acid sequence identity, alternatively at least about 87% amino acid sequence identity, alternatively at least about 88% amino acid sequence identity, alternatively at least about 89% amino acid sequence identity, alternatively at least about 90% amino acid sequence identity, alternatively at least about 91% amino acid sequence identity, alternatively at least about 92% amino acid sequence identity, alternatively at least about 93% amino acid sequence identity, alternatively at least about 94% amino acid sequence identity, alternatively at least about 95% amino acid sequence identity, alternatively at least about 96% amino acid sequence identity, alternatively at least about 97% amino acid sequence identity, alternatively at least about 98% amino acid sequence identity, alternatively at least about 99% amino acid sequence identity to a PRO polypeptide having a full-length amino acid sequence as disclosed herein, an amino acid sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a transmembrane protein, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein.

In a further aspect, the invention concerns an isolated PRO polypeptide comprising an amino acid sequence having at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81% amino acid sequence identity, alternatively at least about 82% amino acid sequence identity, alternatively at least about 83% amino acid sequence identity, alternatively at least about 84% amino acid sequence identity, alternatively at least about 85% amino acid sequence identity, alternatively at least about 86% amino acid sequence identity, alternatively at least about 87% amino acid sequence identity, alternatively at least about 88% amino acid sequence identity, alternatively at least about 89% amino acid sequence identity, alternatively at least about 90% amino acid sequence identity, alternatively at least about 91% amino acid sequence identity, alternatively at least about 92% amino acid sequence identity, alternatively at least about 93% amino acid sequence identity, alternatively at least about 94% amino acid sequence identity, alternatively at least about 95% amino acid sequence identity, alternatively at least about 96% amino acid sequence identity, alternatively at least about 97% amino acid sequence identity, alternatively at least about 98% amino acid sequence identity, alternatively at least about 99% amino acid sequence identity to an amino acid sequence encoded by any of the human protein cDNAs deposited with the ATCC as disclosed herein.

In a further aspect, the invention concerns an isolated PRO polypeptide comprising an amino acid sequence scoring at least about 80% positives, alternatively at least about 81% positives, alternatively at least about 82% positives, alternatively at least about 83% positives, alternatively at least about 84% positives, alternatively at least about 85% positives, alternatively at least about 86% positives, alternatively at least about 87% positives, alternatively at least about 88% positives, alternatively at least about 89% positives, alternatively at least about 90% positives, alternatively at least about 91% positives, alternatively at least about 92% positives, alternatively at least about 93% positives, alternatively at least about 94% positives, alternatively at least about 95% positives, alternatively at least about 96% positives, alternatively at least about 97% positives, alternatively at least about 98% positives, alternatively at least about 99% positives to an amino acid sequence encoded by any of the human protein cDNAs deposited with the ATCC as disclosed herein.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

97% positives, alternatively at least about 98% positives, alternatively at least about 99% positives when compared with the amino acid sequence of a PRO polypeptide having a full-length amino acid sequence as disclosed herein, an amino acid sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a transmembrane protein, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein.

In a specific aspect, the invention provides an isolated PRO polypeptide without the N-terminal signal sequence and/or the initiating methionine and is encoded by a nucleotide sequence that encodes such an amino acid sequence as hereinbefore described. Processes for producing the same are also herein described, wherein those processes comprise culturing a host cell comprising a vector which comprises the appropriate encoding nucleic acid molecule under conditions suitable for expression of the PRO polypeptide and recovering the same from the cell culture.

In another aspect, the invention provides an isolated PRO polypeptide which is either transmembrane-deleted or transmembrane domain-inactivated. Processes for producing the same are also herein described, wherein those processes comprise culturing a host cell comprising a vector which comprises the appropriate encoding nucleic acid molecule under conditions suitable for expression of the PRO polypeptide and recovering the PRO polypeptide from the cell culture.

In another embodiment, the invention provides vectors comprising DNA encoding any of the PRO polypeptides. Host cells comprising any such vector are also provided. By way of example, the host cells may be CHO cells, *E. coli* or yeast. A process for producing any of the herein described polypeptides is further provided and comprises culturing host cells under conditions suitable for expression of the desired polypeptides and recovering the desired polypeptide from the cell culture.

In other embodiments, the invention provides chimeric molecules comprising any of the herein described polypeptides fused to a heterologous polypeptide or amino acid sequence. Examples of such chimeric molecules comprise any of the herein described polypeptides fused to an epitope tag sequence or a Fc region of an immunoglobulin.

In yet other embodiments, the invention provides oligonucleotide probes useful for isolating genomic and cDNA nucleotide sequences or as antisense probes, wherein those probes may be derived from any of the above or below described nucleotide sequences.

In yet another embodiment, the invention concerns agonists and antagonists of the PRO polypeptides, that mimic or inhibit one or more functions or activities of the PRO polypeptides. In a particular embodiment, the agonist or antagonist is an antibody that binds to the PRO polypeptides or a small molecule.

In another embodiment, the invention provides an antibody which specifically binds to any of the above or below described polypeptides. Optionally, the antibody is a monoclonal antibody, humanized antibody, antibody fragment or single-chain antibody. In one aspect, the present invention concerns an isolated antibody which binds a PRO polypeptide. In another aspect, the antibody mimics the activity of a PRO polypeptide (an agonist antibody) or conversely the antibody inhibits or neutralizes the activity of a PRO polypeptide (an antagonist antibody). In another aspect, the antibody is a monoclonal antibody, which preferably has nonhuman complementarity determining region (CDR) residues and human framework region (FR) residues. The antibody may be labeled and may be immobilized on a solid support. In a further aspect, the antibody is an antibody fragment, a monoclonal antibody, a single-chain antibody, or an anti-idiotypic

WO 00/53758

PCT/US00/05841

antibody.

In a further embodiment, the invention concerns a method of identifying agonists or antagonists to a PRO polypeptide which comprises contacting the PRO polypeptide with a candidate molecule and monitoring a biological activity mediated by said PRO polypeptide. Preferably, the PRO polypeptide is a native sequence PRO polypeptide.

In another embodiment, the invention concerns a composition of matter containing PRO polypeptide or an agonist or antagonist antibody which binds the polypeptide in admixture with a carrier or excipient. In one aspect, the composition contains a therapeutically effective amount of the peptide or antibody. In another aspect, when the composition contains an immune stimulating molecule, the composition is useful for: (a) increasing infiltration of inflammatory cells into a tissue of a mammal in need thereof, (b) stimulating or enhancing an immune response in a mammal in need thereof, or (c) increasing the proliferation of T-lymphocytes in a mammal in need thereof in response to an antigen. In a further aspect, when the composition contains an immune inhibiting molecule, the composition is useful for: (a) decreasing infiltration of inflammatory cells into a tissue of a mammal in need thereof, (b) inhibiting or reducing an immune response in a mammal in need thereof, or (c) decreasing the proliferation of T-lymphocytes in a mammal in need thereof in response to an antigen. In another aspect, the composition contains a further active ingredient, which may, for example, be a further antibody or a cytotoxic or chemotherapeutic agent. Preferably, the composition is sterile.

In another embodiment, the invention concerns the use of the polypeptides and antibodies of the invention to prepare a composition or medicament which has the uses described above.

In a further embodiment, the invention concerns nucleic acid encoding an anti-PRO200, anti-PRO204, anti-PRO212, anti-PRO216, anti-PRO226, anti-PRO240, anti-PRO235, anti-PRO245, anti-PRO172, anti-PRO273, anti-PRO272, anti-PRO332, anti-PRO526, anti-PRO701, anti-PRO361, anti-PRO362, anti-PRO363, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO531, anti-PRO533, anti-PRO1083, anti-PRO865, anti-PRO770, anti-PRO769, anti-PRO788, anti-PRO1114, anti-PRO1007, anti-PRO1184, anti-PRO1031, anti-PRO1346, anti-PRO1155, anti-PRO1250, anti-PRO1312, anti-PRO1192, anti-PRO1246, anti-PRO1283, anti-PRO1195, anti-PRO1343, anti-PRO1418, anti-PRO1387, anti-PRO1410, anti-PRO1917, anti-PRO1868, anti-PRO205, anti-PRO21, anti-PRO269, anti-PRO344, anti-PRO333, anti-PRO381, anti-PRO720, anti-PRO866, anti-PRO840, anti-PRO982, anti-PRO836, anti-PRO1159, anti-PRO1358, anti-PRO1325, anti-PRO1338, anti-PRO1434, anti-PRO4333, anti-PRO4302, anti-PRO4430 or anti-PRO5727 antibody, and vectors and recombinant host cells comprising such nucleic acid. In a still further embodiment, the invention concerns a method for producing such an antibody by culturing a host cell transformed with nucleic acid encoding the antibody under conditions such that the antibody is expressed, and recovering the antibody from the cell culture.

In a further embodiment, the invention concerns an isolated nucleic acid molecule that hybridizes to the a nucleic acid molecule encoding a PRO polypeptide, or the complement thereof. The nucleic acid preferably is DNA, and hybridization preferably occurs under stringent conditions. Such nucleic acid molecules can act as antisense molecules of the amplified genes identified herein, which, in turn, can find use in the modulation of the respective amplified genes, or as antisense primers in amplification reactions. Furthermore, such sequences can be used as part of ribozyme and/or triple helix sequence which, in turn, may be used in regulation of the amplified genes.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

In another embodiment, the invention concerns a method for determining the presence of a PRO polypeptide comprising exposing a cell suspected of containing and/or expressing the polypeptide to an anti-PRO200, anti-PRO204, anti-PRO212, anti-PRO216, anti-PRO226, anti-PRO240, anti-PRO235, anti-PRO245, anti-PRO172, anti-PRO273, anti-PRO272, anti-PRO332, anti-PRO526, anti-PRO701, anti-PRO361, anti-PRO362, anti-PRO363, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO531, anti-PRO533, anti-PRO1083, anti-PRO865, anti-PRO770, anti-PRO769, anti-PRO788, anti-PRO1114, anti-PRO1007, anti-PRO1184, anti-PRO1031, anti-PRO1346, anti-PRO1155, anti-PRO1250, anti-PRO1312, anti-PRO1192, anti-PRO1246, anti-PRO1283, anti-PRO1195, anti-PRO1343, anti-PRO1418, anti-PRO1387, anti-PRO1410, anti-PRO1917, anti-PRO1868, anti-PRO205, anti-PRO21, anti-PRO269, anti-PRO344, anti-PRO333, anti-PRO381, anti-PRO720, anti-PRO866, anti-PRO840, anti-PRO982, anti-PRO836, anti-PRO1159, anti-PRO1358, anti-PRO1325, anti-PRO1338, anti-PRO1434, anti-PRO4333, anti-PRO4302, anti-PRO4430 or anti-PRO5727 antibody and determining binding of the antibody to the cell.

In yet another embodiment, the present invention concerns a method of diagnosing an immune related disease in a mammal, comprising detecting the level of expression of a gene encoding a PRO polypeptide (a) in a test sample of tissue cells obtained from the mammal, and (b) in a control sample of known normal tissue cells of the same cell type, wherein a higher or lower expression level in the test sample as compared to the control sample indicates the presence of immune related disease in the mammal from which the test tissue cells were obtained.

In another embodiment, the present invention concerns a method of diagnosing an immune disease in a mammal, comprising (a) contacting an anti-PRO polypeptide antibody with a test sample of tissue cells obtained from the mammal, and (b) detecting the formation of a complex between the antibody and the respective PRO polypeptide, respectively, in the test sample; wherein the formation of said complex is indicative of the presence or absence of said disease. The detection may be qualitative or quantitative, and may be performed in comparison with monitoring the complex formation in a control sample of known normal tissue cells of the same cell type. A larger quantity of complexes formed in the test sample indicates the presence or absence of an immune disease in the mammal from which the test tissue cells were obtained. The antibody preferably carries a detectable label. Complex formation can be monitored, for example, by light microscopy, flow cytometry, fluorimetry, or other techniques known in the art. The test sample is usually obtained from an individual suspected of having a deficiency or abnormality of the immune system.

In another embodiment, the present invention concerns a diagnostic kit, containing an anti-PRO200, anti-PRO204, anti-PRO212, anti-PRO216, anti-PRO226, anti-PRO240, anti-PRO235, anti-PRO245, anti-PRO172, anti-PRO273, anti-PRO272, anti-PRO332, anti-PRO526, anti-PRO701, anti-PRO361, anti-PRO362, anti-PRO363, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO531, anti-PRO533, anti-PRO1083, anti-PRO865, anti-PRO770, anti-PRO769, anti-PRO788, anti-PRO1114, anti-PRO1007, anti-PRO1184, anti-PRO1031, anti-PRO1346, anti-PRO1155, anti-PRO1250, anti-PRO1312, anti-PRO1192, anti-PRO1246, anti-PRO1283, anti-PRO1195, anti-PRO1343, anti-PRO1418, anti-PRO1387, anti-PRO1410, anti-PRO1917, anti-PRO1868, anti-PRO205, anti-PRO21, anti-PRO269, anti-PRO344, anti-PRO333, anti-PRO381, anti-PRO720, anti-PRO866, anti-PRO840, anti-PRO982, anti-PRO836, anti-PRO1159, anti-PRO1358, anti-PRO1325, anti-PRO1338, anti-PRO1434, anti-PRO4333, anti-PRO4302, anti-PRO4430 or anti-PRO5727 antibody and a carrier (e.g., a buffer) in suitable packaging. The kit preferably contains instructions for using the antibody to detect the PRO

WO 00/53758

PCT/US00/05841

polypeptide.

In a further embodiment, the invention concerns an article of manufacture, comprising:

a container;

an instruction on the container; and

5 a composition comprising an active agent contained within the container; wherein the composition is effective for stimulating or inhibiting an immune response in a mammal, the instruction on the container indicates that the composition can be used to treat an immune related disease, and the active agent in the composition is an agent stimulating or inhibiting the expression and/or activity of the PRO polypeptide. In a preferred aspect, the active agent is a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, 10 PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, 15 PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727 polypeptide or an anti-PRO200, anti-PRO204, anti-PRO212, anti-PRO216, anti-PRO226, anti-PRO240, anti-PRO235, anti-PRO245, anti-PRO172, anti-PRO273, anti-PRO272, anti-PRO332, anti-PRO526, anti-PRO701, anti-PRO361, anti-PRO362, anti-PRO363, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO531, anti-PRO533, anti-PRO1083, anti-PRO865, anti-PRO770, anti-PRO769, anti-PRO788, anti-PRO1114, anti-PRO1007, anti-PRO1184, anti-PRO1031, anti-PRO1346, 20 anti-PRO1155, anti-PRO1250, anti-PRO1312, anti-PRO1192, anti-PRO1246, anti-PRO1283, anti-PRO1195, anti-PRO1343, anti-PRO1418, anti-PRO1387, anti-PRO1410, anti-PRO1917, anti-PRO1868, anti-PRO205, anti-PRO21, anti-PRO269, anti-PRO344, anti-PRO333, anti-PRO381, anti-PRO720, anti-PRO866, anti-PRO840, anti-PRO982, anti-PRO836, anti-PRO1159, anti-PRO1358, anti-PRO1325, anti-PRO1338, anti-PRO1434, anti-PRO4333, anti-PRO4302, anti-PRO4430 or anti-PRO5727 antibody.

25 A further embodiment is a method for identifying a compound capable of inhibiting the expression and/or activity of a PRO polypeptide by contacting a candidate compound with a PRO polypeptide under conditions and for a time sufficient to allow these two components to interact. In a specific aspect, either the candidate compound or the PRO polypeptide is immobilized on a solid support. In another aspect, the non-immobilized component carries a detectable label.

30 Another embodiment of the present invention is directed to the use of a PRO polypeptide, or an agonist or antagonist thereof as hereinbefore described, or an anti-PRO antibody, for the preparation of a medicament useful in the treatment of a condition which is responsive to the PRO polypeptide, an agonist or antagonist thereof or an anti-PRO antibody.

#### 35 Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows DNA29101-1276 (SEQ ID NO:1).

Figure 2 shows the native sequence PRO200 polypeptide UNQ174 (SEQ ID NO:2).

Figure 3 shows DNA30871-1157 (SEQ ID NO:11).

Figure 4 shows the native sequence partial length PRO204 polypeptide UNQ178 (SEQ ID NO:12).

40 Figure 5 shows DNA30942-1134 (SEQ ID NO:13).

WO 00/53758

PCT/US00/05841

- Figure 6 shows the native sequence PRO212 polypeptide UNQ186 (SEQ ID NO:14).  
Figure 7 shows DNA33087-1158 (SEQ ID NO:18).  
Figure 8 shows the native sequence PRO216 polypeptide UNQ190 (SEQ ID NO:19).  
Figure 9 shows DNA33460-1166 (SEQ ID NO:20).  
5 Figure 10 shows the native sequence PRO226 polypeptide UNQ200 (SEQ ID NO:21).  
Figure 11 shows DNA34387-1138 (SEQ ID NO:25).  
Figure 12 shows the native sequence PRO240 polypeptide UNQ214 (SEQ ID NO:26).  
Figure 13 shows DNA35558-1167 (SEQ ID NO:30).  
Figure 14 shows the native sequence PRO235 polypeptide UNQ209 (SEQ ID NO:31).  
10 Figure 15 shows DNA35638-1141 (SEQ ID NO:35).  
Figure 16 shows the native sequence PRO245 polypeptide UNQ219 (SEQ ID NO:36).  
Figure 17 shows DNA35916-1161 (SEQ ID NO:40).  
Figure 18 shows the native sequence PRO172 polypeptide UNQ146 (SEQ ID NO:41).  
Figure 19 shows DNA39523-1192 (SEQ ID NO:45).  
15 Figure 20 shows the native sequence PRO273 polypeptide UNQ240 (SEQ ID NO:46).  
Figure 21 shows DNA40620-1183 (SEQ ID NO:50).  
Figure 22 shows the native sequence PRO272 polypeptide UNQ239 (SEQ ID NO:51).  
Figure 23 shows DNA40982-1235 (SEQ ID NO:56).  
Figure 24 shows the native sequence PRO332 polypeptide UNQ293 (SEQ ID NO:57).  
20 Figure 25 shows DNA44184-1319 (SEQ ID NO:61).  
Figure 26 shows the native sequence PRO526 polypeptide UNQ330 (SEQ ID NO:62).  
Figure 27 shows DNA44205-1285 (SEQ ID NO:66).  
Figure 28 shows the native sequence PRO701 polypeptide UNQ365 (SEQ ID NO:67).  
Figure 29 shows DNA45410-1250 (SEQ ID NO:71).  
25 Figure 30 shows the native sequence PRO361 polypeptide UNQ316 (SEQ ID NO:72).  
Figure 31 shows DNA45416-1251 (SEQ ID NO:79).  
Figure 32 shows the native sequence PRO362 polypeptide UNQ317 (SEQ ID NO:80).  
Figure 33 shows DNA45419-1252 (SEQ ID NO:86).  
Figure 34 shows the native sequence PRO363 polypeptide UNQ318 (SEQ ID NO:87).  
30 Figure 35 shows DNA47365-1206 (SEQ ID NO:91).  
Figure 36 shows the native sequence PRO364 polypeptide UNQ319 (SEQ ID NO:92).  
Figure 37 shows DNA47470-1130 (SEQ ID NO:101).  
Figure 38 shows the native sequence PRO356 polypeptide UNQ313 (SEQ ID NO:102).  
Figure 39 shows DNA48314-1320 (SEQ ID NO:106).  
35 Figure 40 shows the native sequence PRO531 polypeptide UNQ332 (SEQ ID NO:107).  
Figure 41 shows DNA49435-1219 (SEQ ID NO:111).  
Figure 42 shows the native sequence PRO533 polypeptide UNQ334 (SEQ ID NO:112).  
Figure 43 shows DNA50921-1458 (SEQ ID NO:116).  
Figure 44 shows the native sequence PRO1083 polypeptide UNQ540 (SEQ ID NO:117).  
40 Figure 45 shows DNA53974-1401 (SEQ ID NO:123).

WO 00/53758

PCT/US00/05841

- Figure 46 shows the native sequence PRO865 polypeptide UNQ434 (SEQ ID NO:124).  
 Figure 47 shows DNA54228-1366 (SEQ ID NO:133).  
 Figure 48 shows the native sequence PRO770 polypeptide UNQ408 (SEQ ID NO:134).  
 Figure 49 shows DNA54231-1366 (SEQ ID NO:139).  
 5 Figure 50 shows the native sequence PRO769 polypeptide UNQ407 (SEQ ID NO:140).  
 Figure 51 shows DNA56405-1357 (SEQ ID NO:141).  
 Figure 52 shows the native sequence PRO788 polypeptide UNQ430 (SEQ ID NO:142).  
 Figure 53 shows DNA57033-1403 (SEQ ID NO:143).  
 Figure 54 shows the native sequence PRO1114 polypeptide UNQ557 (SEQ ID NO:144).  
 10 Figure 55 shows DNA57690-1374 (SEQ ID NO:145).  
 Figure 56 shows the native sequence PRO1007 polypeptide UNQ491 (SEQ ID NO:146).  
 Figure 57 shows DNA59220-1514 (SEQ ID NO:147).  
 Figure 58 shows the native sequence PRO1184 polypeptide UNQ598 (SEQ ID NO:148).  
 Figure 59 shows DNA59294-1381 (SEQ ID NO:149).  
 15 Figure 60 shows the native sequence PRO1031 polypeptide UNQ516 (SEQ ID NO:150).  
 Figure 61 shows DNA59776-1600 (SEQ ID NO:151).  
 Figure 62 shows the native sequence PRO1346 polypeptide UNQ701 (SEQ ID NO:152).  
 Figure 63 shows DNA59849-1504 (SEQ ID NO:156).  
 Figure 64 shows the native sequence PRO1155 polypeptide UNQ585 (SEQ ID NO:157).  
 20 Figure 65 shows DNA60775-1532 (SEQ ID NO:158).  
 Figure 66 shows the native sequence PRO1250 polypeptide UNQ633 (SEQ ID NO:159).  
 Figure 67 shows DNA61873-1574 (SEQ ID NO:160).  
 Figure 68 shows the native sequence PRO1312 polypeptide UNQ678 (SEQ ID NO:161).  
 Figure 69 shows DNA62814-1521 (SEQ ID NO:162).  
 25 Figure 70 shows the native sequence PRO1192 polypeptide UNQ606 (SEQ ID NO:163).  
 Figure 71 shows DNA64885-1529 (SEQ ID NO:167).  
 Figure 72 shows the native sequence PRO1246 polypeptide UNQ630 (SEQ ID NO:168).  
 Figure 73 shows DNA65404-1551 (SEQ ID NO:169).  
 Figure 74 shows the native sequence PRO1283 polypeptide UNQ653 (SEQ ID NO:170).  
 30 Figure 75 shows DNA65412-1523 (SEQ ID NO:177).  
 Figure 76 shows the native sequence PRO1195 polypeptide UNQ608 (SEQ ID NO:178).  
 Figure 77 shows DNA66675-1587 (SEQ ID NO:179).  
 Figure 78 shows the native sequence PRO1343 polypeptide UNQ698 (SEQ ID NO:180).  
 Figure 79 shows DNA68864-1629 (SEQ ID NO:184).  
 35 Figure 80 shows the native sequence PRO1418 polypeptide UNQ732 (SEQ ID NO:185).  
 Figure 81 shows DNA68872-1620 (SEQ ID NO:186).  
 Figure 82 shows the native sequence PRO1387 polypeptide UNQ722 (SEQ ID NO:187).  
 Figure 83 shows DNA68874-1622 (SEQ ID NO:188).  
 Figure 84 shows the native sequence PRO1410 polypeptide UNQ728 (SEQ ID NO:189).  
 40 Figure 85 shows DNA76400-2528 (SEQ ID NO:190).

WO 00/53758

PCT/US00/05841

- Figure 86 shows the native sequence PRO1917 polypeptide UNQ900 (SEQ ID NO:191).  
Figure 87 shows DNA77624-2515 (SEQ ID NO:192).  
Figure 88 shows the native sequence PRO1868 polypeptide UNQ859 (SEQ ID NO:193).  
Figure 89 shows DNA30868-1156 (SEQ ID NO:228).  
5 Figure 90 shows the partial native sequence PRO205 polypeptide UNQ179 (SEQ ID NO:229).  
Figure 91 shows DNA36638-1056 (SEQ ID NO:230).  
Figure 92 shows the native sequence PRO21 polypeptide UNQ21 (SEQ ID NO:231).  
Figure 93 shows DNA38260-1180 (SEQ ID NO:232).  
Figure 94 shows the native sequence PRO269 polypeptide UNQ236 (SEQ ID NO:233).  
10 Figure 95 shows DNA40592-1242 (SEQ ID NO:240).  
Figure 96 shows the native sequence PRO344 polypeptide UNQ303 (SEQ ID NO:241).  
Figure 97 shows DNA41374-1312 (SEQ ID NO:248).  
Figure 98 shows the partial length native sequence PRO333 polypeptide UNQ294 (SEQ ID NO:249).  
Figure 99 shows DNA44194-1317 (SEQ ID NO:250).  
15 Figure 100 shows the native sequence PRO381 polypeptide UNQ322 (SEQ ID NO:251).  
Figure 101 shows DNA53517-1366 (SEQ ID NO:255).  
Figure 102 shows the native sequence PRO720 polypeptide UNQ388 (SEQ ID NO:256).  
Figure 103 shows DNA53971-1359 (SEQ ID NO:257).  
Figure 104 shows the native sequence PRO866 polypeptide UNQ435 (SEQ ID NO:258).  
20 Figure 105 shows DNA53987-1438 (SEQ ID NO:266).  
Figure 106 shows the native sequence PRO840 polypeptide UNQ433 (SEQ ID NO:267).  
Figure 107 shows DNA57700-1408 (SEQ ID NO:268).  
Figure 108 shows the native sequence PRO982 polypeptide UNQ483 (SEQ ID NO:269).  
Figure 109 shows DNA59620-1463 (SEQ ID NO:270).  
25 Figure 110 shows the native sequence PRO836 polypeptide UNQ545 (SEQ ID NO:271).  
Figure 111 shows DNA60627-1508 (SEQ ID NO:272).  
Figure 112 shows the native sequence PRO1159 polypeptide UNQ589 (SEQ ID NO:273).  
Figure 113 shows DNA64890-1612 (SEQ ID NO:274).  
Figure 114 shows the native sequence PRO1358 polypeptide UNQ707 (SEQ ID NO:275).  
30 Figure 115 shows DNA66659-1593 (SEQ ID NO:276).  
Figure 116 shows the native sequence PRO1325 polypeptide UNQ685 (SEQ ID NO:277).  
Figure 117 shows DNA66667-1596 (SEQ ID NO:278).  
Figure 118 shows the native sequence PRO1338 polypeptide UNQ693 (SEQ ID NO:279).  
Figure 119 shows DNA68818-2536 (SEQ ID NO:280).  
35 Figure 120 shows the native sequence PRO1434 polypeptide UNQ739 (SEQ ID NO:281).  
Figure 121 shows DNA84210-2576 (SEQ ID NO:285).  
Figure 122 shows the native sequence PRO4333 polypeptide UNQ1888 (SEQ ID NO:286).  
Figure 123 shows DNA92218-2554 (SEQ ID NO:292).  
Figure 124 shows the native sequence PRO4302 polypeptide UNQ1866 (SEQ ID NO:293).  
40 Figure 125 shows DNA96878-2626 (SEQ ID NO:294).



PCT/US00/05841

Figure 128 shows the native sequence PRO5727 polypeptide UNQ2448 (SEQ ID NO:297).

## 5

10

15

20

25

50

5

0

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Optionally, therefore, an extracellular domain of a PRO polypeptide may contain from about 5 or fewer amino acids on either side of the transmembrane domain/extracellular domain boundary as identified in the Examples or specification and such polypeptides, with or without the associated signal peptide, and nucleic acid encoding them, are contemplated by the present invention.

5 The approximate location of the "signal peptides" of the various PRO/number PRO polypeptides disclosed herein are shown in the present specification and/or the accompanying figures. It is noted, however, that the C-terminal boundary of a signal peptide may vary, but most likely by no more than about 5 amino acids on either side of the signal peptide C-terminal boundary as initially identified herein, wherein the C-terminal boundary of the signal peptide may be identified pursuant to criteria routinely employed in the art for  
10 identifying that type of amino acid sequence element (e.g., Nielsen *et al.*, *Prot. Eng.* 10:1-6 (1997) and von Heinje *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 14:4683-4690 (1986)). Moreover, it is also recognized that, in some cases, cleavage of a signal sequence from a secreted polypeptide is not entirely uniform, resulting in more than one secreted species. These mature polypeptides, where the signal peptide is cleaved within no more than about 5 amino acids on either side of the C-terminal boundary of the signal peptide as identified herein, and the  
15 polynucleotides encoding them, are contemplated by the present invention.

A "PRO polypeptide variant", "PRO/number variant" or "PRO variant" means an active PRO polypeptide as defined herein (e.g., below) having at least about 80% amino acid sequence identity with a full-length native sequence PRO polypeptide sequence as disclosed herein, a PRO polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a PRO polypeptide, with or without the signal  
20 peptide, as disclosed herein or any other fragment of a full-length PRO polypeptide sequence as disclosed herein. Such PRO polypeptide variants include, for instance, polypeptides wherein one or more amino acid residues are added, or deleted, at the N- or C-terminus of the full-length native amino acid sequence. Ordinarily, a PRO polypeptide variant will have at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81% amino acid sequence identity, alternatively at least about 82% amino acid sequence identity,  
25 alternatively at least about 83% amino acid sequence identity, alternatively at least about 84% amino acid sequence identity, alternatively at least about 85% amino acid sequence identity, alternatively at least about 86% amino acid sequence identity, alternatively at least about 87% amino acid sequence identity, alternatively at least about 88% amino acid sequence identity, alternatively at least about 89% amino acid sequence identity, alternatively at least about 90% amino acid sequence identity, alternatively at least about 91% amino acid  
30 sequence identity, alternatively at least about 92% amino acid sequence identity, alternatively at least about 93% amino acid sequence identity, alternatively at least about 94% amino acid sequence identity, alternatively at least about 95% amino acid sequence identity, alternatively at least about 96% amino acid sequence identity, alternatively at least about 97% amino acid sequence identity, alternatively at least about 98% amino acid sequence identity, alternatively at least about 99% amino acid sequence identity with a full-length native  
35 sequence PRO polypeptide sequence as disclosed herein, a PRO polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a PRO polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of a full-length PRO polypeptide sequence as disclosed herein. Ordinarily, PRO polypeptide variants are at least about 10 amino acids in length, alternatively at least about 20 amino acids in length, alternatively at least about 30 amino acids in length,  
40 alternatively at least about 40 amino acids in length, alternatively at least about 50 amino acids in length,

WO 00/53758

PCT/US00/05841

alternatively at least about 60 amino acids in length, alternatively at least about 70 amino acids in length, alternatively at least about 80 amino acids in length, alternatively at least about 90 amino acids in length, alternatively at least about 100 amino acids in length, alternatively at least about 150 amino acids in length, alternatively at least about 200 amino acids in length, alternatively at least about 300 amino acids in length, alternatively at least about 400 amino acids in length, alternatively at least about 500 amino acids in length, alternatively at least about 600 amino acids in length, alternatively at least about 700 amino acids in length, alternatively at least about 800 amino acids in length, alternatively at least about 900 amino acids in length, alternatively at least about 1000 amino acids in length, alternatively at least about 1200 amino acids in length, alternatively at least about 1400 amino acids in length, alternatively at least about 1500 amino acids in length or more.

"Percent (%) amino acid sequence identity" with respect to the PRO polypeptide sequences identified herein is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in the specific PRO/number polypeptide sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % amino acid sequence identity values are generated using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table 1 below. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and the source code shown in Tables 1 below has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in Table 1 below. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

In situations where ALIGN-2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A. As examples of % amino acid sequence identity calculations using this method, Tables 2

WO 00/53758

PCT/US00/05841

and 3 demonstrate how to calculate the % amino acid sequence identity of the amino acid sequence designated "Comparison Protein" to the amino acid sequence designated "PRO", wherein "PRO" represents the amino acid sequence of a hypothetical PRO/number polypeptide of interest, "Comparison Protein" represents the amino acid sequence of a polypeptide against which the "PRO" polypeptide of interest is being compared, and

5 "X," "Y" and "Z" each represent different hypothetical amino acid residues.

Unless specifically stated otherwise, all % amino acid sequence identity values used herein are obtained as described in the immediately preceding paragraph using the ALIGN-2 computer program. However, % amino acid sequence identity values may also be obtained as described below by using the WU-BLAST-2 computer program (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)). Most of the WU-BLAST-2 search parameters are set to the default values. Those not set to default values, *i.e.*, the adjustable parameters, are set with the following values: overlap span = 1, overlap fraction = 0.125, word threshold (T) = 11, and scoring matrix = BLOSUM62. When WU-BLAST-2 is employed, a % amino acid sequence identity value is determined by dividing (a) the number of matching identical amino acid residues between the amino acid sequence of the PRO polypeptide of interest having a sequence derived from the native sequence PRO

10 polypeptide and the comparison amino acid sequence of interest (*i.e.*, the sequence against which the PRO polypeptide is being compared - which may be a PRO polypeptide variant) as determined by WU-BLAST-2 by (b) the total number of amino acid residues of the PRO polypeptide of interest. For example, in the statement "a polypeptide comprising an amino acid sequence A which has or having at least 80% amino acid sequence identity to the amino acid sequence B", the amino acid sequence A is the comparison amino acid sequence of interest and the amino acid sequence B is the amino acid sequence of the PRO polypeptide of interest.

Percent amino acid sequence identity may also be determined using the sequence comparison program NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)). The NCBI-BLAST2 sequence comparison program may be downloaded from "http://www.ncbi.nlm.gov" or otherwise obtained from the National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 uses several search parameters, wherein all of

25 those search parameters are set to default values including, for example, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropout for final gapped alignment = 25 and scoring matrix = BLOSUM62.

In situations where NCBI-BLAST2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

30

$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

35 where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program NCBI-BLAST2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

"PRO variant polynucleotide" or "PRO variant nucleic acid sequence" means a nucleic acid molecule which encodes an active PRO polypeptide as defined below and which has at least about 80% nucleic acid sequence identity with a nucleotide sequence encoding: (1) a full-length native sequence PRO polypeptide as disclosed herein; (2) a full-length native sequence PRO polypeptide lacking the signal peptide as disclosed herein; (3) an extracellular domain of a PRO polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or (4) any other fragment of a full-length PRO polypeptide sequence as disclosed herein. Ordinarily, a PRO polypeptide variant polynucleotide will have at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity with (1) a nucleic acid sequence encoding a full-length native sequence PRO polypeptide sequence as disclosed herein, (2) a full-length native sequence PRO polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, (3) an extracellular domain of a PRO polypeptide sequence, with or without the signal sequence, as disclosed herein or (4) any other fragment of a full-length PRO polypeptide on sequence as disclosed herein. Variants do not encompass the native nucleotide sequence.

Ordinarily, PRO polypeptide variant polynucleotides are at least about 30 nucleotides in length, alternatively at least about 60 nucleotides in length, alternatively at least about 90 nucleotides in length, alternatively at least about 120 nucleotides in length, alternatively at least about 150 nucleotides in length, alternatively at least about 180 nucleotides in length, alternatively at least about 210 nucleotides in length, alternatively at least about 240 nucleotides in length, alternatively at least about 270 nucleotides in length, alternatively at least about 300 nucleotides in length, alternatively at least about 450 nucleotides in length, alternatively at least about 500 nucleotides in length, alternatively at least about 600 nucleotides in length, alternatively at least about 700 nucleotides in length, alternatively at least about 800 nucleotides in length, alternatively at least about 900 nucleotides in length, alternatively at least about 1000 nucleotides in length, alternatively at least about 1200 nucleotides in length, alternatively at least about 1400 nucleotides in length, alternatively at least about 1600 nucleotides in length, alternatively at least about 1800 nucleotides in length, alternatively at least about 2000 nucleotides in length, alternatively at least about 2500 nucleotides in length, alternatively at least about 3000 nucleotides in length, alternatively at least about 3500 nucleotides in length, alternatively at least about 4000 nucleotides, alternatively at least about 5000 nucleotides or more.

"Percent (%) nucleic acid sequence identity" with respect to PRO-encoding nucleic acid sequences identified herein is defined as the percentage of nucleotides in a candidate sequence that are identical with the nucleotides in the PRO nucleic acid sequence of interest, after aligning the sequences and introducing gaps, if

WO 00/53758

PCT/US00/05941

necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. Alignment for purposes of determining percent nucleic acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN or Megalign (DNASTAR) software. For purposes herein, however, % nucleic acid sequence identity values are generated using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table 1 below. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and the source code shown in Table 1 below has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXUS10087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in Table 1 below. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

In situations where ALIGN-2 is employed for nucleic acid sequence comparisons, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D) is calculated as follows:

100 times the fraction W/Z

where W is the number of nucleotides scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of C and D, and where Z is the total number of nucleotides in D. It will be appreciated that where the length of nucleic acid sequence C is not equal to the length of nucleic acid sequence D, the % nucleic acid sequence identity of C to D will not equal the % nucleic acid sequence identity of D to C. As examples of % nucleic acid sequence identity calculations, Tables 4 and 5, demonstrate how to calculate the % nucleic acid sequence identity of the nucleic acid sequence designated "Comparison DNA" to the nucleic acid sequence designated "PRO-DNA", wherein "PRO-DNA" represents a hypothetical PRO polypeptide - encoding nucleic acid sequence of interest, "Comparison DNA" represents the nucleotide sequence of a nucleic acid molecule against which the "PRO-DNA" nucleic acid molecule of interest is being compared, and "N", "L" and "V" each represent different hypothetical nucleotides.

Unless specifically stated otherwise, all % nucleic acid sequence identity values used herein are obtained as described in the immediately preceding paragraph using the ALIGN-2 computer program. However, % nucleic acid sequence identity values may also be obtained as described below by using the WU-BLAST-2 computer program (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)). Most of the WU-BLAST-2 search parameters are set to the default values. Those not set to default values, *i.e.*, the adjustable parameters, are set with the following values: overlap span = 1, overlap fraction = 0.125, word threshold (T) = 11, and scoring matrix = BLOSUM62. When WU-BLAST-2 is employed, a % nucleic acid sequence identity value is determined by dividing (a) the number of matching identical nucleotides between the nucleic acid sequence of the PRO polypeptide - encoding nucleic acid molecule of interest having a sequence derived from the native sequence PRO polypeptide - encoding nucleic acid (*i.e.*, the reference sequence) and the comparison nucleic acid molecule of interest (*i.e.*, the sequence against which the PRO polypeptide - encoding nucleic acid

WO 00/53758

PCT/US00/05841

molecule of interest is being compared - which may be a PRO variant polynucleotide) as determined by WU-BLAST-2 by (b) the total number of nucleotides of the PRO reference sequence. For example, in the statement "an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence A which has or having at least 80% nucleic acid sequence identity to the nucleic acid sequence B", the nucleic acid sequence A is the comparison nucleic acid molecule of interest and the nucleic acid sequence B is the nucleic acid sequence of the PRO polypeptide - encoding nucleic acid molecule of interest.

Percent nucleic acid sequence identity may also be determined using the sequence comparison program NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)). The NCBI-BLAST2 sequence comparison program may be downloaded from "http://www.ncbi.nlm.nih.gov" or otherwise obtained from the National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 uses several search parameters, wherein all of those search parameters are set to default values including, for example, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 and scoring matrix = BLOSUM62.

In situations where NCBI-BLAST2 is employed for sequence comparisons, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D) is calculated as follows:

100 times the fraction W/Z

where W is the number of nucleotides scored as identical matches by the sequence alignment program NCBI-BLAST2 in that program's alignment of C and D, and where Z is the total number of nucleotides in D. It will be appreciated that where the length of nucleic acid sequence C is not equal to the length of nucleic acid sequence D, the % nucleic acid sequence identity of C to D will not equal the % nucleic acid sequence identity of D to C.

In other embodiments, PRO variant polynucleotides are nucleic acid molecules that encode an active PRO polypeptide and which are capable of hybridizing, preferably under stringent hybridization and wash conditions, to nucleotide sequences encoding a full-length PRO polypeptides as disclosed herein. PRO variant polypeptides may be those that are encoded by a PRO variant polynucleotide.

The term "positives", in the context of sequence comparison performed as described above, includes residues in the sequences compared that are not identical but have similar properties (*e.g.*, as a result of conservative substitutions, see Table 6 below). For purposes herein, the % value of positives is determined by dividing (a) the number of amino acid residues scoring a positive value between the PRO polypeptide sequence of interest having a sequence derived from a native sequence PRO polypeptide and the comparison amino acid sequence of interest (*i.e.*, the amino acid sequence against which the PRO polypeptide sequence is being compared) as determined in the BLOSUM62 matrix of WU-BLAST-2 by (b) the total number of amino acid residues of the PRO polypeptide of interest.

Unless specifically stated otherwise, the % value of positives is calculated as described in the immediately preceding paragraph. However, in the context of the amino acid sequence identity comparisons performed as described for ALIGN-2 and NCBI-BLAST-2 above, includes amino acid residues in the

WO 00/53758

PCT/US00/05841

sequences compared that are not only identical, but also those that have similar properties. Amino acid residues that score a positive value to an amino acid residue of interest are those that are either identical to the amino acid residue of interest or are a preferred substitution (as defined in Table I below) of the amino acid residue of interest.

5 For amino acid sequence comparisons using ALIGN-2 or NCBI-BLAST2, the % value of positives of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % positives to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

10 100 times the fraction  $X/Y$

where X is the number of amino acid residues scoring a positive value as defined above by the sequence alignment program ALIGN-2 or NCBI-BLAST2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence 15 A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % positives of A to B will not equal the % positives of B to A.

"Isolated," when used to describe the various polypeptides disclosed herein, means polypeptide that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials that would typically interfere with diagnostic or therapeutic uses for the polypeptide, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non- 20 proteinaceous solutes. In preferred embodiments, the polypeptide will be purified (1) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (2) to homogeneity by SDS-PAGE under non-reducing or reducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated polypeptide includes polypeptide *in situ* within recombinant cells, since at 25 least one component of the PRO polypeptide in its natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated polypeptide will be prepared by at least one purification step.

An "isolated" PRO polypeptide - encoding nucleic acid or other polypeptide-encoding nucleic acid is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the polypeptide-encoding nucleic acid. An 30 isolated polypeptide-encoding nucleic acid molecule is other than in the context or setting in which it is found in nature. Isolated polypeptide - encoding nucleic acids therefore are distinguished from the polypeptide - encoding nucleic acid molecule existing in natural cells. However, an isolated PRO polypeptide - encoding nucleic acid molecule includes the same contained in cells that ordinarily express the specific polypeptide where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

35 The term "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

40 Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a



WO 00/53758

PCT/US00/05841

polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

"Stringency" of hybridization reactions is readily determinable by one of ordinary skill in the art, and generally is an empirical calculation dependent upon probe length, washing temperature, and salt concentration. In general, longer probes require higher temperatures for proper annealing, while shorter probes need lower temperatures. Hybridization generally depends on the ability of denatured DNA to reanneal when complementary strands are present in an environment below their melting temperature. The higher the degree of desired homology between the probe and hybridizable sequence, the higher the relative temperature which can be used. As a result, it follows that higher relative temperatures would tend to make the reaction conditions more stringent, while lower temperatures less so. For additional details and explanation of stringency of hybridization reactions, see Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Stringent conditions" or "high stringency conditions," as defined herein, may be identified by those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50 mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42°C; or (3) employ 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55°C, followed by a high-stringency wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55°C.

"Moderately stringent conditions" may be identified as described by Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, and include the use of washing solution and hybridization conditions (e.g., temperature, ionic strength and %SDS) less stringent than those described above. An example of moderately stringent conditions is overnight incubation at 37°C in a solution comprising: 20% formamide, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5 x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 µg/mL denatured sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 1 x SSC at about 37-50°C. The skilled artisan will recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc., as necessary to accommodate factors such as probe length and the like.

"Antibodies" (Abs) and "immunoglobulins" (Igs) are glycoproteins having the same general structural characteristics. While antibodies exhibit binding specificity to a specific antigen, immunoglobulins include both antibodies and other antibody-like molecules which lack antigen specificity. Polypeptides of the latter kind are, for example, produced at low levels by the lymph system and at increased levels by myelomas. The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers, without limitation, intact monoclonal

WO 00/53758

PCT/US00/05841

antibodies (including agonist, antagonist and neutralizing antibodies), polyclonal antibodies, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies) formed from at least two intact antibodies, single chain antibodies binding the epitopes specific to the PRO polypeptide and antibody fragments so long as they exhibit the desired biological activity. An anti-PRO200, anti-PRO204, anti-PRO212, anti-PRO216, anti-PRO226, anti-PRO240, anti-PRO235, anti-PRO245, anti-PRO172, anti-PRO273, anti-PRO272, anti-PRO332, anti-PRO526, anti-PRO701, anti-PRO361, anti-PRO362, anti-PRO363, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO531, anti-PRO533, anti-PRO1083, anti-PRO865, anti-PRO770, anti-PRO769, anti-PRO788, anti-PRO1114, anti-PRO1007, anti-PRO1154, anti-PRO1031, anti-PRO1346, anti-PRO1155, anti-PRO1250, anti-PRO1312, anti-PRO1192, anti-PRO1246, anti-PRO1283, anti-PRO1195, anti-PRO1343, anti-PRO1418, anti-PRO1387, anti-PRO1410, anti-PRO1917, anti-PRO1868, anti-PRO205, anti-PRO21, anti-PRO269, anti-PRO344, anti-PRO333, anti-PRO381, anti-PRO720, anti-PRO866, anti-PRO840, anti-PRO982, anti-PRO836, anti-PRO1159, anti-PRO1358, anti-PRO1325, anti-PRO1338, anti-PRO1434, anti-PRO4333, anti-PRO4302, anti-PRO4430 or anti-PRO5727 antibody is an antibody which immunologically binds to a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727, respectively, polypeptide. The antibody may bind to any domain of the PRO polypeptide which may be contacted by the antibody. For example, the antibody may bind to any extracellular domain of the polypeptide and when the entire polypeptide is secreted, to any domain on the polypeptide which is available to the antibody for binding.

"Native antibodies" and "native immunoglobulins" are usually heterotetrameric glycoproteins of about 150,000 daltons, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages varies among the heavy chains of different immunoglobulin isotypes. Each heavy and light chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain ( $V_H$ ) followed by a number of constant domains. Each light chain has a variable domain at one end ( $V_L$ ) and a constant domain at its other end; the constant domain of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light-chain variable domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light- and heavy-chain variable domains.

The term "variable" refers to the fact that certain portions of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies and are used in the binding and specificity of each particular antibody for its particular antigen. However, the variability is not evenly distributed throughout the variable domains of antibodies. It is concentrated in three or four segments called "complementarity-determining regions" (CDRs) or "hypervariable regions" in both in the light-chain and the heavy-chain variable domains. The more highly conserved portions of variable domains are called the framework (FR). The variable domains of native heavy and light chains each comprise four or five FR regions, largely adopting a  $\beta$ -sheet configuration, connected by the CDRs, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the  $\beta$ -sheet structure. The CDRs in each chain are held together in close proximity by the FR regions and, with the CDRs from the other chain,

WO 00/53758

PCT/US00/05841

contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies (see Kabat *et al.*, NIH Publ. No.91-3242, Vol. 1, pages 647-669 (1991)). There are at least two techniques for determining the extent of the CDRs: (1) An approach based on the extent of cross-species sequence variability (*i.e.*, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institute of Health, Bethesda, MD); and (2) an approach based on crystallographic studies of antigen-antibody complexes (Chothia, C. *et al.*, (1989), *Nature* 342: 877). Moreover, CDR's can also be defined using a hybrid approach incorporating the residues identified by both of the previous techniques. The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody-dependent cellular toxicity.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably the antigen binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies (Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8 (10):1057-1062 [1995]); single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, whose name reflects its ability to crystallize readily. Pepsin treatment yields an F(ab')<sub>2</sub> fragment that has two antigen-combining sites and is still capable of cross-linking antigen.

"Fv" is the minimum antibody fragment which contains a complete antigen-recognition and binding site. This region consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable domain in tight, non-covalent association. It is in this configuration that the three CDRs of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> dimer. Collectively, the six CDRs confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH1) of the heavy chain. Fab' fragments differ from Fab fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group. F(ab')<sub>2</sub> antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

The "light chains" of antibodies (immunoglobulins) from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa (κ) and lambda (λ), based on the amino acid sequences of their constant domains.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), *e.g.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgA2. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called α, δ, ε, γ, and μ, respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to conventional (polyclonal) antibody preparations which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they are synthesized by the hybridoma culture, uncontaminated by other immunoglobulins. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 [1975], or may be made by recombinant DNA methods (see, e.g., U.S. Patent No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 [1991] and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), for example. See also U.S. Patent Nos. 5,750,373, 5,571,698, 5,403,484 and 5,223,409 which describe the preparation of antibodies using phagemid and phage vectors.

The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies (immunoglobulins) in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 [1984]).

"Humanized" forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> or other antigen-binding subsequences of antibodies) which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementarity-determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, Fv framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. These modifications are made to further refine and maximize antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 [1988]; and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). The humanized antibody includes a "primatized" antibody where the antigen-binding region of the antibody is derived from an antibody produced

WO 00/53758

PCT/US00/05841

by immunizing macaque monkeys with the antigen of interest. Antibodies containing residues from Old World monkeys are also possible within the invention. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,658,570; 5,693,780; 5,681,722; 5,750,105; and 5,756,096.

Antibodies and fragments thereof in this invention also include "affinity matured" antibodies in which an antibody is altered to change the amino acid sequence of one or more of the CDR regions and/or the framework regions to alter the affinity of the antibody or fragment thereof for the antigen to which it binds. Affinity maturation may result in an increase or in a decrease in the affinity of the matured antibody for the antigen relative to the starting antibody. Typically, the starting antibody will be a humanized, human, chimeric or murine antibody and the affinity matured antibody will have a higher affinity than the starting antibody. During the maturation process, one or more of the amino acid residues in the CDRs or in the framework regions are changed to a different residue using any standard method. Suitable methods include point mutations using well known cassette mutagenesis methods (Wells *et al.*, 1985, *Gene* 34:315) or oligonucleotide mediated mutagenesis methods (Zoller *et al.*, 1987, *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504). Affinity maturation may also be performed using known selection methods in which many mutations are produced and mutants having the desired affinity are selected from a pool or library of mutants based on improved affinity for the antigen or ligand. Known phage display techniques can be conveniently used in this approach. See, for example, U.S. 5,750,373; U.S. 5,223,409, *etc.*

Human antibodies are also within the scope of the antibodies of the invention. Human antibodies can be produced using various techniques known in the art, including phage display libraries (Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). The techniques of Cole *et al.* and Boerner *et al.* are also available for the preparation of human monoclonal antibodies (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991); U.S. 5,750,373). Similarly, human antibodies can be made by introducing of human immunoglobulin loci into transgenic animals, *e.g.*, mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. Upon challenge, human antibody production is observed, which closely resembles that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and antibody repertoire. This approach is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, and in the following scientific publications: Marks *et al.*, *BioTechnology* 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995).

"Single-chain Fv" or "sFv" antibody fragments comprise the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Preferably, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains which enables the sFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of sFv see Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy-chain variable domain (V<sub>H</sub>) connected to a light-chain variable domain (V<sub>L</sub>) in the same polypeptide chain (V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain

WO 00/53758

PCT/US00/05841

and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; and Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

The word "label" when used herein refers to a detectable compound or composition which is conjugated directly or indirectly to the compound, *e.g.*, antibody or polypeptide, so as to generate a "labelled" compound. The label may be detectable by itself (*e.g.*, radioisotope labels or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration of a substrate compound or composition which is detectable.

By "solid phase" is meant a non-aqueous matrix to which the compound of the present invention can adhere. Examples of solid phases encompassed herein include those formed partially or entirely of glass (*e.g.*, controlled pore glass), polysaccharides (*e.g.*, agarose), polyacrylamides, polystyrene, polyvinyl alcohol and silicones. In certain embodiments, depending on the context, the solid phase can comprise the well of an assay plate; in others it is a purification column (*e.g.*, an affinity chromatography column). This term also includes a discontinuous solid phase of discrete particles, such as those described in U.S. Patent No. 4,275,149.

The term "immune related disease" means a disease in which a component of the immune system of a mammal causes, mediates or otherwise contributes to a morbidity in the mammal. Also included are diseases in which stimulation or intervention of the immune response has an ameliorative effect on progression of the disease. Included within this term are immune-mediated inflammatory diseases, non-immune-mediated inflammatory diseases, infectious diseases, immunodeficiency diseases, neoplasia, *etc.*

The term "T cell mediated" disease means a disease in which T cells directly or indirectly mediate or otherwise contribute to a morbidity in a mammal. The T cell mediated disease may be associated with cell mediated effects, lymphokine mediated effects, *etc.*, and even effects associated with B cells if the B cells are stimulated, for example, by the lymphokines secreted by T cells.

Examples of immune-related and inflammatory diseases, some of which are immune or T cell mediated, which can be treated according to the invention include systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, juvenile chronic arthritis, spondyloarthropathies, systemic sclerosis (scleroderma), idiopathic inflammatory myopathies (dermatomyositis, polymyositis), Sjögren's syndrome, systemic vasculitis, sarcoidosis, autoimmune hemolytic anemia (immune pancytopenia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria), autoimmune thrombocytopenia (idiopathic thrombocytopenic purpura, immune-mediated thrombocytopenia), thyroiditis (Grave's disease, Hashimoto's thyroiditis, juvenile lymphocytic thyroiditis, atrophic thyroiditis), diabetes mellitus, immune-mediated renal disease (glomerulonephritis, tubulointerstitial nephritis), demyelinating diseases of the central and peripheral nervous systems such as multiple sclerosis, idiopathic demyelinating polyneuropathy or Guillain-Barré syndrome, and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, hepatobiliary diseases such as infectious hepatitis (hepatitis A, B, C, D, E and other non-hepatotropic viruses), autoimmune chronic active hepatitis, primary biliary cirrhosis, granulomatous hepatitis, and sclerosing cholangitis, inflammatory bowel disease (ulcerative colitis: Crohn's disease), gluten-sensitive enteropathy, and Whipple's disease, autoimmune or immune-mediated skin diseases including bullous skin diseases, erythema multiforme and contact dermatitis, psoriasis, allergic diseases such as asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, food hypersensitivity and urticaria, immunologic diseases of the lung such as eosinophilic pneumonias, idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis, transplantation associated diseases including graft rejection and graft-versus-host-disease. Infectious diseases including viral

WO 00/53758

PCT/US00/05841

diseases such as AIDS (HIV infection), hepatitis A, B, C, D, and E, herpes, *etc.*, bacterial infections, fungal infections, protozoal infections and parasitic infections.

"Treatment" is an intervention performed with the intention of preventing the development or altering the pathology of a disorder. Accordingly, "treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those in which the disorder is to be prevented. In treatment of an immune related disease, a therapeutic agent may directly decrease or increase the magnitude of response of a component of the immune response, or render the disease more susceptible to treatment by other therapeutic agents, *e.g.*, antibiotics, antifungals, anti-inflammatory agents, chemotherapeutics, *etc.*

The term "effective amount" is at least the minimum concentration or amount of a PRO polypeptide and/or agonist/antagonist which causes, induces or results in either a detectable improvement in a component of the immune response in mammals as measured in an *in vitro* assay. For example, an increase or decrease in the proliferation of T-cells and/or vascular permeability as measured in Examples provided herein. Furthermore, a "therapeutically effective amount" is the minimum concentration or amount of a PRO polypeptide and/or agonist/antagonist which would be effective in at least attenuating a pathology (increasing or decreasing as the case may be) a component of the immune response in mammals, the results of which effects a treatment as defined in the previous paragraph.

"Chronic" administration refers to administration of the agent(s) in a continuous mode as opposed to an acute mode, so as to maintain the initial therapeutic effect (activity) for an extended period of time.

"Intermittent" administration is treatment that is not consecutively done without interruption, but rather is cyclic in nature.

The "pathology" of an immune related disease includes all phenomena that compromise the well-being of the patient. This includes, without limitation, abnormal or uncontrollable cell growth, antibody production, auto-antibody production, complement production and activation, interference with the normal functioning of neighboring cells, release of cytokines or other secretory products at abnormal levels, suppression or aggravation of any inflammatory or immunological response, infiltration of inflammatory cells (neutrophilic, eosinophilic, monocytic, lymphocytic) into tissue spaces, *etc.*

"Mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as dogs, horses, cattle, pigs, apes, hamsters, ferrets, cats, *etc.* Preferably, the mammal is human.

Administration "in combination with" one or more further therapeutic agents includes simultaneous (concurrent) and consecutive administration in any order.

"Carriers" as used herein include pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers which are nontoxic to the cell or mammal being exposed thereto at the dosages and concentrations employed. Often the physiologically acceptable carrier is an aqueous pH buffered solution. Examples of physiologically acceptable carriers include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptide; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or

WO 00/53758

PCT/US00/05841

sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEEN<sup>TM</sup>, polyethylene glycol (PEG), and PLURONICS<sup>TM</sup>.

The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes (e.g., <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>90</sup>Y and <sup>186</sup>Re), chemotherapeutic agents, and toxins such as enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin, or fragments thereof.

A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer. Examples of chemotherapeutic agents include adriamycin, doxorubicin, epirubicin, 5-fluorouracil, cytosine arabinoside ("Ara-C"), cyclophosphamide, thiotepa, busulfan, cytosin, taxoids, e.g., paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), and doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France), ixotere, methotrexate, cisplatin, melphalan, vinblastine, bleomycin, etoposide, ifosfamide, mitomycin C, mitoxantrone, vincristine, vinorelbine, carboplatin, teniposide, daunomycin, carminomycin, aminopterin, dactinomycin, mitomycins, esperamicins (see U.S. Pat. No. 4,675,187), melphalan and other related nitrogen mustards. Also included in this definition are hormonal agents that act to regulate or inhibit hormone action on tumors such as tamoxifen and enalapristone.

A "growth inhibitory agent" when used herein refers to a compound or composition which inhibits growth of a cell, especially cancer cell overexpressing any of the genes identified herein, either *in vitro* or *in vivo*. Thus, the growth inhibitory agent is one which significantly reduces the percentage of cells overexpressing such genes in S phase. Examples of growth inhibitory agents include agents that block cell cycle progression (at a place other than S phase), such as agents that induce G1 arrest and M-phase arrest. Classical M-phase blockers include the vincas (vincristine and vinblastine), taxol, and topo II inhibitors such as doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposide, and bleomycin. Those agents that arrest G1 also spill over into S-phase arrest, for example, DNA alkylating agents such as tamoxifen, prednisone, dacarbazine, mechlorethamine, cisplatin, methotrexate, 5-fluorouracil, and ara-C. Further information can be found in *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" by Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13.

The term "cytokine" is a generic term for proteins released by one cell population which act on another cell as intercellular mediators. Examples of such cytokines are lymphokines, monokines, and traditional polypeptide hormones. Included among the cytokines are growth hormone such as human growth hormone, N-methionyl human growth hormone, and bovine growth hormone; parathyroid hormone; thyroxine; insulin; proinsulin; relaxin; prolaxin; glycoprotein hormones such as follicle stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH), and luteinizing hormone (LH); hepatic growth factor; fibroblast growth factor; prolactin; placental lactogen; tumor necrosis factor- $\alpha$  and - $\beta$ ; mullerian-inhibiting substance; mouse gonadotropin-associated peptide; inhibin; activin; vascular endothelial growth factor; integrin; thrombopoietin (TPO); nerve growth factors such as NGF- $\beta$ ; platelet-growth factor; transforming growth factors (TGFs) such as TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ ; insulin-like growth factor-I and -II; erythropoietin (EPO); osteoinductive factors; interferons such as interferon- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$ ; colony stimulating factors (CSFs) such as macrophage-CSF (M-CSF); granulocyte-macrophage-CSF (GM-CSF); and granulocyte-CSF (G-CSF); interleukins (ILs) such as IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; a tumor necrosis factor such as TNF- $\alpha$  or TNF- $\beta$ ; and other polypeptide factors including LIF and kit ligand (KL). As used herein, the term cytokine



WO 00/53758

PCT/US00/05841

includes proteins from natural sources or from recombinant cell culture and biologically active equivalents of the native sequence cytokines.

The term "epitope tagged" when used herein refers to a chimeric polypeptide comprising a PRO polypeptide fused to a "tag polypeptide". The tag polypeptide has enough residues to provide an epitope against which an antibody can be made, yet is short enough such that it does not interfere with activity of the polypeptide to which it is fused. The tag polypeptide preferably also is fairly unique so that the antibody does not substantially cross-react with other epitopes. Suitable tag polypeptides generally have at least six amino acid residues and usually between about 8 and 50 amino acid residues (preferably, between about 10 and 20 amino acid residues).

"Active" or "activity" in the context of variants of the PRO polypeptide refers to form(s) of proteins of the invention which retain the biologic and/or the ability to induce the production of an antibody against an antigenic epitope possessed by the PRO polypeptide. More specifically, "biological activity" refers to a biological function (either inhibitory or stimulatory) caused by a native sequence or naturally-occurring PRO polypeptide. Even more specifically, "biological activity" in the context of an antibody or another molecule that can be identified by the screening assays disclosed herein (e.g., an organic or inorganic small molecule, peptide, etc.) can be the ability of such molecules to induce or inhibit infiltration of inflammatory cells into a tissue, to stimulate or inhibit T-cell proliferation or activation, to stimulate or inhibit cytokine release by cells or to increase or decrease vascular permeability. Another specific biological activity is the increased vascular permeability or the inhibition thereof.

The term "antagonist" is used in the broadest sense, and includes any molecule that partially or fully blocks, inhibits, or neutralizes a biological activity of a native sequence PRO polypeptide disclosed herein. In a similar manner, the term "agonist" is used in the broadest sense and includes any molecule that mimics or amplifies a biological activity of a native sequence PRO polypeptide disclosed herein. Suitable agonist or antagonist molecules specifically include agonist or antagonist antibodies or antibody fragments, fragments or amino acid sequence variants of native PRO polypeptides, peptides, small organic molecules, etc. Methods for identifying agonists or antagonists of a PRO polypeptide may comprise contacting a PRO polypeptide with a candidate agonist or antagonist molecule and measuring a detectable change in one or more biological activities normally associated with the same.

A "small molecule" is defined herein to have a molecular weight below about 600 daltons, and is generally an organic compound.

A "liposome" is a small vesicle composed of various types of lipids, phospholipids and/or surfactant which is useful for delivery of a drug (optionally including a chemotherapeutic agent) to a mammal. The components of the liposome are commonly arranged in a bilayer formation, similar to the lipid arrangement of biological membranes.

As used herein, the term "immunoadhesin" designates antibody-like molecules which combine the binding specificity of a heterologous protein (an "adhesin") with the effector functions of immunoglobulin constant domains. Structurally, the immunoadhesins comprise a fusion of an amino acid sequence with the desired binding specificity which is other than the antigen recognition and binding site of an antibody (i.e., is "heterologous"), and an immunoglobulin constant domain sequence. The adhesin part of an immunoadhesin molecule typically is a contiguous amino acid sequence comprising at least the binding site of a receptor or a

WO 00/53758

PCT/US00/05841

ligand. The immunoglobulin constant domain sequence in the immunoadhesin may be obtained from any immunoglobulin, such as IgG-1, IgG-2, IgG-3, or IgG-4 subtypes, IgA (including IgA-1 and IgA-2), IgE, IgD or IgM.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 1

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
5  * 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 */

10 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},
15 /* C */ {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-2,0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4,0,-2,0,-2,-8,0,0,-5},
/* D */ {0,3,-3,4,3,-6,1,1,-2,0,0,-4,-3,2,_M,-1,2,-1,0,0,0,-2,-7,0,-4,2},
/* E */ {0,2,-3,3,4,-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,-3,0,-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},
20 /* 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,-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},
/* 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,-1,0,2,-2,0,-1,-2},
25 /* M */ {-1,-2,-5,-3,-2,0,-3,-2,2,0,0,4,6,-2,_M,-2,-1,0,-2,-1,0,2,-4,0,-2,-1},
/* N */ {0,2,-4,2,1,-4,0,2,-2,0,1,-3,-2,2,_M,-1,1,0,1,0,0,-2,-4,0,-2,1},
/* O */ {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */ {1,-1,-3,-1,-1,-5,-1,0,-2,0,-1,-3,-2,1,_M,0,4,1,-1,-1,0,-2,-5,0,-4,3},
/* 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},
30 /* 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,-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},
/* V */ {0,-2,-2,-2,-1,-1,-2,4,0,-2,2,2,-2,_M,-1,-2,-2,-1,0,0,4,-6,0,-2,-2},
35 /* W */ {-6,-5,-6,-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},
/* 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}
};
40
45
50

```

Page 1 of day.h

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 1 (cont.)

```

/*
*/
#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 jumps in an path */
10 #define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0 8 /* penalty for a gap */
15 #define DINS1 1 /* penalty per base */
#define PINS0 8 /* penalty for a gap */
#define PINS1 4 /* penalty per residue */

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

struct diag {
25     int score; /* score at last jmp */
     long offset; /* offset of prev block */
     short jmp; /* current jmp index */
     struct jmp jp; /* list of jmps */
30 };

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

char *ofile; /* output file name */
char *namex[2]; /* seq names: getseqs() */
40 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() */
45 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 */
50 long offset; /* current offset in jmp file */
struct diag *dx; /* holds diagonals */
struct path ppl[2]; /* holds path for seqs */

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

```

60

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 1 (cont.)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: prog1 file1 file2
 * where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 * The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
 * Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 * Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 * A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 * Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _jbval[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 _jbval[26] = {
1, 21(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)
{
    main
    int ac;
    char *av[];

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

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

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

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

```

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 1 (cont')

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
5  * 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
10 {
    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 *) malloc(sizeof(struct diag));

    ndely = (int *) malloc(sizeof(int));
    dely = (int *) malloc(sizeof(int));
    col0 = (int *) malloc(sizeof(int));
    col1 = (int *) malloc(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;
        }
    }
}

```

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 1 (cont.)

```

5      for (py = seqx[l], yy = i; 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"];
10      /* update penalty for del in x seq;
        * favor new del over ongoing del
        * ignore MAXGAP if weighting endgaps
        */
        if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
15            if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
                dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                ndely[yy] = 1;
            } else {
                dely[yy] -= ins1;
                ndely[yy]++;
20            }
        } else {
            if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
                dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                ndely[yy] = 1;
25            } else
                ndely[yy]++;
        }
30      /* update penalty for del in y seq;
        * favor new del over ongoing del
        */
        if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
35            if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
                delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                ndelx = 1;
            } else {
                delx -= ins1;
                ndelx++;
40            }
        } else {
            if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
                delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                ndelx = 1;
45            } else
                ndelx++;
        }
50      /* pick the maximum score; we're favoring
        * mis over any del and delx over dely
        */
55
60

```

WO 00/53758

PCT/US00/05841

```

Table 1 (cont.)
id = xx * yy + len1 - 1;
...nw
5   if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
      coll[yy] = mis;
   else if (delx >= dely[yy]) {
      coll[yy] = delx;
      ij = dx[id].ijmp;
10   if (dx[id].jp.n[i] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
      && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX)) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
      dx[id].ijmp++;
      if (++ij >= MAXJMP) {
15         writejmps(id);
         ij = dx[id].ijmp = 0;
         dx[id].offset = offset;
         offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
      }
      dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
20   dx[id].jp.x[ij] = xx;
      dx[id].score = delx;
   }
   else {
25   coll[yy] = dely[yy];
      ij = dx[id].ijmp;
      if (dx[id].jp.n[i] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
      && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX)) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
      dx[id].ijmp++;
30   if (++ij >= MAXJMP) {
      writejmps(id);
      ij = dx[id].ijmp = 0;
      dx[id].offset = offset;
      offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
35   }
      dx[id].jp.n[ij] = ndely[yy];
      dx[id].jp.x[ij] = xx;
      dx[id].score = dely[yy];
40   }
   if (xx == len0 && yy < len1) {
      /* last col
      */
      if (endgaps)
45   coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
      if (coll[yy] > smax) {
      smax = coll[yy];
      dmax = id;
      }
   }
50   }
   if (endgaps && xx < len0)
      coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
   if (coll[yy-1] > smax) {
55   smax = coll[yy-1];
      dmax = id;
   }
   tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
60   (void) free((char *)ndely);
   (void) free((char *)dely);
   (void) free((char *)col0);
   (void) free((char *)coll);
}
nw,c

```



WO 00/53758

PCT/US00/05841

```

/*
 *
 * 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()
 * numsl() -- put out a number (line: dumpblock())
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]); dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars; dumpblock()
 * stripnames() -- strip any path and prefix from a sequence
 */
15
#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
20 #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 */
25
print()
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */
30
    if ((fx = fopen(outfile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, outfile);
        cleanup(1);
    }
35
    fprintf(fx, "< first sequence: %s (length = %d)\n", names[0], len0);
    fprintf(fx, "< second sequence: %s (length = %d)\n", names[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
40
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
45
    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 */
50
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
55
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
60
}

```

WO 00/53758

PCT/US00/05841

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
5 static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
    int lx, ly; /* "core" (minus endgaps) */
    int firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */
{
10     int nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char ourx[32];
    double pct;
    register nd, nl;
    register char *p0, *p1;
15     /* get total matches, score
    */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    nd = pp[1].spc + 1;
    nl = pp[0].spc + 1;
20     nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            nl++;
            siz0--;
30         }
        else if (siz1) {
            p0++;
            nd++;
            siz1--;
35         }
        else {
            if (xbmi[*p0-'A']&xbmi[*p1-'A'])
                nm++;
            if (nl++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].nl[i0]++;
            if (ni++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].nl[i1]++;
            p0++;
            p1++;
45         }
    }

    /* 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
55         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",
60         nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

WO 00/53758

PCT/US00/05841

```

                                Table 1 (cont.)
fprintf(fx, "< gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
5   (void) printf(oux, " (%d %s %s)",
    gapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "": "s");
    fprintf(fx, "%s", oux);

    fprintf(fx, "< gaps in second sequence: %d", gapy);
10   if (gapy) {
        (void) printf(oux, " (%d %s %s)",
            gapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "": "s");
        fprintf(fx, "%s", oux);
    }
15   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,
20         "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
25         "<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");
30 }

static int nn; /* matches in core -- for checking */
static int lmax; /* lengths of stripped file names */
static int ij[2]; /* jmp index for a path */
static int nc[2]; /* number at start of current line */
35 static int nj[2]; /* current elem number -- for gapping */
static int sz[2];
static char *ps[2]; /* ptr to current element */
static char *pj[2]; /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
40 static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

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

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

        nc[i] = 1;
        nj[i] = 1;
        sz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
60        pj[i] = oux[i];
    }
}

```

pr\_align

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 1 (cont<sup>1</sup>)

```

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

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

```

...pr\_align

dumpblock

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 1 (cont.)

```

5      (void) puts("\n", fx);
      for (i = 0; i < 2; i++) {
          if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *out[i] != '\n')) {
              if (i == 0)
                  nms(i);
              if (i == 0 && *out[i])
                  stars(i);
              putline(i);
              if (i == 0 && *out[i])
                  printf("x, star);
              if (i == 1)
                  nms(i);
          }
      }
20  /*
      * put out a number line: dumpblock()
      */
      static
      nms(ix)
25  {
      int      ix; /* index in out[] holding seq line */
      char      nline[P_LINE];
      register char i, j;
      register char *pn, *px, *py;
30      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 == '\n')
35              *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
45                  *pn = ' ';
              i++;
          }
      }
      *pn = '\0';
      nc[ix] = i;
      for (pn = nline; *pn; pn++)
50          (void) puts("pn, fx);
      (void) puts("\n", fx);
55  }
      /*
      * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
      */
      static
      putline(ix)
60  {
      int      ix;
      }

```

...dumpblock

nms

putline

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 1 (cont.)

```

5      int      i;
      register char *px;

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

      /* these count from 1:
       * nl[] is current element (from 1)
       * nc[] is number at start of current line
       */
15     for (px = out[ix]; *px; px++)
          (void) putc(*px&0x7F, fx);
      (void) putc('\n', fx);
20 }

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

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(p0[0]) == ' ')) ||
        (!*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(p1[0]) == ' '))
30     return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
40         if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbrn[*p0-'A'] && xbrn[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && day[*p0-'A'] && [*p1-'A'] > 0)
45                 cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
50             cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
55     *px = '\0';
}
60

```

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 1 (cont')

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

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
15         py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
20 }

25

30

35

40

45

50

55

60
```

stripname

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 1 (cont')

```

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

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

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

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

/*
30 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ':', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
35 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 = (open(file, "r")) == 0) {
45         fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
50         if (*line == ':' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
55     }
    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';
60

```



WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 1 (cont')

```

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

      while (fgets(line, 1024, fp)) {
          if (*line == ':' || *line == '<' || *line == '>')
              continue;
10         for (px = line; *px != '\n'; px++) {
            if (isupper(*px))
                *py++ = *px;
            else if (islower(*px))
                *py++ = toupper(*px);
15             if (index("ATGCU", *(py-1)))
                narg++;
        }
        *py++ = '\0';
        *py = '\0';
        (void) fclose(fp);
        dna = narg > (ilen/3);
        return(pseq+4);
20     }

25     char *
    g_mallocmsg, nx, sz;
    char *msg;
    int nx, sz;
    /* program calling routine */
    /* number and size of elements */
30     {
        char *px, *calloc();

        if ((px = calloc(unsigned(nx), (unsigned)sz)) == 0) {
            if (*msg) {
35                 fprintf(stderr, "%s: g_malloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                exit(1);
            }
            return(px);
40     }

    /*
    * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax; main()
    */
45     readjmps()
    {
        int fd = -1;
        int siz, i0, i1;
        register i, j, xx;
50         if (!f) {
            (void) fclose(f);
            if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                fprintf(stderr, "%s: can't open %s\n", prog, jname);
                cleanup(1);
55             }
        }
        for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++) {
            while (1) {
60                 for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)

```

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 1 (cont')

```

5         if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
            (void) fseek(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].jmp = MAXJMP-1;
        }
10        else
            break;
        }
        if (i >= JMPS) {
            fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment('n', prog);
15            cleanup(1);
        }
        if (j >= 0) {
            siz = dx[dmax].jp.n[j];
            xx = dx[dmax].jp.x[j];
            dmax += siz;
20            if (siz < 0) {
                /* gap in second seq */
                pp[1].n[i] = -siz;
                xx += siz;
                /* id = xx - yy + len1 - 1
                */
                pp[1].x[i] = xx - dmax + len1 - 1;
                gapy += 1;
                ngapy -= siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (-siz < MAXGAP ? -siz : MAXGAP;
30            i1 += 1;
        }
        else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
            pp[0].n[i0] = siz;
            pp[0].x[i0] = xx;
            gapx += 1;
            ngapx += siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (siz < MAXGAP ? siz : MAXGAP;
40            i0 += 1;
        }
        }
        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;
50    }
    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;
55    }
    if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
    if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
60    }
}

```

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 1 (cont.)

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
5 writejmps(ix)    writejmps
   int            ix;
{
   char           *mktmp;
10   if (!fj) {
       if (mktmp(jname) < 0) {
           fprintf(stderr, "%s: can't mktmp() %s\n", prog, jname);
           cleanup(1);
15       }
       if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
           fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
           exit(1);
20       }
       (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
       (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
   }
}
25
30
35
40
45
50
55
60
```

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 2

|                      |                  |                           |
|----------------------|------------------|---------------------------|
| PRO                  | XXXXXXXXXXXXXXXX | (Length = 15 amino acids) |
| 5 Comparison Protein | XXXXXYYYYYYY     | (Length = 12 amino acids) |

% amino acid sequence identity =

(the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by  
10 ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the PRO polypeptide) =

5 divided by 15 = 33.3%

WO 00/53758

PCT/US00/05941

Table 3

|                    |                                                                                                                |                           |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| PRO                | XXXXXXXXXX                                                                                                     | (Length = 10 amino acids) |
| Comparison Protein | XXXXXYYYYYZZYZ                                                                                                 | (Length = 15 amino acids) |
| 5                  | % amino acid sequence identity =                                                                               |                           |
|                    | (the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by |                           |
|                    | ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the PRO polypeptide) =                         |                           |
| 10                 | 5 divided by 10 = 50%                                                                                          |                           |

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 4

|                |                |                           |
|----------------|----------------|---------------------------|
| PRO-DNA        | NNNNNNNNNNNNNN | (Length = 14 nucleotides) |
| Comparison DNA | NNNNNNLLLLLLLL | (Length = 16 nucleotides) |

5

% nucleic acid sequence identity =

(the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by ALIGN-2)  
divided by (the total number of nucleotides of the PRO-DNA nucleic acid sequence) =

10

6 divided by 14 = 42.9%

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Table 5

|                |                                                                                                                  |                           |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| PRO-DNA        | NNNNNNNNNNNN                                                                                                     | (Length = 12 nucleotides) |
| Comparison DNA | NNNNLLLV                                                                                                         | (Length = 9 nucleotides)  |
| 5              | % nucleic acid sequence identity =                                                                               |                           |
|                | (the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by ALIGN-2) |                           |
|                | divided by (the total number of nucleotides of the PRO-DNA nucleic acid sequence) =                              |                           |
| 10             | 4 divided by 12 = 33.3%                                                                                          |                           |

WO 00/53758

PCT/US00/05841

II. Compositions and Methods of the Invention1. Preparation of the PRO polypeptides of the invention

The present invention provides newly identified and isolated nucleotide sequences encoding the polypeptides in the present application as PRO polypeptides. In particular, cDNAs encoding various PRO polypeptides have been identified and isolated, as disclosed in further detail in the Examples below. It is noted that proteins produced in separate expression rounds may be given different PRO numbers but the UNQ number is unique for any given DNA and the encoded protein, and will not be changed. However, for the sake of simplicity, in the present specification the protein encoded by the full length native nucleic acid molecules disclosed herein as well as all further native homologues and variants included in the foregoing definition of PRO, will be referred to as "PRO/number" or even "PRO", regardless of their origin or mode of preparation.

In particular, cDNA encoding a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1358, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 and PRO5727 polypeptide (corresponding to UNQ174, UNQ178, UNQ186, UNQ190, UNQ200, UNQ214, UNQ209, UNQ219, UNQ146, UNQ240, UNQ239, UNQ293, UNQ330, UNQ365, UNQ316, UNQ317, UNQ318, UNQ319, UNQ313, UNQ332, UNQ334, UNQ540, UNQ434, UNQ408, UNQ407, UNQ430, UNQ557, UNQ491, UNQ598, UNQ516, UNQ701, UNQ585, UNQ633, UNQ678, UNQ606, UNQ630, UNQ653, UNQ608, UNQ698, UNQ732, UNQ722, UNQ728, UNQ900, UNQ859, UNQ179, UNQ21, UNQ236, UNQ303, UNQ294, UNQ322, UNQ388, UNQ435, UNQ433, UNQ483, UNQ545, UNQ589, UNQ707, UNQ685, UNQ693, UNQ739, UNQ1888, UNQ1866, UNQ1947 and UNQ2448, respectively) has been identified and isolated, as disclosed in further detail in the Examples below.

In even greater particularity, the present specification describes the cDNAs DNA29101-1276, DNA30871-1157, DNA30942-1134, DNA33087-1158, DNA33460-1166, DNA34387-1138, DNA35558-1167, DNA35638-1141, DNA35916-1161, DNA39523-1192, DNA40620-1183, DNA40982-1235, DNA44184-1319, DNA44205-1285, DNA45410-1250, DNA45416-1251, DNA45419-1252, DNA47365-1206, DNA47470-1130, DNA48314-1320, DNA49435-1219, DNA50921-1458, DNA53974-1401, DNA54228-1366, DNA54231-1366, DNA56405-1357, DNA57033-1403, DNA57690-1374, DNA59220-1514, DNA59294-1381, DNA59776-1600, DNA59849-1504, DNA60775-1532, DNA61873-1574, DNA62814-1521, DNA64885-1529, DNA65404-1551, DNA65412-1523, DNA66675-1587, DNA68864-1629, DNA68872-1620, DNA68874-1622, DNA76400-2528, DNA77624-2515, DNA30868-1156, DNA36638-1056, DNA38260-1180, DNA40592-1242, DNA41374-1312, DNA44194-1317, DNA53517-1366, DNA53971-1359, DNA53987-1438, DNA57700-1408, DNA59620-1463, DNA60627-1508, DNA64890-1612, DNA66659-1593, DNA66667-1596, DNA68818-2536, DNA84210-2576, DNA92218-2554, DNA96878-2626, DNA98853-1739 which encode native sequence PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769,



WO 00/53758

PCT/US00/05841

PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 and PRO5727 polypeptides, respectively.

As disclosed in the Examples below, various cDNA clones have been deposited with the ATCC. The actual nucleotide sequence of those clones can readily be determined by the skilled artisan by sequencing of the deposited clone using routine methods in the art. It is understood that the sequence of the deposit contains the correct sequence in the event of a discrepancy between the deposited sequence and those disclosed herein. The predicted amino acid sequence can be determined from the nucleotide sequence using routine skill. For the PRO polypeptides and encoding nucleic acids described herein, Applicants have identified what is believed to be the reading frame best identifiable with the sequence information available at the time.

#### B. PRO Polypeptide Variants

In addition to the full-length native sequence PRO polypeptides described herein, it is contemplated that PRO variants can be prepared. PRO variants can be prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the PRO DNA, and/or by synthesis of the desired PRO polypeptide. Those skilled in the art will appreciate that amino acid changes may alter post-translational processes of the PRO, such as changing the number or position of glycosylation sites or altering the membrane anchoring characteristics.

Variations in the native full-length PRO sequence or in various domains of the PRO described herein, can be made, for example, using any of the techniques and guidelines for conservative and non-conservative mutations set forth, for instance, in U.S. Patent No. 5,364,934. Variations may be a substitution, deletion or insertion of one or more codons encoding the PRO that results in a change in the amino acid sequence of the PRO as compared with the native sequence PRO. Optionally the variation is by substitution of at least one amino acid with any other amino acid in one or more of the domains of the PRO. Guidance in determining which amino acid residue may be inserted, substituted or deleted without adversely affecting the desired activity may be found by comparing the sequence of the PRO with that of homologous known protein molecules and minimizing the number of amino acid sequence changes made in regions of high homology. Amino acid substitutions can be the result of replacing one amino acid with another amino acid having similar structural and/or chemical properties, such as the replacement of a leucine with a serine, *i.e.*, conservative amino acid replacements. Insertions or deletions may optionally be in the range of about 1 to 5 amino acids. The variation allowed may be determined by systematically making insertions, deletions or substitutions of amino acids in the sequence and testing the resulting variants for activity exhibited by the full-length or mature native sequence.

PRO polypeptide fragments are provided herein. Such fragments may be truncated at the N-terminus or C-terminus, or may lack internal residues, for example, when compared with a full length native protein. Certain fragments lack amino acid residues that are not essential for a desired biological activity of the PRO polypeptide.

PRO fragments may be prepared by any of a number of conventional techniques. Desired peptide fragments may be chemically synthesized. An alternative approach involves generating PRO fragments by enzymatic digestion, *e.g.*, by treating the protein with an enzyme known to cleave proteins at sites defined by

WO 00/53758

PCT/US00/05841

particular amino acid residues, or by digesting the DNA with suitable restriction enzymes and isolating the desired fragment. Yet another suitable technique involves isolating and amplifying a DNA fragment encoding a desired polypeptide fragment, by polymerase chain reaction (PCR). Oligonucleotides that define the desired termini of the DNA fragment are employed at the 5' and 3' primers in the PCR. Preferably, PRO polypeptide fragments share at least one biological and/or immunological activity with the native PRO polypeptide disclosed herein.

In particular embodiments, conservative substitutions of interest are shown in Table 6 under the heading of preferred substitutions. If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated exemplary substitutions in Table 6, or as further described below in reference to amino acid classes, are introduced and the products screened.

| Table 6 |                                   |                                          |                                          |
|---------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|         | <u>Original</u><br><u>Residue</u> | <u>Exemplary</u><br><u>Substitutions</u> | <u>Preferred</u><br><u>Substitutions</u> |
| 15      | 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                                      |
| 20      | 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;                 |                                          |
| 25      |                                   | norleucine                               | leu                                      |
|         | Leu (L)                           | norleucine; ile; val;                    |                                          |
|         |                                   | met; ala; phe                            | ile                                      |
|         | Lys (K)                           | arg; gln; asn                            | arg                                      |
|         | Met (M)                           | leu; phe; ile                            | leu                                      |
| 30      | 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                                      |
| 35      | Tyr (Y)                           | trp; phe; thr; ser                       | phe                                      |
|         | Val (V)                           | ile; leu; met; phe;                      |                                          |
|         |                                   | ala; norleucine                          | leu                                      |

Substantial modifications in function or immunological identity of the invention polypeptide are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure

WO 00/53758

PCT/US00/05841

of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

(1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;

5 (2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;

(3) acidic: asp, glu;

(4) basic: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and

(6) aromatic: trp, tyr, phe.

10 Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class. Such substituted residues also may be introduced into the conservative substitution sites or, more preferably, into the remaining (non-conserved) sites.

The variations can be made using methods known in the art such as oligonucleotide-mediated (site-directed) mutagenesis, alanine scanning, and PCR mutagenesis. Site-directed mutagenesis (Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **13**:4331 (1986); Zoller *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **10**:6487 (1987)), cassette mutagenesis (Wells *et al.*, *Gene*, **34**:315 (1985)), restriction selection mutagenesis (Wells *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A*, **317**:415 (1986)) or other known techniques can be performed on the cloned DNA to produce the PRO variant variant DNA.

Scanning amino acid analysis can also be employed to identify one or more amino acids along a contiguous sequence. Among the preferred scanning amino acids are relatively small, neutral amino acids. Such amino acids include alanine, glycine, serine, and cysteine. Alanine is typically a preferred scanning amino acid among this group because it eliminates the side-chain beyond the beta-carbon and is less likely to alter the main-chain conformation of the variant [Cunningham and Wells, *Science*, **244**: 1081-1085 (1989)]. Alanine is also typically preferred because it is the most common amino acid. Further, it is frequently found in both buried and exposed positions [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.): Chothia, *J. Mol. Biol.*, **150**:1 (1976)]. If alanine substitution does not yield adequate amounts of variant, an isoteric amino acid can be used.

#### C. Modifications of PRO

Covalent modifications of PRO polypeptides are included within the scope of this invention. One type of covalent modification includes reacting targeted amino acid residues of a PRO polypeptide with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the N- or C- terminal residues of the PRO. Derivatization with bifunctional agents is useful, for instance, for crosslinking PRO to a water-insoluble support matrix or surface for use in the method for purifying anti-PRO antibodies, and vice-versa. Commonly used crosslinking agents include, *e.g.*, 1,1-bis(diazocetyl)-2-phenylethane, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimide esters, for example, esters with 4-azidosalicylic acid, homobifunctional imidoesters, including disuccinimidyl esters such as 3,3'-dithiobis(succinimidylpropionate), bifunctional maleimides such as bis-N-maleimido-1,8-octane and agents such as methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propionimidate.

Other modifications include deamidation of glutaminyl and asparaginyl residues to the corresponding glutamyl and aspartyl residues, respectively, hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl or threonyl residues, methylation of the  $\alpha$ -amino groups of lysine, arginine, and histidine side

WO 00/53758

PCT/US00/05841

chains [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], acetylation of the N-terminal amine, and amidation of any C-terminal carboxyl group.

Another type of covalent modification of the PRO polypeptide included within the scope of this invention comprises altering the native glycosylation pattern of the polypeptide. "Altering the native glycosylation pattern" is intended for purposes herein to mean deleting one or more carbohydrate moieties found in native sequence PRO polypeptide (either by removing the underlying glycosylation site or by deleting the glycosylation by chemical and/or enzymatic means), and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the native sequence PRO. In addition, the phrase includes qualitative changes in the glycosylation of the native proteins, involving a change in the nature and proportions of the various carbohydrate moieties present.

Addition of glycosylation sites to the PRO polypeptide may be accomplished by altering the amino acid sequence. The alteration may be made, for example, by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the native sequence PRO (for O-linked glycosylation sites). The PRO amino acid sequence may optionally be altered through changes at the DNA level, particularly by mutating the DNA encoding the PRO polypeptide at preselected bases such that codons are generated that will translate into the desired amino acids.

Another means of increasing the number of carbohydrate moieties on the PRO polypeptide is by chemical or enzymatic coupling of glycosides to the polypeptide. Such methods are described in the art, e.g., in WO 87.05330 published 11 September 1987, and in Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

Removal of carbohydrate moieties present on the PRO polypeptide may be accomplished chemically or enzymatically or by mutational substitution of codons encoding for amino acid residues that serve as targets for glycosylation. Chemical deglycosylation techniques are known in the art and described, for instance, by Hakimuddin, *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) and by Edge *et al.*, *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). Enzymatic cleavage of carbohydrate moieties on polypeptides can be achieved by the use of a variety of endo- and exo-glycosidases as described by Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Another type of covalent modification of PRO comprises linking the PRO polypeptide to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol, or polyoxyalkylenes, in the manner set forth in U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337.

The PRO polypeptides may also be modified in a way to form a chimeric molecule comprising the invention polypeptide fused to another, heterologous polypeptide or amino acid sequence.

In one embodiment, such a chimeric molecule comprises a fusion of the PRO with a tag polypeptide which provides an epitope to which an anti-tag antibody can selectively bind. The epitope tag is generally placed at the amino- or carboxyl- terminus of the PRO. The presence of such epitope-tagged forms of the PRO polypeptide can be detected using an antibody against the tag polypeptide. Also, provision of the epitope tag enables the PRO to be readily purified by affinity purification using an anti-tag antibody or another type of affinity matrix that binds to the epitope tag. Various tag polypeptides and their respective antibodies are well known in the art. Examples include poly-histidine (poly-his) or poly-histidine-glycine (poly-his-gly) tags; the flu HA tag polypeptide and its antibody 12CA5 [Field *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]; the c-myc

WO 00/53758

PCT/US00/05841

tag and the 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 and 9E10 antibodies thereto [Evan *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; and the Herpes Simplex virus glycoprotein D (gD) tag and its antibody [Paborsky *et al.*, *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]. Other tag polypeptides include the Flag-peptide [Hopp *et al.*, *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; the KT3 epitope peptide [Martin *et al.*, *Science*, 255:192-194 (1992)]; an  $\alpha$ -nubulin epitope peptide [Skinner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]; and the T7 gene 10 protein peptide tag [Lutz-Freyermuth *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

In an alternative embodiment, the chimeric molecule may comprise a fusion of the PRO polypeptide with an immunoglobulin or a particular region of an immunoglobulin. For a bivalent form of the chimeric molecule (also referred to as an "immunoadhesin"), such a fusion could be to the Fc region of an IgG molecule. The Ig fusions preferably include the substitution of a soluble (transmembrane domain deleted or inactivated) form of an invention polypeptide in place of at least one variable region within an Ig molecule. In a particularly preferred embodiment, the immunoglobulin fusion includes the hinge, CH2 and CH3, or the hinge, CH1, CH2 and CH3 regions of an IgG1 molecule. For the production of immunoglobulin fusions see also US Patent No. 5,428,130 issued June 27, 1995.

#### 15 D. Preparation of PRO

The description below relates to production of PRO by culturing cells transformed or transfected with a vector containing PRO nucleic acid. It is, of course, contemplated that alternative methods, which are well known in the art, may be employed to prepare PRO. For instance, the PRO sequence, or portions thereof, may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques [see, e.g., Stewart *et al.*, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2154 (1963)]. *In vitro* protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be accomplished, for instance, using an Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) using the manufacturer's instructions. Various portions of the PRO may be chemically synthesized separately and combined using chemical or enzymatic methods to produce the full-length PRO.

#### 1. Isolation of DNA Encoding the PRO Polypeptide(s)

DNA encoding the PRO may be obtained from a cDNA library prepared from tissue believed to possess the polypeptide mRNA and to express it at a detectable level. Accordingly, human PRO DNA can be conveniently obtained from a cDNA library prepared from human tissue, such as described in the Examples. The PRO-encoding gene may also be obtained from a genomic library, oligonucleotide synthesis, or other known synthetic procedures (e.g., automated nucleic acid synthesis).

Libraries can be screened with probes (such as antibodies to the PRO polypeptide or oligonucleotides of at least about 20-80 bases) designed to identify the gene of interest or the protein encoded by it. Screening the cDNA or genomic library with the selected probe may be conducted using standard procedures, such as described in Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). An alternative means to isolate the gene encoding the PRO polypeptide is to use PCR methodology [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

The Examples below describe techniques for screening a cDNA library. The oligonucleotide sequences selected as probes should be of sufficient length and sufficiently unambiguous that false positives

WO 00/53758

PCT/US00/05841

are minimized. The oligonucleotide is preferably labeled such that it can be detected upon hybridization to DNA in the library being screened. Methods of labeling are well known in the art, and include the use of radiolabels like  $^{32}\text{P}$ -labeled ATP, biotinylation or enzyme labeling. Hybridization conditions, including moderate stringency and high stringency, are provided in Sambrook *et al.*, *supra*.

Sequences identified in such library screening methods can be compared and aligned to other known sequences deposited and available in public databases such as GenBank or other private sequence databases. Sequence identity (at either the amino acid or nucleotide level) within defined regions of the molecule or across the full-length sequence can be determined using methods known in the art and as described herein.

Nucleic acid having protein coding sequence may be obtained by screening selected cDNA or genomic libraries using the deduced amino acid sequence disclosed herein for the first time, and, if necessary, using conventional primer extension procedures as described in Sambrook *et al.*, *supra*, to detect precursors and processing intermediates of mRNA that may not have been reverse-transcribed into cDNA.

## 2. Selection and Transformation of Host Cells

Host cells are transfected or transformed with expression or cloning vectors described herein for production of the PRO polypeptides and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences. The culture conditions, such as media, temperature, pH and the like, can be selected by the skilled artisan without undue experimentation. In general, principles, protocols, and practical techniques for maximizing the productivity of cell cultures can be found in *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) and Sambrook *et al.*, *supra*.

Methods of transfection are known to the ordinarily skilled artisan, for example,  $\text{CaPO}_4$  and electroporation. Depending on the host cell used, transformation is performed using standard techniques appropriate to such cells. The calcium treatment employing calcium chloride, as described in Sambrook *et al.*, *supra*, or electroporation is generally used for prokaryotes or other cells that contain substantial cell-wall barriers. Infection with *Agrobacterium tumefaciens* is used for transformation of certain plant cells, as described by Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) and WO 89/05859 published 29 June 1989. For mammalian cells without such cell walls, the calcium phosphate precipitation method of Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978) can be employed. General aspects of mammalian cell host system transformations have been described in U.S. Patent No. 4,399,216. Transformations into yeast are typically carried out according to the method of Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) and Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). However, other methods for introducing DNA into cells, such as by nuclear microinjection, electroporation, bacterial protoplast fusion with intact cells, or polycations, e.g., polybrene, polyornithine, may also be used. For various techniques for transforming mammalian cells, see Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) and Mansour *et al.*, *Nature*, 336:348-352 (1988).

Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein include prokaryote, yeast, or higher eukaryote cells. Suitable prokaryotes include but are not limited to eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms, for example, Enterobacteriaceae such as *E. coli*. Various *E. coli* strains are publicly available, such as *E. coli* K12 strain MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* strain W3110 (ATCC 27,325) and K5 772 (ATCC 53,635). Other suitable prokaryotic host cells include Enterobacteriaceae such as *Escherichia*, e.g., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*,

WO 00/53758

PCT/US00/05841

e.g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e.g., *Serratia marcescens*, and *Shigella*, as well as *Bacilli* such as *B. subtilis* and *B. licheniformis* (e.g., *B. licheniformis* 41P disclosed in DD 266.710 published 12 April 1989), *Pseudomonas* such as *P. aeruginosa*, and *Streptomyces*. These examples are illustrative rather than limiting. Strain W3110 is one particularly preferred host or parent host because it is a common host strain for recombinant DNA product fermentations. Preferably, the host cell secretes minimal amounts of proteolytic enzymes. For example, strain W3110 may be modified to effect a genetic mutation in the genes encoding proteins endogenous to the host, with examples of such hosts including *E. coli* W3110 strain 1A2, which has the complete genotype *tonA*; *E. coli* W3110 strain 9E4, which has the complete genotype *tonA pir3*; *E. coli* W3110 strain 27C7 (ATCC 55,244), which has the complete genotype *tonA pir3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan*; *E. coli* W3110 strain 37D6, which has the complete genotype *tonA pir3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 thrG kan*; *E. coli* W3110 strain 40B4, which is strain 37D6 with a non-kanamycin resistant *degP* deletion mutation; and an *E. coli* strain having mutant periplasmic protease disclosed in U.S. Patent No. 4,946,783 issued 7 August 1990. Alternatively, *in vitro* methods of cloning, e.g., PCR or other nucleic acid polymerase reactions, are suitable.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning or expression hosts for PRO-encoding vectors. *Saccharomyces cerevisiae* is a commonly used lower eukaryotic host microorganism. Others include *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; EP 139,383 published 2 May 1985); *Kluyveromyces* hosts (U.S. Patent No. 4,943,529; Fleet *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)) such as, e.g., *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, *J. Bacteriol.*, 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilum* (ATCC 36,906; Van den Berg *et al.*, *Bio/Technology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, and *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna *et al.*, *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* such as *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 published 31 October 1990); and filamentous fungi such as, e.g., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 published 10 January 1991), and *Aspergillus* hosts such as *A. nidulans* (Ballance *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 [1983]; Tilburn *et al.*, *Gene*, 26:205-221 [1983]; Yelton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) and *A. niger* (Kelly and Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985]). Methylophilic yeasts are suitable herein and include, but are not limited to, yeast capable of growth on methanol selected from the genera consisting of *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, and *Rhodotorula*. A list of specific species that are exemplary of this class of yeasts may be found in C. Anthony, *The Biochemistry of Methylophilic Yeasts*, 269 (1982).

Suitable host cells for the expression of glycosylated PRO polypeptides are derived from multicellular organisms. Examples of invertebrate cells include insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* S9, as well as plant cells. Examples of useful mammalian host cell lines include Chinese hamster ovary (CHO) and COS cells. More specific examples include monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); Chinese hamster ovary cells-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); mouse sertoli cells (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); and mouse

WO 00/53758

PCT/US00/05841

mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51). The selection of the appropriate host cell is deemed to be within the skill in the art.

### 3. Selection and Use of a Replicable Vector

The nucleic acid (e.g., cDNA or genomic DNA) encoding the PRO polypeptides may be inserted into a replicable vector for cloning (amplification of the DNA) or for expression. Various vectors are publicly available. The vector may, for example, be in the form of a plasmid, cosmid, viral particle, phagemid or phage. The appropriate nucleic acid sequence may be inserted into the vector by a variety of procedures. In general, DNA is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) using techniques known in the art. Vector components generally include, but are not limited to, one or more of a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence. Construction of suitable vectors containing one or more of these components employs standard ligation techniques which are known to the skilled artisan.

The PRO may be produced recombinantly not only directly, but also as a fusion polypeptide with a heterologous polypeptide, which may be a signal sequence or other polypeptide having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide. In general, the signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of the PRO-encoding DNA that is inserted into the vector. The signal sequence may be a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, lpp, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion the signal sequence may be, e.g., the yeast invertase leader, alpha factor leader (including *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*  $\alpha$ -factor leaders, the latter described in U.S. Patent No. 5,010,182), or acid phosphatase leader, the *C. albicans* glucosylase leader (EP 362,179 published 4 April 1990), or the signal described in WO 90/13646 published 15 November 1990. In mammalian cell expression, mammalian signal sequences may be used to direct secretion of the protein, such as signal sequences from secreted polypeptides of the same or related species, as well as viral secretory leaders.

Both expression and cloning vectors contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. Such sequences are well known for a variety of bacteria, yeast, and viruses. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria, the 2 $\mu$  plasmid origin is suitable for yeast, and various viral origins (SV40, polyoma, adenovirus, VSV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells.

Expression and cloning vectors will typically contain a selection gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients not available from complex media, e.g., the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*.

An example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the PRO-encoding nucleic acid, such as DHFR or thymidine kinase. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the CHO cell line deficient in DHFR activity, prepared and propagated as described by Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). A suitable selection gene for use in yeast is the *trp1* gene present in the yeast plasmid YRp7 [Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene*, 10:157 (1980)]. The *trp1* gene provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example,



WO 00/53758

PCT/US00/05841

ATCC No. 44076 or PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

Expression and cloning vectors usually contain a promoter operably linked to the PRO-encoding nucleic acid sequence to direct mRNA synthesis. Promoters recognized by a variety of potential host cells are well known. Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the  $\beta$ -lactamase and lactose promoter systems [Chang *et al.*, *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature*, 281:544 (1979)], alkaline phosphatase, a tryptophan (trp) promoter system [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36,776], and hybrid promoters such as the tac promoter [deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Promoters for use in bacterial systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding PRO.

Examples of suitable promoting sequences for use with yeast hosts include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase [Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] or other glycolytic enzymes [Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phospho-fructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase.

Other yeast promoters, which are inducible promoters having the additional advantage of transcription controlled by growth conditions, are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytocrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, metallothionein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in EP 73,657.

PRO transcription from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus (UK 2,211,504 published 5 July 1989), adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40), from heterologous mammalian promoters, e.g., the actin promoter or an immunoglobulin promoter, and from heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.

Transcription of a DNA encoding the PRO polypeptide by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp, that act on a promoter to increase its transcription. Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase, albumin,  $\alpha$ -fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the coding sequence of the PRO polypeptide, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors used in eukaryotic host cells (yeast, fungi, insect, plant, animal, human, or nucleated cells from other multicellular organisms) will also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and, occasionally 3', untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding PRO.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Still other methods, vectors, and host cells suitable for adaptation to the synthesis of the PRO polypeptide in recombinant vertebrate cell culture are described in Gething *et al.*, *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantel *et al.*, *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117,060; and EP 117,058.

#### 4. Detecting Gene Expression

Gene expression may be measured in a sample directly, for example, by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequences provided herein. Alternatively, antibodies may be employed that can recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes. The antibodies in turn may be labeled and the assay may be carried out where the duplex is bound to a surface, so that upon the formation of duplex on the surface, the presence of antibody bound to the duplex can be detected.

Gene expression, alternatively, may be measured by immunological methods, such as immunohistochemical staining of cells or tissue sections and assay of cell culture or body fluids, to quantitate directly the expression of gene product. Antibodies useful for immunohistochemical staining and/or assay of sample fluids may be either monoclonal or polyclonal, and may be prepared in any mammal. Conveniently, the antibodies may be prepared against a native sequence PRO polypeptide or against a synthetic peptide based on the DNA sequences provided herein or against exogenous sequence fused to DNA encoding the PRO polypeptide and encoding a specific antibody epitope.

#### 5. Purification of Polypeptide

Forms of the PRO may be recovered from culture medium or from host cell lysates. If membrane-bound, it can be released from the membrane using a suitable detergent solution (*e.g.*, Triton<sup>®</sup>-X 100) or by enzymatic cleavage. Cells employed in expression of the PRO polypeptide can be disrupted by various physical or chemical means, such as freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or cell lysing agents.

It may be desired to purify PRO polypeptide from recombinant cell proteins or polypeptides. The following procedures are exemplary of suitable purification procedures: by fractionation on an ion-exchange column; ethanol precipitation; reverse phase HPLC; chromatography on silica or on a cation-exchange resin such as DEAE; chromatofocusing; SDS-PAGE; ammonium sulfate precipitation; gel filtration using, for example, Sephadex G-75; protein A Sepharose columns to remove contaminants such as IgG; and metal chelating columns to bind epitope-tagged forms of the PRO polypeptide. Various methods of protein purification may be employed and such methods are known in the art and described for example in Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). The purification step(s) selected will depend, for example, on the nature of the production process used and the particular PRO polypeptide produced.

#### E. Tissue Distribution

The location of tissues expressing the PRO can be identified by determining mRNA expression in various human tissues. The location of such genes provides information about which tissues are most likely to be affected by the stimulating and inhibiting activities of the PRO polypeptides. The location of a gene in a specific tissue also provides sample tissue for the activity blocking assays discussed below.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

As noted before, gene expression in various tissues may be measured by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 [1980]), dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequences provided herein. Alternatively, antibodies may be employed that can recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes.

Gene expression in various tissues, alternatively, may be measured by immunological methods, such as immunohistochemical staining of tissue sections and assay of cell culture or body fluids, to quantitate directly the expression of gene product. Antibodies useful for immunohistochemical staining and/or assay of sample fluids may be either monoclonal or polyclonal, and may be prepared in any mammal. Conveniently, the antibodies may be prepared against a native sequence of a PRO polypeptide or against a synthetic peptide based on the DNA sequences encoding the PRO polypeptide or against an exogenous sequence fused to a DNA encoding a PRO polypeptide and encoding a specific antibody epitope. General techniques for generating antibodies, and special protocols for Northern blotting and *in situ* hybridization are provided below.

#### F. Antibody Binding Studies

The activity of the PRO polypeptides can be further verified by antibody binding studies, in which the ability of anti-PRO200, anti-PRO204, anti-PRO212, anti-PRO216, anti-PRO226, anti-PRO240, anti-PRO235, anti-PRO245, anti-PRO172, anti-PRO273, anti-PRO272, anti-PRO332, anti-PRO526, anti-PRO701, anti-PRO361, anti-PRO362, anti-PRO363, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO531, anti-PRO533, anti-PRO1083, anti-PRO865, anti-PRO770, anti-PRO769, anti-PRO788, anti-PRO1114, anti-PRO1007, anti-PRO1184, anti-PRO1031, anti-PRO1346, anti-PRO1155, anti-PRO1250, anti-PRO1312, anti-PRO1192, anti-PRO1246, anti-PRO1283, anti-PRO1195, anti-PRO1343, anti-PRO1418, anti-PRO1387, anti-PRO1410, anti-PRO1917, anti-PRO1868, anti-PRO205, anti-PRO21, anti-PRO269, anti-PRO344, anti-PRO333, anti-PRO381, anti-PRO720, anti-PRO866, anti-PRO840, anti-PRO982, anti-PRO836, anti-PRO1159, anti-PRO1358, anti-PRO1325, anti-PRO1338, anti-PRO1434, anti-PRO4333, anti-PRO4302, anti-PRO4430 or anti-PRO5727 antibodies to inhibit the effect of the PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727 polypeptides, respectively, on tissue cells is tested. Exemplary antibodies include polyclonal, monoclonal, humanized, bispecific, and heteroconjugate antibodies, the preparation of which will be described hereinbelow.

Antibody binding studies may be carried out in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

Competitive binding assays rely on the ability of a labeled standard to compete with the test sample analyte for binding with a limited amount of antibody. The amount of target protein in the test sample is inversely proportional to the amount of standard that becomes bound to the antibodies. To facilitate

WO 00/53758

PCT/US00/05841

determining the amount of standard that becomes bound, the antibodies preferably are insolubilized before or after the competition, so that the standard and analyte that are bound to the antibodies may conveniently be separated from the standard and analyte which remain unbound.

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

For immunohistochemistry, the tissue sample may be fresh or frozen or may be embedded in paraffin and fixed with a preservative such as formalin, for example.

#### G. Cell-Based Assays

Cell-based assays and animal models for immune related diseases can be used to further understand the relationship between the genes and polypeptides identified herein and the development and pathogenesis of immune related disease.

In a different approach, cells of a cell type known to be involved in a particular immune related disease are transfected with the cDNAs described herein, and the ability of these cDNAs to stimulate or inhibit immune function is analyzed. Suitable cells can be transfected with the desired gene, and monitored for immune function activity. Such transfected cell lines can then be used to test the ability of poly- or monoclonal antibodies or antibody compositions to inhibit or stimulate immune function, for example to modulate T-cell proliferation or inflammatory cell infiltration. Cells transfected with the coding sequences of the genes identified herein can further be used to identify drug candidates for the treatment of immune related diseases.

In addition, primary cultures derived from transgenic animals (as described below) can be used in the cell-based assays herein, although stable cell lines are preferred. Techniques to derive continuous cell lines from transgenic animals are well known in the art (see, e.g., Small *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5: 642-648 (1985)).

One suitable cell based assay is the mixed lymphocyte reaction (MLR). *Current Protocols in Immunology*, unit 3.12; edited by J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober, National Institutes of Health. Published by John Wiley & Sons, Inc. In this assay, the ability of a test compound to stimulate or inhibit the proliferation of activated T cells is assayed. A suspension of responder T cells is cultured with allogeneic stimulator cells and the proliferation of T cells is measured by uptake of tritiated thymidine. This assay is a general measure of T cell reactivity. Since the majority of T cells respond to and produce IL-2 upon activation, differences in responsiveness in this assay in part reflect differences in IL-2 production by the responding cells. The MLR results can be verified by a standard lymphokine (IL-2) detection assay. *Current Protocols in Immunology*, above, 3.15, 6.3.

A proliferative T cell response in an MLR assay may be due to direct mitogenic properties of an assayed molecule or to external antigen induced activation. Additional verification of the T cell stimulatory activity of the PRO polypeptides can be obtained by a costimulation assay. T cell activation requires an antigen specific signal mediated through the T-cell receptor (TCR) and a costimulatory signal mediated

WO 00/53758

PCT/US00/05841

through a second ligand binding interaction, for example, the B7 (CD80, CD86)/CD28 binding interaction. CD28 crosslinking increases lymphokine secretion by activated T cells. T cell activation has both negative and positive controls through the binding of ligands which have a negative or positive effect. CD28 and CTLA-4 are related glycoproteins in the Ig superfamily which bind to B7. CD28 binding to B7 has a positive costimulation effect of T cell activation; conversely, CTLA-4 binding to B7 has a negative T cell deactivating effect. Chambers, C. A. and Allison, J. P., *Curr. Opin. Immunol.* (1997) 9:396. Schwartz, R. H., *Cell* (1992) 71:1065; Linsey, P. S. and Ledbetter, J. A., *Annu. Rev. Immunol.* (1993) 11:191; June, C. H. *et al. Immunol. Today* (1994) 15:321; Jenkins, M. K., *Immunity* (1994) 1:405. In a costimulation assay, the PRO polypeptides are assayed for T cell costimulatory or inhibitory activity.

PRO polypeptides, as well as other compounds of the invention, which are stimulators (costimulators) of T cell proliferation and agonists, e.g., agonist antibodies, thereto as determined by MLR and costimulation assays, for example, are useful in treating immune related diseases characterized by poor, suboptimal or inadequate immune function. These diseases are treated by stimulating the proliferation and activation of T cells (and T cell mediated immunity) and enhancing the immune response in a mammal through administration of a stimulatory compound, such as the stimulating PRO polypeptides. The stimulating polypeptide may, for example, be a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727 polypeptide or an agonist antibody thereof.

Direct use of a stimulating compound as in the invention has been validated in experiments with 4-1BB glycoprotein, a member of the tumor necrosis factor receptor family, which binds to a ligand (4-1BBL) expressed on primed T cells and signals T cell activation and growth. Alderson, M. E. *et al., J. Immunol.* (1994) 24:2219.

The use of an agonist stimulating compound has also been validated experimentally. Activation of 4-1BB by treatment with an agonist anti-4-1BB antibody enhances eradication of tumors. Hellstrom, I. and Hellstrom, K. E., *Crit. Rev. Immunol.* (1998) 18:1. Immunoadjuvant therapy for treatment of tumors, described in more detail below, is another example of the use of the stimulating compounds of the invention.

An immune stimulating or enhancing effect can also be achieved by antagonizing or blocking the activity of a PRO which has been found to be inhibiting in the MLR assay. Negating the inhibitory activity of the compound produces a net stimulatory effect. Suitable antagonists/blocking compounds are antibodies or fragments thereof which recognize and bind to the inhibitory protein, thereby blocking the effective interaction of the protein with its receptor and inhibiting signaling through the receptor. This effect has been validated in experiments using anti-CTLA-4 antibodies which enhance T cell proliferation, presumably by removal of the inhibitory signal caused by CTLA-4 binding. Walunas, T. L. *et al. Immunity* (1994) 1:405.

Alternatively, an immune stimulating or enhancing effect can also be achieved by administration of a PRO which has vascular permeability enhancing properties. Enhanced vacuolar permeability would be

WO 00/53758

PCT/US00/05841

beneficial to disorders which can be attenuated by local infiltration of immune cells (e.g., monocytes, eosinophils, PMNs) and inflammation.

On the other hand, PRO polypeptides, as well as other compounds of the invention, which are direct inhibitors of T cell proliferation/activation, lymphokine secretion, and/or vascular permeability can be directly used to suppress the immune response. These compounds are useful to reduce the degree of the immune response and to treat immune related diseases characterized by a hyperactive, superoptimal, or autoimmune response. This use of the compounds of the invention has been validated by the experiments described above in which CTLA-4 binding to receptor B7 deactivates T cells. The direct inhibitory compounds of the invention function in an analogous manner. The use of compound which suppress vascular permeability would be expected to reduce inflammation. Such uses would be beneficial in treating conditions associated with excessive inflammation.

Alternatively, compounds, e.g., antibodies, which bind to stimulating PRO polypeptides and block the stimulating effect of these molecules produce a net inhibitory effect and can be used to suppress the T cell mediated immune response by inhibiting T cell proliferation/activation and/or lymphokine secretion. Blocking the stimulating effect of the polypeptides suppresses the immune response of the mammal. This use has been validated in experiments using an anti-IL2 antibody. In these experiments, the antibody binds to IL2 and blocks binding of IL2 to its receptor thereby achieving a T cell inhibitory effect.

#### H. Animal Models

The results of the cell based *in vitro* assays can be further verified using *in vivo* animal models and assays for T-cell function. A variety of well known animal models can be used to further understand the role of the genes identified herein in the development and pathogenesis of immune related disease, and to test the efficacy of candidate therapeutic agents, including antibodies, and other antagonists of the native polypeptides, including small molecule antagonists. The *in vivo* nature of such models makes them predictive of responses in human patients. Animal models of immune related diseases include both non-recombinant and recombinant (transgenic) animals. Non-recombinant animal models include, for example, rodent, e.g., murine models. Such models can be generated by introducing cells into syngeneic mice using standard techniques, e.g., subcutaneous injection, tail vein injection, spleen implantation, intraperitoneal implantation, implantation under the renal capsule, etc.

Graft-versus-host disease occurs when immunocompetent cells are transplanted into immunosuppressed or tolerant patients. The donor cells recognize and respond to host antigens. The response can vary from life threatening severe inflammation to mild cases of diarrhea and weight loss. Graft-versus-host disease models provide a means of assessing T cell reactivity against MHC antigens and minor transplant antigens. A suitable procedure is described in detail in *Current Protocols in Immunology*, above, unit 4.3.

An animal model for skin allograft rejection is a means of testing the ability of T cells to mediate *in vivo* tissue destruction and a measure of their role in transplant rejection. The most common and accepted models use murine tail-skin grafts. Repeated experiments have shown that skin allograft rejection is mediated by T cells, helper T cells and killer-effector T cells, and not antibodies. Auchincloss, H. Jr. and Sachs, D. H., *Fundamental Immunology*, 2nd ed., W. E. Paul ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992. A suitable procedure is described in detail in *Current Protocols in Immunology*, above, unit 4.4. Other transplant rejection models

WO 00/53758

PCT/US00/05841

which can be used to test the compounds of the invention are the allogeneic heart transplant models described by Tanabe, M. *et al. Transplantation* (1994) 58:23 and Tinubu, S. A. *et al. J. Immunol.* (1994) 4330-4338.

Animal models for delayed type hypersensitivity provides an assay of cell mediated immune function as well. Delayed type hypersensitivity reactions are a T cell mediated *in vivo* immune response characterized by inflammation which does not reach a peak until after a period of time has elapsed after challenge with an antigen. These reactions also occur in tissue specific autoimmune diseases such as multiple sclerosis (MS) and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE, a model for MS). A suitable procedure is described in detail in *Current Protocols in Immunology*, above, unit 4.5.

EAE is a T cell mediated autoimmune disease characterized by T cell and mononuclear cell inflammation and subsequent demyelination of axons in the central nervous system. EAE is generally considered to be a relevant animal model for MS in humans. Bolton, C., *Multiple Sclerosis* (1995) 1:143. Both acute and relapsing-remitting models have been developed. The compounds of the invention can be tested for T cell stimulatory or inhibitory activity against immune mediated demyelinating disease using the protocol described in *Current Protocols in Immunology*, above, units 15.1 and 15.2. See also the models for myelin disease in which oligodendrocytes or Schwann cells are grafted into the central nervous system as described in Duncan, I. D. *et al. Molec. Med. Today* (1997) 554-561.

Contact hypersensitivity is a simple delayed type hypersensitivity *in vivo* assay of cell mediated immune function. In this procedure, cutaneous exposure to exogenous haptens which gives rise to a delayed type hypersensitivity reaction which is measured and quantitated. Contact sensitivity involves an initial sensitizing phase followed by an elicitation phase. The elicitation phase occurs when the T lymphocytes encounter an antigen to which they have had previous contact. Swelling and inflammation occur, making this an excellent model of human allergic contact dermatitis. A suitable procedure is described in detail in *Current Protocols in Immunology*, Eds. J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, John Wiley & Sons, Inc., 1994, unit 4.2. See also Grabbe, S. and Schwarz, T., *Immun. Today* 19 (1): 37-44 (1998).

An animal model for arthritis is collagen-induced arthritis. This model shares clinical, histological and immunological characteristics of human autoimmune rheumatoid arthritis and is an acceptable model for human autoimmune arthritis. Mouse and rat models are characterized by synovitis, erosion of cartilage and subchondral bone. The compounds of the invention can be tested for activity against autoimmune arthritis using the protocols described in *Current Protocols in Immunology*, above, units 15.5. See also the model using a monoclonal antibody to CD18 and VLA-4 integrins described in Issekutz, A.C. *et al., Immunology* (1996) 88:569.

A model of asthma has been described in which antigen-induced airway hyper-reactivity, pulmonary eosinophilia and inflammation are induced by sensitizing an animal with ovalbumin and then challenging the animal with the same protein delivered by aerosol. Several animal models (guinea pig, rat, non-human primate) show symptoms similar to atopic asthma in humans upon challenge with aerosol antigens. Murine models have many of the features of human asthma. Suitable procedures to test the compounds of the invention for activity and effectiveness in the treatment of asthma are described by Wolyniec, W. W. *et al. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1998) 18:777 and the references cited therein.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Additionally, the compounds of the invention can be tested on animal models for psoriasis like diseases. Evidence suggests a T cell pathogenesis for psoriasis. The compounds of the invention can be tested in the scid/scid mouse model described by Schon, M. P. *et al.*, *Nat. Med.* (1997) 3:183, in which the mice demonstrate histopathologic skin lesions resembling psoriasis. Another suitable model is the human skin/scid mouse chimera prepared as described by Nickoloff, B. J. *et al.*, *Am. J. Path.* (1995) 146:580.

Recombinant (transgenic) animal models can be engineered by introducing the coding portion of the genes identified herein into the genome of animals of interest, using standard techniques for producing transgenic animals. Animals that can serve as a target for transgenic manipulation include, without limitation, mice, rats, rabbits, guinea pigs, sheep, goats, pigs, and non-human primates. *e.g.*, baboons, chimpanzees and monkeys. Techniques known in the art to introduce a transgene into such animals include pronucleic microinjection (Hoppe and Wanger, U.S. Patent No. 4,873,191); retrovirus-mediated gene transfer into germ lines (*e.g.*, Van der Putten *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6148-615 [1985]); gene targeting in embryonic stem cells (Thompson *et al.*, *Cell* 56, 313-321 [1989]); electroporation of embryos (Lo, *Mol. Cell. Biol.* 3, 1803-1814 [1983]); sperm-mediated gene transfer (Lavitrano *et al.*, *Cell* 57, 717-73 [1989]). For review, see, for example, U.S. Patent No. 4,736,866.

For the purpose of the present invention, transgenic animals include those that carry the transgene only in part of their cells ("mosaic animals"). The transgene can be integrated either as a single transgene, or in concatamers, *e.g.*, head-to-head or head-to-tail tandems. Selective introduction of a transgene into a particular cell type is also possible by following, for example, the technique of Lasko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6232-636 (1992).

The expression of the transgene in transgenic animals can be monitored by standard techniques. For example, Southern blot analysis or PCR amplification can be used to verify the integration of the transgene. The level of mRNA expression can then be analyzed using techniques such as *in situ* hybridization, Northern blot analysis, PCR, or immunocytochemistry.

The animals may be further examined for signs of immune disease pathology, for example by histological examination to determine infiltration of immune cells into specific tissues. Blocking experiments can also be performed in which the transgenic animals are treated with the compounds of the invention to determine the extent of the T cell proliferation stimulation or inhibition of the compounds. In these experiments, blocking antibodies which bind to the PRO polypeptide, prepared as described above, are administered to the animal and the effect on immune function is determined.

Alternatively, "knock out" animals can be constructed which have a defective or altered gene encoding a polypeptide identified herein, as a result of homologous recombination between the endogenous gene encoding the polypeptide and altered genomic DNA encoding the same polypeptide introduced into an embryonic cell of the animal. For example, cDNA encoding a particular polypeptide can be used to clone genomic DNA encoding that polypeptide in accordance with established techniques. A portion of the genomic DNA encoding a particular polypeptide can be deleted or replaced with another gene, such as a gene encoding a selectable marker which can be used to monitor integration. Typically, several kilobases of unaltered flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the vector [see *e.g.*, Thomas and Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) for a description of homologous recombination vectors]. The vector is introduced into an embryonic stem cell line (*e.g.*, by electroporation) and cells in which the introduced DNA has homologously



WO 00/53758

PCT/US00/05841

recombined with the endogenous DNA are selected [see e.g., Li *et al.*, *Cell*, 69:915 (1992)]. The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (e.g., a mouse or rat) to form aggregation chimeras [see e.g., Bradley, in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal and the embryo brought to term to create a "knock out" animal. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be identified by standard techniques and used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously recombined DNA. Knockout animals can be characterized for instance, for their ability to defend against certain pathological conditions and for their development of pathological conditions due to absence of the polypeptide.

#### 1. ImmunoAdjuvant Therapy

In one embodiment, the immunostimulating compounds of the invention can be used in immunoAdjuvant therapy for the treatment of tumors (cancer). It is now well established that T cells recognize human tumor specific antigens. One group of tumor antigens, encoded by the MAGE, BAGE and GAGE families of genes, are silent in all adult normal tissues, but are expressed in significant amounts in tumors, such as melanomas, lung tumors, head and neck tumors, and bladder carcinomas. DeSmet, C. *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7149. It has been shown that costimulation of T cells induces tumor regression and an antitumor response both *in vitro* and *in vivo*. Melero, I. *et al.*, *Nature Medicine* (1997) 3:682; Kwon, E. D. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94: 8099; Lynch, D. H. *et al.*, *Nature Medicine* (1997) 3:625; Finn, O. J. and Lotze, M. T., *J. Immunol.* (1998) 211:114. The stimulatory compounds of the invention can be administered as adjuvants, alone or together with a growth regulating agent, cytotoxic agent or chemotherapeutic agent, to stimulate T cell proliferation/activation and an antitumor response to tumor antigens. The growth regulating, cytotoxic, or chemotherapeutic agent may be administered in conventional amounts using known administration regimes. Immunostimulating activity by the compounds of the invention allows reduced amounts of the growth regulating, cytotoxic, or chemotherapeutic agents thereby potentially lowering the toxicity to the patient.

#### J. Screening Assays for Drug Candidates

Screening assays for drug candidates are designed to identify compounds that bind to or complex with the polypeptides encoded by the genes identified herein or a biologically active fragment thereof, or otherwise interfere with the interaction of the encoded polypeptides with other cellular proteins. Such screening assays will include assays amenable to high-throughput screening of chemical libraries, making them particularly suitable for identifying small molecule drug candidates. Small molecules contemplated include synthetic organic or inorganic compounds, including peptides, preferably soluble peptides, (poly)peptide-immunoglobulin fusions, and, in particular, antibodies including, without limitation, poly- and monoclonal antibodies and antibody fragments, single-chain antibodies, anti-idiotypic antibodies, and chimeric or humanized versions of such antibodies or fragments, as well as human antibodies and antibody fragments. The assays can be performed in a variety of formats, including protein-protein binding assays, biochemical screening assays, immunoassays and cell based assays, which are well characterized in the art.

All assays are common in that they call for contacting the drug candidate with a polypeptide encoded by a nucleic acid identified herein under conditions and for a time sufficient to allow these two components to interact.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

In binding assays, the interaction is binding and the complex formed can be isolated or detected in the reaction mixture. In a particular embodiment, the polypeptide encoded by the gene identified herein or the drug candidate is immobilized on a solid phase, e.g., on a microtiter plate, by covalent or non-covalent attachments. Non-covalent attachment generally is accomplished by coating the solid surface with a solution of the polypeptide and drying. Alternatively, an immobilized antibody, e.g., a monoclonal antibody, specific for the polypeptide to be immobilized can be used to anchor it to a solid surface. The assay is performed by adding the non-immobilized component, which may be labeled by a detectable label, to the immobilized component, e.g., the coated surface containing the anchored component. When the reaction is complete, the non-reacted components are removed, e.g., by washing, and complexes anchored on the solid surface are detected. When the originally non-immobilized component carries a detectable label, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexing occurred. Where the originally non-immobilized component does not carry a label, complexing can be detected, for example, by using a labelled antibody specifically binding the immobilized complex.

If the candidate compound interacts with but does not bind to a particular protein encoded by a gene identified herein, its interaction with that protein can be assayed by methods well known for detecting protein-protein interactions. Such assays include traditional approaches, such as, cross-linking, co-immunoprecipitation, and co-purification through gradients or chromatographic columns. In addition, protein-protein interactions can be monitored by using a yeast-based genetic system described by Fields and co-workers [Fields and Song, *Nature (London)* 340, 245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9578-9582 (1991)] as disclosed by Chevray and Nahans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5789-5793 (1991). Many transcriptional activators, such as yeast GAL4, consist of two physically discrete modular domains, one acting as the DNA-binding domain, while the other one functioning as the transcription activation domain. The yeast expression system described in the foregoing publications (generally referred to as the "two-hybrid system") takes advantage of this property, and employs two hybrid proteins, one in which the target protein is fused to the DNA-binding domain of GAL4, and another, in which candidate activating proteins are fused to the activation domain. The expression of a GAL1-*lacZ* reporter gene under control of a GAL4-activated promoter depends on reconstitution of GAL4 activity via protein-protein interaction. Colonies containing interacting polypeptides are detected with a chromogenic substrate for  $\beta$ -galactosidase. A complete kit (MATCHMAKER<sup>TM</sup>) for identifying protein-protein interactions between two specific proteins using the two-hybrid technique is commercially available from Clontech. This system can also be extended to map protein domains involved in specific protein interactions as well as to pinpoint amino acid residues that are crucial for these interactions.

In order to find compounds that interfere with the interaction of a gene identified herein and other intra- or extracellular components can be tested, a reaction mixture is usually prepared containing the product of the gene and the intra- or extracellular component under conditions and for a time allowing for the interaction and binding of the two products. To test the ability of a test compound to inhibit binding, the reaction is run in the absence and in the presence of the test compound. In addition, a placebo may be added to a third reaction mixture, to serve as positive control. The binding (complex formation) between the test compound and the intra- or extracellular component present in the mixture is monitored as described above. The formation of a complex in the control reaction(s) but not in the reaction mixture containing the test

WO 00/53758

PCT/US00/05841

compound indicates that the test compound interferes with the interaction of the test compound and its reaction partner.

K. Compositions and Methods for the Treatment of Immune Related Diseases

The compositions useful in the treatment of immune related diseases include, without limitation, proteins, antibodies, small organic molecules, peptides, phosphopeptides, antisense and ribozyme molecules, triple helix molecules, etc. that inhibit or stimulate immune function, for example, T cell proliferation/activation, lymphokine release, or immune cell infiltration.

For example, antisense RNA and RNA molecules act to directly block the translation of mRNA by hybridizing to targeted mRNA and preventing protein translation. When antisense DNA is used, oligodeoxyribonucleotides derived from the translation initiation site, e.g., between about -10 and +10 positions of the target gene nucleotide sequence, are preferred.

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. Ribozymes act by sequence-specific hybridization to the complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Specific ribozyme cleavage sites within a potential RNA target can be identified by known techniques. For further details see, e.g., Rossi, *Current Biology* 4, 469-471 (1994), and PCT publication No. WO 97/33551 (published September 18, 1997).

Nucleic acid molecules in triple helix formation used to inhibit transcription should be single-stranded and composed of deoxynucleotides. The base composition of these oligonucleotides is designed such that it promotes triple helix formation via Hoogsteen base pairing rules, which generally require sizeable stretches of purines or pyrimidines on one strand of a duplex. For further details see, e.g., PCT publication No. WO 97/33551, *supra*.

These molecules can be identified by any or any combination of the screening assays discussed above and/or by any other screening techniques well known for those skilled in the art.

L. Antibodies

The present invention further provides anti-PRO antibodies and fragments thereof which may inhibit (antagonists) or stimulate (agonists) T cell proliferation, eosinophil infiltration, vascular permeability, etc. Such anti-PRO antibodies or fragments thereof include polyclonal, monoclonal, humanized, bispecific and heteroconjugate antibodies.

1. Polyclonal Antibodies

The anti-PRO antibodies may comprise polyclonal antibodies. Methods of preparing polyclonal antibodies are known to the skilled artisan. Polyclonal antibodies can be raised in a mammal, for example, by one or more injections of an immunizing agent and, if desired, an adjuvant. Typically, the immunizing agent and/or adjuvant will be injected in the mammal by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections. The immunizing agent may include the PRO polypeptide or a fusion protein thereof. It may be useful to conjugate the immunizing agent to a protein known to be immunogenic in the mammal being immunized. Examples of such immunogenic proteins include but are not limited to keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, and soybean trypsin inhibitor. Examples of adjuvants which may be employed include Freund's complete adjuvant and MPL-TDM adjuvant (monophosphoryl Lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate). The immunization protocol may be selected by one skilled in the art without undue experimentation.

2. Monoclonal Antibodies

WO 00/53758

PCT/US00/05841

The anti-PRO antibodies may, alternatively, be monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies may be prepared using hybridoma methods, such as those described by Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). In a hybridoma method, a mouse, hamster, or other appropriate host animal, is typically immunized with an immunizing agent to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the immunizing agent. Alternatively, the lymphocytes may be immunized *in vitro*.

The immunizing agent will typically include the PRO polypeptide or a fusion protein thereof. Generally, either peripheral blood lymphocytes ("PBLs") are used if cells of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used if non-human mammalian sources are desired. The lymphocytes are then fused with an immortalized cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Immortalized cell lines are usually transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine and human origin. Usually, rat or mouse myeloma cell lines are employed. The hybridoma cells may be cultured in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, immortalized cells. For example, if the parental cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine ("HAT medium"), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred immortalized cell lines are those that fuse efficiently, support stable high level expression of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. More preferred immortalized cell lines are murine myeloma lines, which can be obtained, for instance, from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63].

The culture medium in which the hybridoma cells are cultured can then be assayed for the presence of monoclonal antibodies directed against PRO. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Such techniques and assays are known in the art. The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

After the desired hybridoma cells are identified, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods [Goding, *supra*]. Suitable culture media for this purpose include, for example, Dulbecco's Modified Eagle's Medium and RPMI-1640 medium. Alternatively, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites in a mammal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones may be isolated or purified from the culture medium or ascites fluid by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxyapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

The monoclonal antibodies may also be made by recombinant DNA methods, such as those described in U.S. Patent No. 4,816,567. DNA encoding the monoclonal antibodies of the invention can be readily

WO 00/53758

PCT/US00/05841

isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells of the invention serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences [U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, *supra*] or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide.

Such a non-immunoglobulin polypeptide can be substituted for the constant domains of an antibody of the invention, or can be substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent antibody.

The antibodies are preferably monovalent antibodies. Methods for preparing monovalent antibodies are well known in the art. For example, one method involves recombinant expression of immunoglobulin light chain and modified heavy chain. The heavy chain is truncated generally at any point in the Fc region so as to prevent heavy chain crosslinking. Alternatively, the relevant cysteine residues are substituted with another amino acid residue or are deleted so as to prevent crosslinking.

*In vitro* methods are also suitable for preparing monovalent antibodies. Digestion of antibodies to produce fragments thereof, particularly, Fab fragments, can be accomplished using routine techniques known in the art.

### 3. Human and Humanized Antibodies

The anti-PRO antibodies of the invention may further comprise humanized antibodies or human antibodies. Humanized forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> or other antigen-binding subsequences of antibodies) which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. Humanized antibodies include human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementary determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, Fv framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Humanized antibodies may also comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an

WO 00/53758

PCT/US00/05841

"import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and coworkers [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)], by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567), wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

Human antibodies can also be produced using various techniques known in the art, including phage display libraries [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. The techniques of Cole *et al.* and Boerner *et al.* are also available for the preparation of human monoclonal antibodies (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991); U.S. 5,750, 373]. Similarly, human antibodies can be made by introducing of human immunoglobulin loci into transgenic animals, e.g., mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. Upon challenge, human antibody production is observed, which closely resembles that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and antibody repertoire. This approach is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, and in the following scientific publications: Marks *et al.*, *BioTechnology* 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995).

The antibodies may also be affinity matured using known selection and/or mutagenesis methods as described above. Preferred affinity matured antibodies have an affinity which is five times, more preferably 10 times, even more preferably 20 or 30 times greater than the starting antibody (generally murine, humanized or human) from which the matured antibody is prepared.

#### 4. Bispecific Antibodies

Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present case, one of the binding specificities may be for the PRO, the other one is for any other antigen, and preferably for a cell-surface protein or receptor or receptor subunit.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the coexpression of two immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chains have different specificities (Milstein and Cuello, *Nature*, 305:537-539 [1983]). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule is usually accomplished by affinity chromatography steps. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829, published 13 May 1993, and in Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) can be fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin

WO 00/53758

PCT/US00/05841

heavy-chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light-chain binding present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy-chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are cotransfected into a suitable host organism. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

According to another approach described in WO 96/27011, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the CH3 region of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (e.g., tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g., alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments (e.g., F(ab')<sub>2</sub> bispecific antibodies). Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate F(ab')<sub>2</sub> fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

Fab' fragments may be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody F(ab')<sub>2</sub> molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

Various technique for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148 (5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V<sub>H</sub>) connected to a light-chain variable domain (V<sub>L</sub>) by a linker which is too short to allow

WO 00/53758

PCT/US00/05841

pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the  $V_H$  and  $V_L$  domains of one fragment are forced to pair with the complementary  $V_L$  and  $V_H$  domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See, Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Exemplary bispecific antibodies may bind to two different epitopes on a given PRO polypeptide herein. Alternatively, an anti-PRO arm may be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (*e.g.*, CD2, CD3, CD28, or B7), or Fc receptors for IgG (FcγR), such as FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the cell expressing the particular PRO polypeptide. Bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to cells which express a particular PRO polypeptide. These antibodies possess a PRO polypeptide-binding arm and an arm which binds a cytotoxic agent or a radionuclide chelator, such as EOTUBE, DPTA, DOTA, or TETA. Another bispecific antibody of interest binds the PRO polypeptide and further binds tissue factor (TF).

#### 5. Heteroconjugate Antibodies

Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells [U.S. Patent No. 4,676,980], and for treatment of HIV infection [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. It is contemplated that the antibodies may be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate and those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 4,676,980.

#### 6. Effector function engineering

It may be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, so as to enhance the effectiveness of the antibody in treating an immune related disease, for example. For example cysteine residue(s) may be introduced in the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated may have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See Caron *et al.*, *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992) and Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity may also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff *et al.*, *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered which has dual Fc regions and may thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. See Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

#### 7. Immunoconjugates

The invention also pertains to immunoconjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, toxin (*e.g.*, an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (*i.e.*, a radioconjugate).

Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates have been described above. Enzymatically active toxins and fragments thereof which can be used include diphtheria A chain,



WO 00/53758

PCT/US00/05841

nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, saponaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin and the tricothecenes. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$  and  $^{186}\text{Re}$ .

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta *et al.*, *Science* **238**: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminedipentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionuclide to the antibody. See WO94/11026.

In another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such streptavidin) for utilization in tissue pretargeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (e.g., avidin) which is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a radionuclide).

#### 8. Immunoliposomes

The proteins, antibodies, etc. disclosed herein may also be formulated as immunoliposomes. Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**:4030 (1980); and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556.

Particularly useful liposomes can be generated by the reverse phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of the antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.* **257**: 286-288 (1982) via a disulfide interchange reaction. A chemotherapeutic agent (such as doxorubicin) may be optionally contained within the liposome. See Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* **81** (19) 1484 (1989).

#### M. Pharmaceutical Compositions

The active PRO molecules of the invention (e.g., PRO polypeptides, anti-PRO antibodies, and/or variants of each) as well as other molecules identified by the screening assays disclosed above, can be administered for the treatment of immune related diseases, in the form of pharmaceutical compositions.

Therapeutic formulations of the active PRO molecule, preferably a polypeptide or antibody of the invention, are prepared for storage by mixing the active molecule having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers (*Remington's Pharmaceutical Sciences*

WO 00/53758

PCT/US00/05841

16th edition, Osol, A. Ed. [1980]), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyltrimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; 5 benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, 10 mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g., Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> or polyethylene glycol (PEG).

Compounds identified by the screening assays disclosed herein can be formulated in an analogous manner, using standard techniques well known in the art.

15 Lipofections or liposomes can also be used to deliver the PRO molecule into cells. Where antibody fragments are used, the smallest inhibitory fragment which specifically binds to the binding domain of the target protein is preferred. For example, based upon the variable region sequences of an antibody, peptide molecules can be designed which retain the ability to bind the target protein sequence. Such peptides can be synthesized chemically and/or produced by recombinant DNA technology (see, e.g., Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7889-7893 [1993]).

20 The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Alternatively, or in addition, the composition may comprise a cytotoxic agent, cytokine or growth inhibitory agent. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

25 The active PRO molecules may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in 30 macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

35 Sustained-release preparations of the PRO molecules may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, e.g., films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and  $\gamma$ -ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the 40 LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide

WO 00/53758

PCT/US00/05841

acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. When encapsulated antibodies remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37°C, resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies can be devised for stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying sulfhydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

#### N. Methods of Treatment

It is contemplated that the polypeptides, antibodies and other active compounds of the present invention may be used to treat various immune related diseases and conditions, such as T cell mediated diseases, including those characterized by infiltration of inflammatory cells into a tissue, stimulation of T-cell proliferation, inhibition of T-cell proliferation, increased or decreased vascular permeability or the inhibition thereof.

Exemplary conditions or disorders to be treated with the polypeptides, antibodies and other compounds of the invention, include, but are not limited to systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, juvenile chronic arthritis, osteoarthritis, spondyloarthropathies, systemic sclerosis (scleroderma), idiopathic inflammatory myopathies (dermatomyositis, polymyositis), Sjögren's syndrome, systemic vasculitis, sarcoidosis, autoimmune hemolytic anemia (immune pancytopenia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria), autoimmune thrombocytopenia (idiopathic thrombocytopenic purpura, immune-mediated thrombocytopenia), thyroiditis (Grave's disease, Hashimoto's thyroiditis, juvenile lymphocytic thyroiditis, atrophic thyroiditis), diabetes mellitus, immune-mediated renal disease (glomerulonephritis, tubulointerstitial nephritis), demyelinating diseases of the central and peripheral nervous systems such as multiple sclerosis, idiopathic demyelinating polyneuropathy or Guillain-Barré syndrome, and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, hepatobiliary diseases such as infectious hepatitis (hepatitis A, B, C, D, E and other non-hepatotropic viruses), autoimmune chronic active hepatitis, primary biliary cirrhosis, granulomatous hepatitis, and sclerosing cholangitis, inflammatory bowel disease (ulcerative colitis; Crohn's disease), gluten-sensitive enteropathy, and Whipple's disease, autoimmune or immune-mediated skin diseases including bullous skin diseases, erythema multiforme and contact dermatitis, psoriasis, allergic diseases such as asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, food hypersensitivity and urticaria, immunologic diseases of the lung such as eosinophilic pneumonias, idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis, transplantation associated diseases including graft rejection and graft-versus-host-disease.

In systemic lupus erythematosus, the central mediator of disease is the production of auto-reactive antibodies to self proteins/tissues and the subsequent generation of immune-mediated inflammation. antibodies either directly or indirectly mediate tissue injury. Though T lymphocytes have not been shown to be directly involved in tissue damage, T lymphocytes are required for the development of auto-reactive antibodies. The genesis of the disease is thus T lymphocyte dependent. Multiple organs and systems are affected clinically including kidney, lung, musculoskeletal system, mucocutaneous, eye, central nervous system, cardiovascular system, gastrointestinal tract, bone marrow and blood.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic autoimmune inflammatory disease that mainly involves the synovial membrane of multiple joints with resultant injury to the articular cartilage. The pathogenesis is T lymphocyte dependent and is associated with the production of rheumatoid factors, auto-antibodies directed against self IgG, with the resultant formation of immune complexes that attain high levels in joint fluid and blood. These complexes in the joint may induce the marked infiltrate of lymphocytes and monocytes into the synovium and subsequent marked synovial changes; the joint space/fluid is infiltrated by similar cells with the addition of numerous neutrophils. Tissues affected are primarily the joints, often in symmetrical pattern. However, extra-articular disease also occurs in two major forms. One form is the development of extra-articular lesions with ongoing progressive joint disease and typical lesions of pulmonary fibrosis, vasculitis, and cutaneous ulcers. The second form of extra-articular disease is the so called Felty's syndrome which occurs late in the RA disease course, sometimes after joint disease has become quiescent, and involves the presence of neutropenia, thrombocytopenia and splenomegaly. This can be accompanied by vasculitis in multiple organs with formations of infarcts, skin ulcers and gangrene. Patients often also develop rheumatoid nodules in the subcutis tissue overlying affected joints; the nodules late stage have necrotic centers surrounded by a mixed inflammatory cell infiltrate. Other manifestations which can occur in RA include: pericarditis, pleuritis, coronary arteritis, interstitial pneumonitis with pulmonary fibrosis, keratoconjunctivitis sicca, and rheumatoid nodules.

Juvenile chronic arthritis is a chronic idiopathic inflammatory disease which begins often at less than 16 years of age. Its phenotype has some similarities to RA; some patients which are rheumatoid factor positive are classified as juvenile rheumatoid arthritis. The disease is sub-classified into three major categories: pauciarticular, polyarticular, and systemic. The arthritis can be severe and is typically destructive and leads to joint ankylosis and retarded growth. Other manifestations can include chronic anterior uveitis and systemic amyloidosis.

Spondyloarthropathies are a group of disorders with some common clinical features and the common association with the expression of HLA-B27 gene product. The disorders include: ankylosing spondylitis, Reiter's syndrome (reactive arthritis), arthritis associated with inflammatory bowel disease, spondylitis associated with psoriasis, juvenile onset spondyloarthropathy and undifferentiated spondyloarthropathy. Distinguishing features include sacroileitis with or without spondylitis; inflammatory asymmetric arthritis; association with HLA-B27 (a serologically defined allele of the HLA-B locus of class I MHC); ocular inflammation, and absence of autoantibodies associated with other rheumatoid disease. The cell most implicated as key to induction of the disease is the CD8+ T lymphocyte, a cell which targets antigen presented by class I MHC molecules. CD8+ T cells may react against the class I MHC allele HLA-B27 as if it were a foreign peptide expressed by MHC class I molecules. It has been hypothesized that an epitope of HLA-B27 may mimic a bacterial or other microbial antigenic epitope and thus induce a CD8+ T cells response.

Systemic sclerosis (scleroderma) has an unknown etiology. A hallmark of the disease is induration of the skin; likely this is induced by an active inflammatory process. Scleroderma can be localized or systemic; vascular lesions are common and endothelial cell injury in the microvasculature is an early and important event in the development of systemic sclerosis; the vascular injury may be immune mediated. An immunologic basis is implied by the presence of mononuclear cell infiltrates in the cutaneous lesions and the presence of anti-nuclear antibodies in many patients. ICAM-1 is often upregulated on the cell surface of fibroblasts in skin

WO 00/53758

PCT/US00/05841

lesions suggesting that T cell interaction with these cells may have a role in the pathogenesis of the disease. Other organs involved include: the gastrointestinal tract: smooth muscle atrophy and fibrosis resulting in abnormal peristalsis/motility; kidney: concentric subendothelial intimal proliferation affecting small arcuate and interlobular arteries with resultant reduced renal cortical blood flow, results in proteinuria, azotemia and hypertension; skeletal muscle: atrophy, interstitial fibrosis; inflammation; lung: interstitial pneumonitis and interstitial fibrosis; and heart: contraction band necrosis, scarring/fibrosis.

Idiopathic inflammatory myopathies including dermatomyositis, polymyositis and others are disorders of chronic muscle inflammation of unknown etiology resulting in muscle weakness. Muscle injury/inflammation is often symmetric and progressive. Autoantibodies are associated with most forms. These myositis-specific autoantibodies are directed against and inhibit the function of components, proteins and RNA's, involved in protein synthesis.

Sjögren's syndrome is due to immune-mediated inflammation and subsequent functional destruction of the tear glands and salivary glands. The disease can be associated with or accompanied by inflammatory connective tissue diseases. The disease is associated with autoantibody production against Ro and La antigens, both of which are small RNA-protein complexes. Lesions result in keratoconjunctivitis sicca, xerostomia, with other manifestations or associations including biliary cirrhosis, peripheral or sensory neuropathy, and palpable purpura.

Systemic vasculitis are diseases in which the primary lesion is inflammation and subsequent damage to blood vessels which results in ischemia/necrosis/degeneration to tissues supplied by the affected vessels and eventual end-organ dysfunction in some cases. Vasculitides can also occur as a secondary lesion or sequelae to other immune-inflammatory mediated diseases such as rheumatoid arthritis, systemic sclerosis, etc., particularly in diseases also associated with the formation of immune complexes. Diseases in the primary systemic vasculitis group include: systemic necrotizing vasculitis: polyarteritis nodosa, allergic angitis and granulomatosis, polyangiitis; Wegener's granulomatosis; lymphomatoid granulomatosis; and giant cell arteritis. Miscellaneous vasculitides include: mucocutaneous lymph node syndrome (MLNS or Kawasaki's disease), isolated CNS vasculitis, Behet's disease, thromboangitis obliterans (Buerger's disease) and cutaneous necrotizing vasculitis. The pathogenic mechanism of most of the types of vasculitis listed is believed to be primarily due to the deposition of immunoglobulin complexes in the vessel wall and subsequent induction of an inflammatory response either via ADCC, complement activation, or both.

Sarcoidosis is a condition of unknown etiology which is characterized by the presence of epithelioid granulomas in nearly any tissue in the body; involvement of the lung is most common. The pathogenesis involves the persistence of activated macrophages and lymphoid cells at sites of the disease with subsequent chronic sequelae resultant from the release of locally and systemically active products released by these cell types.

Autoimmune hemolytic anemia including autoimmune hemolytic anemia, immune pancytopenia, and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is a result of production of antibodies that react with antigens expressed on the surface of red blood cells (and in some cases other blood cells including platelets as well) and is a reflection of the removal of those antibody coated cells via complement mediated lysis and/or ADCC/Fc-receptor-mediated mechanisms.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

In autoimmune thrombocytopenia including thrombocytopenic purpura, and immune-mediated thrombocytopenia in other clinical settings, platelet destruction/removal occurs as a result of either antibody or complement attaching to platelets and subsequent removal by complement lysis, ADCC or FC-receptor mediated mechanisms.

Thyroiditis including Grave's disease, Hashimoto's thyroiditis, juvenile lymphocytic thyroiditis, and atrophic thyroiditis, are the result of an autoimmune response against thyroid antigens with production of antibodies that react with proteins present in and often specific for the thyroid gland. Experimental models exist including spontaneous models: rats (BUF and BB rats) and chickens (obese chicken strain); inducible models: immunization of animals with either thyroglobulin, thyroid microsomal antigen (thyroid peroxidase).

Type I diabetes mellitus or insulin-dependent diabetes is the autoimmune destruction of pancreatic islet  $\beta$  cells; this destruction is mediated by auto-antibodies and auto-reactive T cells. Antibodies to insulin or the insulin receptor can also produce the phenotype of insulin-non-responsiveness.

Immune mediated renal diseases, including glomerulonephritis and tubulointerstitial nephritis, are the result of antibody or T lymphocyte mediated injury to renal tissue either directly as a result of the production of autoreactive antibodies or T cells against renal antigens or indirectly as a result of the deposition of antibodies and/or immune complexes in the kidney that are reactive against other, non-renal antigens. Thus other immune-mediated diseases that result in the formation of immune-complexes can also induce immune mediated renal disease as an indirect sequelae. Both direct and indirect immune mechanisms result in inflammatory response that produces/induces lesion development in renal tissues with resultant organ function impairment and in some cases progression to renal failure. Both humoral and cellular immune mechanisms can be involved in the pathogenesis of lesions.

Demyelinating diseases of the central and peripheral nervous systems, including Multiple Sclerosis; idiopathic demyelinating polyneuropathy or Guillain-Barré syndrome; and Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy, are believed to have an autoimmune basis and result in nerve demyelination as a result of damage caused to oligodendrocytes or to myelin directly. In MS there is evidence to suggest that disease induction and progression is dependent on T lymphocytes. Multiple Sclerosis is a demyelinating disease that is T lymphocyte-dependent and has either a relapsing-remitting course or a chronic progressive course. The etiology is unknown; however, viral infections, genetic predisposition, environment, and autoimmunity all contribute. Lesions contain infiltrates of predominantly T lymphocyte mediated, microglial cells and infiltrating macrophages; CD4<sup>+</sup>T lymphocytes are the predominant cell type at lesions. The mechanism of oligodendrocyte cell death and subsequent demyelination is not known but is likely T lymphocyte driven.

Inflammatory and Fibrotic Lung Disease, including Eosinophilic Pneumonias; Idiopathic Pulmonary Fibrosis, and Hypersensitivity Pneumonitis may involve a dysregulated immune-inflammatory response. Inhibition of that response would be of therapeutic benefit.

Autoimmune or Immune-mediated Skin Disease including Bullous Skin Diseases, Erythema Multiforme, and Contact Dermatitis are mediated by auto-antibodies, the genesis of which is T lymphocyte-dependent.

Psoriasis is a T lymphocyte-mediated inflammatory disease. Lesions contain infiltrates of T lymphocytes, macrophages and antigen processing cells, and some neutrophils.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Allergic diseases, including asthma; allergic rhinitis; atopic dermatitis; food hypersensitivity; and urticaria are T lymphocyte dependent. These diseases are predominantly mediated by T lymphocyte induced inflammation, IgE mediated-inflammation or a combination of both.

Transplantation associated diseases, including Graft rejection and Graft-Versus-Host-Disease (GVHD) are T lymphocyte-dependent; inhibition of T lymphocyte function is ameliorative.

Other diseases in which intervention of the immune and/or inflammatory response have benefit are infectious disease including but not limited to viral infection (including but not limited to AIDS, hepatitis A, B, C, D, E and herpes) bacterial infection, fungal infections, and protozoal and parasitic infections (molecules (or derivatives/agonists) which stimulate the MLR can be utilized therapeutically to enhance the immune response to infectious agents), diseases of immunodeficiency (molecules/derivatives/agonists) which stimulate the MLR can be utilized therapeutically to enhance the immune response for conditions of inherited, acquired, infectious induced (as in HIV infection), or iatrogenic (*i.e.*, as from chemotherapy) immunodeficiency), and neoplasia.

It has been demonstrated that some human cancer patients develop an antibody and/or T lymphocyte response to antigens on neoplastic cells. It has also been shown in animal models of neoplasia that enhancement of the immune response can result in rejection or regression of that particular neoplasm. Molecules that enhance the T lymphocyte response in the MLR have utility *in vivo* in enhancing the immune response against neoplasia. Molecules which enhance the T lymphocyte proliferative response in the MLR (or small molecule agonists or antibodies that affected the same receptor in an agonistic fashion) can be used therapeutically to treat cancer. Molecules that inhibit the lymphocyte response in the MLR also function *in vivo* during neoplasia to suppress the immune response to a neoplasm; such molecules can either be expressed by the neoplastic cells themselves or their expression can be induced by the neoplasm in other cells. Antagonism of such inhibitory molecules (either with antibody, small molecule antagonists or other means) enhances immune-mediated tumor rejection.

Additionally, inhibition of molecules with proinflammatory properties may have therapeutic benefit in reperfusion injury; stroke; myocardial infarction; atherosclerosis; acute lung injury; hemorrhagic shock; burn; sepsis/septic shock; acute tubular necrosis; endometriosis; degenerative joint disease and pancreatitis.

The compounds of the present invention, *e.g.*, polypeptides or antibodies, are administered to a mammal, preferably a human, in accord with known methods, such as intravenous administration as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation (intranasal, intrapulmonary) routes. Intravenous or inhaled administration of polypeptides and antibodies is preferred.

In immunoadjuvant therapy, other therapeutic regimens, such administration of an anti-cancer agent, may be combined with the administration of the proteins, antibodies or compounds of the instant invention. For example, the patient to be treated with a the immunoadjuvant of the invention may also receive an anti-cancer agent (chemotherapeutic agent) or radiation therapy. Preparation and dosing schedules for such chemotherapeutic agents may be used according to manufacturers' instructions or as determined empirically by the skilled practitioner. Preparation and dosing schedules for such chemotherapy are also described in *Chemotherapy Service* Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). The chemotherapeutic agent may precede, or follow administration of the immunoadjuvant or may be given simultaneously therewith. Additionally, an anti-oestrogen compound such as tamoxifen or an anti-progesterone such as onapristone (see,

WO 00/53758

PCT/US00/05841

EP 616812) may be given in dosages known for such molecules.

It may be desirable to also administer antibodies against other immune disease associated or tumor associated antigens, such as antibodies which bind to CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, or vascular endothelial factor (VEGF). Alternatively, or in addition, two or more antibodies binding the same or two or more different antigens disclosed herein may be coadministered to the patient. Sometimes, it may be beneficial to also administer one or more cytokines to the patient. In one embodiment, the PRO polypeptides are coadministered with a growth inhibitory agent. For example, the growth inhibitory agent may be administered first, followed by a PRO polypeptide. However, simultaneous administration or administration first is also contemplated. Suitable dosages for the growth inhibitory agent are those presently used and may be lowered due to the combined action (synergy) of the growth inhibitory agent and the PRO polypeptide.

For the treatment or reduction in the severity of immune related disease, the appropriate dosage of an a compound of the invention will depend on the type of disease to be treated, as defined above, the severity and course of the disease, whether the agent is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the compound, and the discretion of the attending physician. The compound is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments.

For example, depending on the type and severity of the disease, about 1 µg/kg to 15 mg/kg (e.g., 0.1-20 mg/kg) of polypeptide or antibody is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. A typical daily dosage might range from about 1 µg/kg to 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs. However, other dosage regimens may be useful. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays.

#### O. Articles of Manufacture

In another embodiment of the invention, an article of manufacture containing materials (e.g., comprising a PRO molecule) useful for the diagnosis or treatment of the disorders described above is provided. The article of manufacture comprises a container and an instruction. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, and test tubes. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds a composition which is effective for diagnosing or treating the condition and may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). The active agent in the composition is usually a polypeptide or an antibody of the invention. An instruction or label on, or associated with, the container indicates that the composition is used for diagnosing or treating the condition of choice. The article of manufacture may further comprise a second container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, syringes, and package inserts with instructions for use.

#### P. Diagnosis and Prognosis of Immune Related Disease

Cell surface proteins, such as proteins which are overexpressed in certain immune related diseases, are excellent targets for drug candidates or disease treatment. The same proteins along with secreted proteins encoded by the genes amplified in immune related disease states find additional use in the diagnosis and



WO 00/53758

PCT/US00/05841

prognosis of these diseases. For example, antibodies directed against the protein products of genes amplified in multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, or another immune related disease, can be used as diagnostics or prognostics.

For example, antibodies, including antibody fragments, can be used to qualitatively or quantitatively detect the expression of proteins encoded by amplified or overexpressed genes ("marker gene products"). The antibody preferably is equipped with a detectable, e.g., fluorescent label, and binding can be monitored by light microscopy, flow cytometry, fluorimetry, or other techniques known in the art. These techniques are particularly suitable, if the overexpressed gene encodes a cell surface protein. Such binding assays are performed essentially as described above.

*In situ* detection of antibody binding to the marker gene products can be performed, for example, by immunofluorescence or immunoelectron microscopy. For this purpose, a histological specimen is removed from the patient, and a labeled antibody is applied to it, preferably by overlaying the antibody on a biological sample. This procedure also allows for determining the distribution of the marker gene product in the tissue examined. It will be apparent for those skilled in the art that a wide variety of histological methods are readily available for *in situ* detection.

The following examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

All patent and literature references cited in the present specification are hereby incorporated by reference in their entirety.

#### EXAMPLES

Commercially available reagents referred to in the examples were used according to manufacturer's instructions unless otherwise indicated. The source of those cells identified in the following examples, and throughout the specification, by ATCC accession numbers is the American Type Culture Collection, Manassas, VA. Unless otherwise noted, the present invention uses standard procedures of recombinant DNA technology, such as those described hereinabove and in the following textbooks: Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press N.Y., 1989; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989; Innis *et al.*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, inc., N.Y., 1990; Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988; Gait, M.J., *Oligonucleotide Synthesis*, IRL Press, Oxford, 1984; R.I. Freshney, *Animal Cell Culture*, 1987; Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, 1991.

#### EXAMPLE 1

Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325,

WO 00/53758

PCT/US00/05841

PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 and PRO5727 polypeptide.

Various techniques were employed for isolating the cDNA clones described below. A general description of the methods employed follows immediately hereafter, whereas the details relating the specific sequences isolated is recited separately for each native sequence. It is understood that the actual sequences of the PRO polypeptides are those which are contained within or encoded by the clone deposited with the ATCC - and that in the event of any discrepancy between the sequence deposited and the sequence disclosed herein, the sequence of the deposit is the true sequence

10 *ECD Homology:*

The extracellular domain (ECD) sequences (including the secretion signal sequence, if any) from about 950 known secreted proteins from the Swiss-Prot public database were used to search EST databases. The EST databases included public EST databases (e.g., GenBank), a private EST database (LIFESEQ™, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA), and proprietary ESTs from Genentech. The search was performed using the computer program BLAST or BLAST2 [Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266: 460-480 (1996)] as a comparison of the ECD protein sequences to a 6 frame translation of the EST sequences. Those comparisons resulting in a BLAST score of 70 (or in some cases, 90) or greater that did not encode known proteins were clustered and assembled into consensus DNA sequences with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

Using various ESTs, drawing from both public and private databases, a consensus DNA sequence was assembled. Oligonucleotides were then synthesized to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest and for use as probes to isolate a clone encoding the particular native sequence PRO polypeptide identified herein.

In order to screen several libraries for a source of a full-length, native sequence clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification with the PCR primer pair identified below. A positive library was then used to isolate clones encoding the particular native sequence PRO polypeptide using the probe oligonucleotide and one of the PCR primers.

RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from various human tissue libraries, including, e.g., fetal lung, fetal liver, fetal brain, small intestine, smooth muscle cells, etc. The cDNA libraries used to isolated the cDNA clones were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to SalI hemikinased adaptors, cleaved with NotI, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRKB; pRKS5B is a precursor of pRKSD that does not contain the SfiI site; see, Holmes *et al.*, *Science*, 253:1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NotI sites. The clones were sequenced using known and readily available methodology.

*Amylase yeast screen:*

1. Preparation of oligo dT primed cDNA library

mRNA was isolated from various tissues (e.g., such as those indicated above under the ECD homology procedure) using reagents and protocols from Invitrogen, San Diego, CA (Fast Track 2). This RNA was used to

WO 00/53758

PCT/US00/05841

generate an oligo dT primed cDNA library in the vector pRKSD using reagents and protocols from Life Technologies, Gaithersburg, MD (Super Script Plasmid System). In this procedure, the double stranded cDNA was sized to greater than 1000 bp and the SalI/NotI linker cDNA was cloned into XhoI/NotI cleaved vector. pRKSD is a cloning vector that has an sp6 transcription initiation site followed by an SfiI restriction enzyme site preceding the XhoI/NotI cDNA cloning sites.

## 2. Preparation of random primed cDNA library

A secondary cDNA library was generated in order to preferentially represent the 5' ends of the primary cDNA clones. Sp6 RNA was generated from the primary library (described above), and this RNA was used to generate a random primed cDNA library in the vector pSST-AMY.0 using reagents and protocols from Life Technologies (Super Script Plasmid System, referenced above). In this procedure the double stranded cDNA was sized to 500-1000 bp, linker with blunt to NotI adaptors, cleaved with SfiI, and cloned into SfiI/NotI cleaved vector. pSST-AMY.0 is a cloning vector that has a yeast alcohol dehydrogenase promoter preceding the cDNA cloning sites and the mouse amylase sequence (the mature sequence without the secretion signal) followed by the yeast alcohol dehydrogenase terminator, after the cloning sites. Thus, cDNAs cloned into this vector that are fused in frame with amylase sequence will lead to the secretion of amylase from appropriately transfected yeast colonies.

## 3. Transformation and Detection

DNA from the library described in paragraph 2 above was chilled on ice to which was added electrocompetent DH10B bacteria (Life Technologies, 20 ml). The bacteria and vector mixture was then electroporated as recommended by the manufacturer. Subsequently, SOC media (Life Technologies, 1 ml) was added and the mixture was incubated at 37°C for 30 minutes. The transformants were then plated onto 20 standard 150 mm LB plates containing ampicillin and incubated for 16 hours (37°C). Positive colonies were scraped off the plates and the DNA was isolated from the bacterial pellet using standard protocols, e.g., Ciscogradient. The purified DNA was then carried on to the yeast protocols below.

The yeast methods were divided into three categories: (1) Transformation of yeast with the plasmid/cDNA combined vector; (2) Detection and isolation of yeast clones secreting amylase; and (3) PCR amplification of the insert directly from the yeast colony and purification of the DNA for sequencing and further analysis.

The yeast strain used was HD56-5A (ATCC-90785). This strain has the following genotype: MAT alpha, ura3-52, leu2-3, leu2-112, his3-11, his3-15, MAL<sup>+</sup>, SUC<sup>+</sup>, GAL<sup>+</sup>. Preferably, yeast mutants can be employed that have deficient post-translational pathways. Such mutants may have translocation deficient alleles in *sec71*, *sec72*, *sec62*, with truncated *sec71* being most preferred. Alternatively, antagonists (including antisense nucleotides and/or ligands) which interfere with the normal operation of these genes, other proteins implicated in this post translation pathway (e.g., SEC61p, SEC72p, SEC62p, SEC63p, TDJ1p or SSA1p-4p) or the complex formation of these proteins may also be preferably employed in combination with the amylase-expressing yeast.

Transformation was performed based on the protocol outlined by Gietz *et al.*, *Nucl. Acid. Res.*, 20:1425 (1992). Transformed cells were then inoculated from agar into YEPD complex media broth (100 ml) and

WO 00/53758

PCT/US00/05841

grown overnight at 30°C. The YEPD broth was prepared as described in Kaiser *et al.*, *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 207 (1994). The overnight culture was then diluted to about  $2 \times 10^6$  cells/ml (approx.  $OD_{600} = 0.1$ ) into fresh YEPD broth (500 ml) and regrown to  $1 \times 10^7$  cells/ml (approx.  $OD_{600} = 0.4-0.5$ ).

The cells were then harvested and prepared for transformation by transfer into GS3 rotor bottles in a Sorval GS3 rotor at 5,000 rpm for 5 minutes, the supernatant discarded, and then resuspended into sterile water, and centrifuged again in 50 ml falcon tubes at 3,500 rpm in a Beckman GS-6KR centrifuge. The supernatant was discarded and the cells were subsequently washed with LiAc/TE (10 ml, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.5, 100 mM Li2OCCCH3), and resuspended into LiAc/TE (2.5 ml).

Transformation took place by mixing the prepared cells (100  $\mu$ l) with freshly denatured single stranded salmon testes DNA (Lofstrand Labs, Gaithersburg, MD) and transforming DNA (1  $\mu$ g, vol. < 10  $\mu$ l) in microfuge tubes. The mixture was mixed briefly by vortexing, then 40% PEG/TE (600  $\mu$ l, 40% polyethylene glycol-4000, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM Li2Ac, pH 7.5) was added. This mixture was gently mixed and incubated at 30°C while agitating for 30 minutes. The cells were then heat shocked at 42°C for 15 minutes, and the reaction vessel centrifuged in a microfuge at 12,000 rpm for 5-10 seconds, decanted and resuspended into TE (500  $\mu$ l, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.5) followed by recentrifugation. The cells were then diluted into TE (1 ml) and aliquots (200  $\mu$ l) were spread onto the selective media previously prepared in 150 mm growth plates (VWR).

Alternatively, instead of multiple small reactions, the transformation was performed using a single, large scale reaction, wherein reagent amounts were scaled up accordingly.

The selective media used was a synthetic complete dextrose agar lacking uracil (SCD-Ura) prepared as described in Kaiser *et al.*, *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 208-210 (1994). Transformants were grown at 30°C for 2-3 days.

The detection of colonies secreting amylase was performed by including red starch in the selective growth media. Starch was coupled to the red dye (Reactive Red-120, Sigma) as per the procedure described by Biel *et al.*, *Anal. Biochem.*, 172:176-179 (1988). The coupled starch was incorporated into the SCD-Ura agar plates at a final concentration of 0.15% (w/v), and was buffered with potassium phosphate to a pH of 7.0 (50-100 mM final concentration).

The positive colonies were picked and streaked across fresh selective media (onto 150 mm plates) in order to obtain well isolated and identifiable single colonies. Well isolated single colonies positive for amylase secretion were detected by direct incorporation of red starch into buffered SCD-Ura agar. Positive colonies were determined by their ability to break down starch resulting in a clear halo around the positive colony visualized directly.

Isolation and sequencing by standard techniques identified a yeast EST fragment which served as the basis for additional database mining as described below.

#### 4. Assembly

The yeast EST fragment identified above was used to search various expressed sequence tag (EST) databases. The EST databases included public EST databases (e.g., GenBank, Merck/Wash U) and a proprietary EST DNA database (LIFESEQ<sup>®</sup>, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). The search was

WO 00/53758

PCT/US00/05841

performed using the computer program BLAST or BLAST2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)) as a comparison of the ECD protein sequences to a 6 frame translation of the EST sequence. Those comparisons resulting in a BLAST score of 70 (or in some cases 90) or greater that did not encode known proteins were clustered and assembled into consensus DNA sequences with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

A consensus DNA sequence was assembled relative to other EST sequences using phrap. The consensus DNA sequence was extended using repeated cycles of BLAST and phrap to extend the consensus sequence as far as possible using the sources of EST sequences discussed above as well as EST sequences proprietary to Genentech.

Based on this consensus sequence, oligonucleotides were synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone encoding the particular PRO polypeptide. In order to screen several libraries for a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification, as per Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, with the PCR primer pair. A positive library was then used to isolate clones encoding the gene of interest using the probe oligonucleotide and one of the primer pairs.

RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from various human tissues. The cDNA libraries used to isolate the cDNA clones were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to SalI hemikinased adaptors, cleaved with NotI, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRKB or pRKD; pRK5B is a precursor of pRK5D that does not contain the SfiI site; Holmes *et al.*, *Science*, 253: 1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NotI sites.

#### Signal algorithm:

A proprietary signal sequence finding algorithm developed by Genentech, Inc was used upon Expressed Sequence Tags (ESTs) and on clustered and assembled EST fragments from public (e.g., GenBank) and/or private (Lifeseq<sup>®</sup>, Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA) databases. The signal sequence algorithm computes a secretion signal score based on the character of the DNA nucleotides surrounding the first and optionally the second methionine codon(s) (ATG) at the 5'-end of the sequence or sequence fragment under consideration. The nucleotides following the first ATG must code for at least 35 unambiguous amino acids without any stop codons. If the first ATG has the required amino acids, the second is not examined. If neither meets the requirement, the candidate sequence is not scored. In order to determine whether the EST sequence contains an authentic signal sequence, the DNA and corresponding amino acid sequences surrounding the ATG codon are scored using a set of seven sensors (evaluation parameters) known to be associated with secretion signals.

The above procedure resulted in the identification of EST sequences which were compared to a variety of expressed sequence tag (EST) databases which included public EST databases (e.g., GenBank) and a proprietary EST DNA database (LIFESEQ<sup>®</sup>, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). The homology search was performed using the computer program BLAST or BLAST2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)). Those comparisons resulting in a BLAST score of 70 (or in some cases 90) or greater

WO 00/53758

PCT/US00/05841

that did not encode known proteins were clustered and assembled into a consensus DNA sequence with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington). This resulted in the identification of additional EST sequences which either corresponded to full-length clones, which were examined and sequenced or served as a template for the creation of cloning oligonucleotides which were then used to screen various tissue libraries resulting in isolation of DNA encoding a native sequence PRO polypeptide.

A. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO200 (UNQ174)

Probes based on an expressed sequence tag (EST) identified from the Incyte Pharmaceuticals database due to homology with VEGF were used to screen a cDNA library derived from the human glioma cell line G61. Screening may be conducted in a manner similar to the procedure disclosed elsewhere in this application. In particular, Incyte Clone "INC1302516" was used to generate the following four probes:

WO 00/53758

PCT/US00/05841

5'-ACTTCTCAGTGTCCATAAGGG-3' (SEQ ID NO:3)  
 5'-GAACATAAGAGAACCGATACCAATTTCTGGCCAGTTGTC-3' (SEQ ID NO:4)  
 5'-CACCACAGCGTTTAACCAAGG-3' (SEQ ID NO:5)  
 5'-ACAACAGGCACAGTCCCAC-3' (SEQ ID NO:6)

Nine positives were identified and characterized. Three clones contained the full coding region and were identical in sequence. Partial clones were also identified from a fetal lung library and were identical with the glioma-derived sequence with the exception of one nucleotide change which did not alter the encoded amino acid.

For mammalian protein expression, the entire open reading frame (ORF) was cloned into a CMV-based expression vector. An epitope-tag (FLAG, Kodak) and Histidine-tag (His8) were inserted between the ORF and stop codon. UNQ174-His8 and UNQ174-FLAG were transfected into human embryonic kidney 293 cells by SuperFect (Qiagen) and pulse-labeled for 3 hours with [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>C]cysteine. Both epitope-tagged proteins co-migrate when 20 microliters of 15-fold concentrated serum-free conditioned medium were electrophoresed on a polyacrylamide gel (Novex) in sodium dodecyl sulfate sample buffer (SDS-PAGE). The UNQ174-IgG expression plasmid was constructed by cloning the ORF in front of the human Fc (IgG) sequence.

The UNQ174-IgG plasmid was co-transfected with Baculogold Baculovirus DNA (Pharmingen) using Lipofectin (GibcoBRL) into 10<sup>5</sup> Sf9 cells grown in Hink's TNM-FH medium (JRH Biosciences) supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were incubated for 5 days at 28°C. The supernatant was harvested and subsequently used for the first viral amplification by infecting Sf9 cells at an approximate multiplicity of infection (MOI) of 10. Cells were incubated for 3 days, then supernatant harvested, and expression of the recombinant plasmid determined by binding of 1 ml of supernatant to 30 µl of Protein-A Sepharose CL-4B beads (Pharmacia) followed by subsequent SDS-PAGE analysis. The first amplification supernatant was used to infect a 500 ml spinner culture of Sf9 cells grown in ESF-921 medium (Expression Systems LLC) at an approximate MOI of 0.1. Cells were treated as above, except harvested supernatant was sterile filtered. Specific protein was purified by binding to Protein-A Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia) column.

The entire nucleotide sequence of the identified clone DNA29101 is shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1). Clone DNA29101 (SEQ ID NO:1) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide residues 285-287 and ending at the stop codon (TAG) found at nucleotide positions 1320-1322 (Figure 1, SEQ ID NO:1), as indicated by bolded underline. The predicted PRO200 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ174, SEQ ID NO:2) is 345 amino acids in length, has a calculated molecular weight of 39029 daltons, a pI of 6.06 and is shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2). Potential N-glycosylation sites are at amino acid residues 25, 54 and 254. CUB domains are at amino acid residues 52-65, 118-125 and 260-273.

A cDNA containing DNA encoding UNQ174 (SEQ ID NO:2) has been deposited with the ATCC on March 5, 1998 and has been assigned deposit number 209653.

#### B. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO204 (UNQ178)

An expressed sequence tag (EST) DNA database (LIFESEQ<sup>®</sup>, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) was searched and an EST was identified. Human fetal retina cDNA libraries were screened with PCR

WO 00/53758

PCT/US00/05841

oligonucleotide primers and confirmed by hybridization with synthetic oligonucleotide probe which was based upon the EST sequence.

hybridization probe:

5'-GGCATGCAGCAGCTGGACATTTGCGAGGGCTTTGCTGGCTG-3' (SEQ ID NO:7)

5 forward PCR primer:

5'-CTGCTGCAGAGTTGCACGAAC-3' (SEQ ID NO:8)

reverse PCR primer 1:

5'-CAGTTGTTGTGTCACAGAGAAG-3' (SEQ ID NO:9)

reverse PCR primer 2:

10 5'-AGTTCGTGCAACTCTGCAGCAG-3' (SEQ ID NO:10)

A cDNA clone was identified and sequenced in entirety. The entire nucleotide sequence of the identified clone DNA30871 is shown in Figure 3 (SEQ ID NO:11). Clone DNA30871-1157 (SEQ ID NO:11) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 376-378 and ending at the stop codon (TAA) found at nucleotide positions 1498-1500 (Figure 3; SEQ ID NO:11), as indicated by bolded underline. The predicted PRO204 polypeptide precursor (i.e., UNQ178, SEQ ID NO:12) is 374 amino acids long, has a calculated molecular weight of 39,285 daltons, a pI of 6.06 and is shown in Figure 4. A cDNA containing DNA encoding UNQ178 (SEQ ID NO:12) has been deposited with the ATCC on October 16, 1997 and has been assigned deposit number 209380.

#### 20 C. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO212 (UNQ186)

Use of the ECD homology procedure described above from a human fetal lung library resulted in the identification of the full-length DNA sequence for DNA30942 (Fig. 5; SEQ ID NO:13) and the derived protein sequence UNQ186 (Fig. 6; SEQ ID NO:14).

The PCR primers (forward and reverse) and probes used in the procedure were the following:

25 forward primer: 5'-CACGCTGGTTTCTGCTTGGAG-3' (SEQ ID NO:15)

reverse primer: 5'-AGCTGGTGCACAGGGTGTCTAG-3' (SEQ ID NO:16)

hybridization probe: (SEQ ID NO:17)

5'-CCCAGGCACCTTCTCAGCCAGCCAGCAGCTCCAGCTCAGAGCAGTGCCAGCCC-3'

The entire nucleotide sequence of DNA30942 is shown in Figure 5 (SEQ ID NO:13). Clone DNA30942 (SEQ ID NO:13) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 101-103 and ending at the stop codon (TGA) at positions 1001-1003 (Fig. 5; SEQ ID NO:13), as indicated in bolded underline. The predicted PRO212 polypeptide precursor of Fig. 6 (SEQ ID NO:14) is 300 amino acids long, has a calculated molecular weight of 32680 daltons and a pI of 8.70. It is believed that the PRO212 sequence of Fig. 6 (SEQ ID NO:14) lacks a transmembrane domain. It is also believed that amino acids 1 to 215 of Fig. 6 (SEQ ID NO:14) represents an ECD which includes four cysteine rich domains (CRDs). A cDNA clone containing DNA30942 (SEQ ID NO:13) has been deposited with ATCC (identified as DNA30942-1134) on September 16, 1997 and has been assigned ATCC deposit no. 209254.



WO 00/53758

PCT/US00/05841

D. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO216 (UNQ190)

A procedure analogous to the one above for the isolation of PRO212 can be employed to isolate DNA33087 (SEQ ID NO:18) (Figure 7) which encodes the PRO216 polypeptide UNQ190 (SEQ ID NO:19)(Figure 8).

DNA33087 contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site nucleotide residues 268-270 and ending at the stop codon (TAG) are residues 1531-1533 (Fig. 7, SEQ ID NO:18), as indicated by bolded underline. The predicted PRO215 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ190, SEQ ID NO:19) is 421 amino acids long, has a calculated molecular weight of 49492 daltons and a pI of 5.51 (Fig. 8).

Hydropathy analysis suggests the presence of a signal sequence at amino acid residues 1 to 20, tyrosine kinase phosphorylation sites at amino acid residues 268-274 and 300-306, and N-myristoylation site residue 230-235, and leucine zippers at residues 146 to 167 and 217 to 238. Alternatively to traditional isolation techniques, the DNA sequence is publicly available from GenBank as accession number AB000114 which encodes Dayhoff protein AB000114\_1.

Alternatively still, the sequence is described in *Ohno et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228(2): 411-414 (1996). A cDNA clone containing DNA33087 (identified as DNA33087-1158) has been deposited with the American Type Culture Collection (ATCC) on September 16, 1997 and has been assigned ATCC Dep. No. 209381.

E. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO226 (UNQ200)

Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal lung library resulted in the identification of the full-length DNA sequence for DNA33460 (Figure 9; SEQ ID NO:20) and the derived native sequence protein UNQ200 (SEQ ID NO:21).

DNA33460 contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide residues 62-64 and ending at the stop codon (TGA) at residues 1391-1393 (Fig. 9; SEQ ID NO: 20), as indicated by bolded underline. The predicted PRO226 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ200, SEQ ID NO:21) is 443 amino acids long, has a calculated molecular weight of 49,391 daltons, a pI of 4.82 and is shown in Figure 10 as UNQ200 (SEQ ID NO:21). A cDNA clones containing DNA33460 (SEQ ID NO:20), designated as DNA33460-1166, has been deposited with the ATCC on October 16, 1997 and has been assigned ATCC deposit number 209376.

The oligonucleotide sequences used in the above procedure were the following:

28722.p (OL1488) (SEQ ID NO: 22)

5'-TGTGTGGACATAGACGAGTGCCGCTACCGCTACTGCCAGCACCGC-3'

28722.f (OL1489) (SEQ ID NO: 23)

35 5'-AGGACTGCCATAACTTGCTG-3'

28722.r (OL1490) (SEQ ID NO: 24)

5'-ATAGGAGTTGAAGCAGCGCTGC-3'

WO 00/53758

PCT/US00/05841

F. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO240 (UNQ214)

Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal liver library resulted in the isolation of the full-length DNA sequence for DNA34387 (Figure 11; SEQ ID NO:25) and the derived native sequence protein UNQ214 (SEQ ID NO:26).

5 The entire nucleotide sequence of DNA34387 is shown in Figure 11 (SEQ ID NO:25). The clone DNA34387 contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 12-14 and ending at the stop codon (TGA) at nucleotide positions 699-701 (Fig. 11; SEQ ID NO:25), as indicated by bolded underline. The predicted PRO240 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ214, SEQ ID NO:26) is 229 amino acids long, has a calculated molecular weight of 24,689 daltons, a pI of 7.83 and is shown in Figure 12. A cDNA clone containing DNA34387 (SEQ ID NO:25) has been deposited with ATCC on 10 September 16, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209260.

The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probe synthesized for use in the above-described procedure were the following:

15 forward PCR primer: 5'-TCAGTCCAGACTCTGATACTGCC-3' (SEQ ID NO:27)  
reverse PCR primer: 5'-TGCCTTTCTAGGAGGCAGAGCTCC-3' (SEQ ID NO:28)  
hybridization probe: (SEQ ID NO:29)  
 5'-GGACCCAGAAATGTGCTCTGAGAATGGATCTTGTGTACCTGATGGTCCAG-3'

G. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO235 (UNQ209)

20 Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal liver library resulted in the isolation of the full-length DNA sequence for DNA35558 (Figure 13; SEQ ID NO:30) and the derived PRO235 native sequence protein UNQ209 (Fig. 14, SEQ ID NO:31).

25 The entire nucleotide sequence of DNA35558 is shown in Figure 13 (SEQ ID NO:30). The DNA35558 clone shown in Figure 13 contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 667-669 and ending at the stop codon (TGA) at nucleotide positions 2323-2325, as indicated by bolded underline. The predicted PRO235 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ209, SEQ ID NO:31) is 552 amino acids long, has a calculated molecular weight of 61,674 daltons and a pI of 6.95 (Figure 14). A cDNA clone containing DNA35558 has been deposited with ATCC on October 16, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209374.

30 The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probe synthesized for use in the above procedure were:

forward PCR primer: 5'-TGGAATACCGCCTCTGCAG-3' (SEQ ID NO:32)  
reverse PCR primer: 5'-CTTCTGCCCTTTGGAGAAGATGGC-3' (SEQ ID NO:33)  
hybridization probe:  
 35 5'-GGACTCACTGGCCAGGCCTTCAATATCACCAGCCAGGACGAT-3' (SEQ ID NO:34)

WO 00/53758

PCT/US80/05841

H. Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO245 (UNQ219)

Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal liver library resulted in the isolation of the full-length DNA sequence for DNA35638 (Figure 15, SEQ ID NO:35) and the derived PRO245 native sequence protein UNQ219 (Figure 16, SEQ ID NO:36).

5 The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probes synthesized for use with the above-described method were the following:

forward PCR primer 5'-ATCGTTGTGAAGTTAGTGCCCC-3' (SEQ ID NO:37)

reverse PCR primer 5'-ACCTGCGATATCCAACAGAATTG-3' (SEQ ID NO:38)

hybridization probe (SEQ ID NO:39)

10 5'-GGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAGTATTAGTGGCTCCAGCAGTTCC-3'

The entire nucleotide sequence of DNA35638 (SEQ ID NO:35) is shown in Figure 15. Clone DNA35638 contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 89-91 and ending at the stop codon (TAG) at nucleotide positions 1025-1027 (Fig. 15; SEQ ID NO:35). The predicted PRO245 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ219, SEQ ID NO:36) is 312 amino acids  
15 long, has a calculated molecular weight of 34,554 daltons and a pI of 9.39 (Fig. 36). A clone containing DNA35638 (SEQ ID NO:35), designated as DNA35638-1141, has been deposited with ATCC on September 16, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209265.

I. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO172 (UNQ146)

20 Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal kidney library resulted in the isolation of the full-length DNA sequence for DNA35916 (Fig. 17; SEQ ID NO:40) and the derived PRO172 native sequence protein UNQ146 (Fig. 18, SEQ ID NO:41).

Clone DNA35916 (SEQ ID NO:40) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 38-40 and ending at the stop codon (TAA) at nucleotide positions 2207-2209, as indicated by bolded underline in Fig. 17. The predicted PRO172 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ146; SEQ ID NO:41) is 723 amino acids long, has a calculated molecular weight of 78,055 daltons and a pI of 6.17 (Fig. 18). A cDNA clone containing DNA35916 (SEQ ID NO:40) has been deposited with ATCC on October 28, 1997 (designated as DNA35916-1161) and has been assigned ATCC deposit no. 209419.

The oligonucleotide sequences used in the above procedure were the following:

30 28765.p (OLI633)  
5'-AAATCTGTGAATTGAGTGCCATGGACCTGTTGCGGACGGCCCTTGCTT-3' (SEQ ID NO:42)

28765.f (OLI644)

5'-GGATCTCGAGAACAGCTACTCC-3' (SEQ ID NO:43)

28765.r (OLI645)

35 5'-TCGTCCAGTTGTCGTACATG-3' (SEQ ID NO:44)

WO 00/53758

PCT/US00/05841

J. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO273 (UNQ240)

Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal kidney library resulted in the isolation of the full-length DNA sequence for DNA39523 (Fig. 19; SEQ ID NO:45) and the derived PRO273 native sequence protein UNQ240 (Fig. 20, SEQ ID NO:46).

5 The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probe synthesized were the following:

forward PCR primer: 5'-CAGCGCCCTCCCATGTCCCTG-3' (SEQ ID NO:47)

reverse PCR primer: 5'-TCCCAACTGGTTTGGAGTTTCCC-3' (SEQ ID NO:48)

hybridization probe:

5'-CTCCGGTCAGCATGAGGCTCCTGGCGCCGCTGCTCCTGCTGCTG-3' (SEQ ID NO:49)

10 Clone DNA39523 (SEQ ID NO:45) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 167-169 and ending at the stop codon (TAG) at nucleotide positions 500-502 (Figure 19), as indicated by bolded underline. The predicted PRO273 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ240, SEQ ID NO:46) is 111 amino acids long, has a calculated molecular weight of 13,078 daltons and a pI of 10.37 (Figure 20). A cDNA clone including DNA39523 (SEQ ID NO:45) has been deposited with

15 ATCC on October 31, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209424.

K. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO272 (UNQ239)

Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal lung tissue in combination with an *in vivo* cloning procedure using the probe oligonucleotide and one of the primer pairs resulted in the identification of the full length DNA sequence for DNA40620 (Fig. 21, SEQ ID NO:50) and the derived PRO272 native sequence protein UNQ239 (SEQ ID NO:51).

The forward and reverse PCR primers and hybridization probes synthesized and used to isolate the PRO272 encoding DNA sequences were the following:

forward PCR primer (.F1): 5'-CGCAGGCCCTCATGGCCAGG-3' (SEQ ID NO:52)

25 forward PCR primer (.F2): 5'-GAAATCCTGGGTAATTGG-3' (SEQ ID NO:53)

reverse PCR primer: 5'-GTGCGCGTGCTCAGCTCATC-3' (SEQ ID NO:54)

hybridization probe:

5'-CCCCCTGAGCGACGCTCCCCATGATGACGCCACGGGAATTTC-3' (SEQ ID NO:55)

30 Clone DNA40620 (SEQ ID NO:50) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 35-37 and ending at the stop codon (TGA) at nucleotide positions 1020-1022 (Figure 21), as indicated by bolded underline. The predicted polypeptide precursor is 328 amino acids long (Figure 22), has a calculated molecular weight of 37,493 daltons and a pI of 4.77. A cDNA clone containing DNA40620 (SEQ ID NO:50) has been deposited with ATCC on October 17, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209388.

35

L. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO332 (UNQ293)

Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal liver library resulted in the identification of the full-length DNA sequence for DNA40982 (Fig. 23, SEQ ID NO:56) and the derived PRO332 native sequence protein UNQ293 (Fig. 24, SEQ ID NO:57).

WO 00/53758

PCT/US00/05841

The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probe synthesized for use in the above procedure were:

5'-GCAATTGGCCGCGAGACTTTGCC-3' (SEQ ID NO:58)

5'-GCGGCCACGGTCCTTGAAATG-3' (SEQ ID NO:59)

5'-TGGAGGAGCTCAACCTCAGCTACAACCGCATCACCAGCCCACAGG-3' (SEQ ID NO:60)

The entire nucleotide sequence of DNA40982 (SEQ ID NO:56) is shown in Figure 23. Clone DNA40982 (SEQ ID NO:56) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 342-344 and ending at the stop codon (TAG) at nucleotide positions 2268-2270, as indicated in Figure 23 by bolded underline. The predicted PRO332 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ293, SEQ ID NO:57, Fig. 24) is 642 amino acids long, and has a calculated molecular weight of 72,067, and a pI of 6.60. A cDNA clone containing DNA40982 (SEQ ID NO:56) (designated as DNA40982-1235) has been deposited with ATCC on November 7, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209433.

M. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO526 (UNQ330)

Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal liver library resulted in the identification of the full-length DNA sequence DNA44184 (Fig. 25, SEQ ID NO:61) and the derived PRO526 native sequence protein UNQ330 (Fig. 26, SEQ ID NO:62).

The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probes synthesized were the following:

forward PCR primer: 5'-TGGCTGCCCTGCAGTACCTCTACC-3' (SEQ ID NO:63)

reverse PCR primer: 5'-CCCTGCAGGTCATTGGCAGCTAGG-3' (SEQ ID NO:64)

hybridization probe: 5'-AGGCACTGCCTGATGACACCTTCCGCGACCTGGGCAACCTCACAC-3' (SEQ ID NO:65)

Clone DNA44184 (SEQ ID NO:61) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 514-516 and ending at the stop codon (TGA) at nucleotide positions 1933-1935 (Figure 61), as indicated by bolded underline. The predicted PRO526 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ330, SEQ ID NO:62) is 473 amino acids long (Figure 62). The UNQ330 (SEQ ID NO:62) protein shown in Figure 62 has an estimated molecular weight of about 50708 daltons and a pI of about 9.28. A cDNA clone containing DNA44184 has been deposited with the ATCC on 26 March 1998 (under the designation DNA44184-1319) and is assigned deposit number 209704.

Analysis of UNQ330 (SEQ ID NO:62) reveals that the signal peptide sequence is at about amino acids 1-26. A leucine zipper pattern is at about amino acids 135-156. A glycosaminoglycan attachment is at about amino acids 436-439. N-glycosylation sites are at about amino acids 82-85, 179-182, 237-240 and 423-426. A von Willebrand factor (VWF) type C domain(s) is found at about amino acids 411-425. The skilled artisan can understand which nucleotides correspond to these amino acids based on the sequences provided herein.

N. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO701 (UNQ365)

Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal liver library resulted in the identification of the full-length DNA sequence DNA44205 (Fig. 27, SEQ ID NO:66) and the derived PRO526 native sequence protein UNQ365 (Fig. 28, SEQ ID NO:67).

WO 00/53758

PCT/US00/05841

The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probe synthesized for use in the above procedure were:

5'-GGCAAGCTACGGAAACGTCATCGTG-3' (SEQ ID NO:68)

5'-AACCCCGAGCCAAAAGATGGTCAC-3' (SEQ ID NO:69)

5'-GTACCGGTGACCAGGCAGCAAAAGGCAACTATGGGCTCCTGGATCAG-3' (SEQ ID NO:70)

Clone DNA44205 (SEQ ID NO:66) contains a single open reading frame (with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 50-52 and ending at the stop codon (TAG) at nucleotide positions 2498-3000, as indicated by bolded underline in Figure 27. The predicted PRO701 polypeptide precursor (*i.e.*, Fig. 28, UNQ365, SEQ ID NO:67) is 816 amino acids long, and has a calculated molecular weight of 91,794 Da (pI: 5.88). A cDNA clone containing DNA44205 (SEQ ID NO:66) (designated as DNA44205-1285) has been deposited with ATCC on March 31, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 209720.

UNQ365 (SEQ ID NO:67) contains a potential signal peptide cleavage site at about amino acid position 25. There are potential N-glycosylation sites at about amino acid positions 83, 511, 716 and 803. The carboxylesterase type-B signature 2 sequence is at about residues 125 to 135. Regions homologous with carboxylesterase type-B are also at about residues 54-74, 197-212 and 221-261. A potential transmembrane region corresponds approximately to amino acids 671 through about 700. The corresponding nucleic acids can be routinely determined from the sequences provided herein.

#### O. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO361 (UNQ316)

Use of the ECD homology procedure described above in combination with an *in vivo* cloning procedure using the probe oligonucleotide and one of the primer pairs in a human fetal kidney library resulted in the identification of the full-length DNA sequence DNA45410 (Fig. 29, SEQ ID NO:71) and the derived PRO361 native sequence protein UNQ316 (Fig. 30, SEQ ID NO:72).

The forward and reverse PCR primers and a hybridization probe were synthesized for use in the above-described method:

forward PCR primer (.f1):

5'-AGGGAGGATTATCCTTGACCTTTGAAGACC-3' (SEQ ID NO:73)

forward PCR primer (.f2): 5'-GAAGCAAGTGCCAGCTC-3' (SEQ ID NO:74)

forward PCR primer (.f3): 5'-CGGGTCCCTGCTCTTTGG-3' (SEQ ID NO:75)

reverse PCR primer (.r1): 5'-CACCGTAGCTGGGAGCGCACTCAC-3' (SEQ ID NO:76)

reverse PCR primer (.r2): 5'-AGTGTAAAGTCAAGCTCCC-3' (SEQ ID NO:77)

hybridization probe:

5'-GCTTCCTGACACTAAGGCTGTCTGCTAGTCAGAATTGCCTCAAAAAGAG-3' (SEQ ID NO:78)

Clone DNA45410 (SEQ ID NO:71) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 226-228 and ending at the stop codon (TAA) at nucleotide positions 1519-1521 (Figure 29), as indicated by bolded underline. The predicted PRO361 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ316, SEQ ID NO:72) is 431 amino acids long (Figure 30). The native sequence PRO361 protein shown in Figure 30 as UNQ316 has an estimated molecular weight of about 46810 and a pI of about 6.45. In addition, regions indicative of the arginase family proteins are present at about residues F3 to V14 and again at I39 to T37, while a transmembrane domain exists at about residues P380 to S409. A cDNA clone containing

WO 00/53758

PCT/US00/05841

DNA45410 (SEQ ID NO:71) has been deposited with ATCC on February 5, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 209621.

5

P. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO362 (UNQ317)

Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal brain library resulted in the isolation of the full-length DNA sequence DNA45416 (Fig. 31, SEQ ID NO:79) and the derived PRO362 native sequence protein UNQ317 (Fig. 32, SEQ ID NO:80).

The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probe synthesized for use in the above procedure were:

forward PCR primer 1: 5'-TATCCCTCCAATTGAGCACCTGG-3' (SEQ ID NO:81)  
 forward PCR primer 2: 5'-GTCGGAGACATCCCAACAAG-3' (SEQ ID NO:82)  
 reverse PCR primer 1: 5'-CTTCACAATGTCGCTGTGCTGCTC-3' (SEQ ID NO:83)  
 reverse PCR primer 2: 5'-AGCCAAATCCAGCAGCTGGCTTAC-3' (SEQ ID NO:84)

hybridization probe:  
 5'-TGGATGACCGGAGCCACTACACGTGTGAAGTCACCTGGCAGACTCCTGAT-3' (SEQ ID NO:85)

Clone DNA45416 (SEQ ID NO:79) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 119-121 and ending at the stop codon (TAA) at nucleotide positions 1082-1084 (Figure 31), as indicated by bolded underline. The predicted PRO362 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ317, SEQ ID NO:80) is 321 amino acids long (Figure 32). The UNQ317 protein (SEQ ID NO:80) shown in Figure 32 has an estimated molecular weight of about 35,544 daltons and a pI of about 8.51. Analysis of the UNQ317 polypeptide as shown in Figure 32 evidences the presence of a glycosaminoglycan attachment site at about amino acid 149 to about amino acid 152 and a transmembrane domain from about amino acid 276 to about amino acid 306. A cDNA clone containing DNA45416 (SEQ ID NO:79) has been deposited with ATCC on February 5, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 209620.

Q. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO363 (UNQ318)

Use of the ECD homology described above in a human fetal kidney library resulted in the isolation of the full-length DNA sequence DNA45419 (Fig. 33, SEQ ID NO:86) and the derived PRO363 native sequence protein UNQ318 (Fig. 34, SEQ ID NO:87).

The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probe synthesized for use in the above procedure were:

forward PCR primer: 5'-CCAGTGCACAGCAGGCAACGAAGC-3' (SEQ ID NO:88)  
 reverse PCR primer: 5'-ACTAGGCTGTATGCCTGGGTGGGC-3' (SEQ ID NO:89)  
 hybridization probe: 5'-GTATGTACAAAGCATCGGCATGGTTGCAGGAGCAGTGACAGGC-3' (SEQ ID NO:90)

99

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Clone DNA45419 (SEQ ID NO:86) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 190-192 and ending at the stop codon (TGA) at nucleotide positions 1309-1311 (Figure 33), as indicated by bolded underline. The predicted PRO363 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ318, SEQ ID NO:87) is 373 amino acids long (Figure 34). The UNQ318 protein (SEQ ID NO:87) shown in Figure 34 has an estimated molecular weight of about 41,281 daltons and a pI of about 8.33. Analysis of the UNQ318 polypeptide as shown in Figure 34 evidences the presence of a transmembrane domain at about amino acid residue 221 to about residue 254. A cDNA clone containing DNA45419 (SEQ ID NO:86) has been deposited with ATCC on February 5, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 209616.

10 R. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO364 (UNQ319)

Use of the ECD homology procedure described above in a human small intestine library resulted in the identification of an expressed sequence tag (EST) (Incyte EST No. 3003460) that encoded a polypeptide which showed homology to members of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family of polypeptides.

A consensus DNA sequence was then assembled relative to the Incyte 3003460 EST in a manner similar to that used in the ECD homology procedure which resulted in the isolation of the full-length DNA sequence DNA47365 (Fig. 35, SEQ ID NO:91) and the derived PRO364 native sequence protein UNQ319 (Fig. 36, SEQ ID NO:92).

The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probes synthesized for use in the above-described screening procedure were:

- 20 forward PCR primer (44825.f1): 5'-CACAGCACGGGGCGATGGG-3' (SEQ ID NO:93)  
forward PCR primer (44825.f2): 5'-GCTCTGCGTTCGTCTG-3' (SEQ ID NO:94)  
forward PCR primer (44825.G1TR.f):  
 5'-GGCACAGCACGGGGCGATGGGCGCGTTT-3' (SEQ ID NO:95)  
reverse PCR primer (44825.r1): 5'-CTGGTCACTGCCACCTTCCTGCAC-3' (SEQ ID NO:96)  
 25 reverse PCR primer (44825.r2): 5'-CGCTGACCCAGGCTGAG-3' (SEQ ID NO:97)  
reverse PCR primer (44825.G1TR.r):  
 5'-GAAGGTCCCCGAGGCACAGTCGATACA-3' (SEQ ID NO:98)  
hybridization probe (44825.p1):  
 5'-GAGGAGTGCTGTTCGAGTGGGACTGCATGTGTGTCAGC-3' (SEQ ID NO:99)  
 30 hybridization probe (44825.G1TR.p):  
 5'-AGCCTGGGTCAGCGCCCCACGGGGTCCCGGTGCGGCC-3' (SEQ ID NO:100)

Clone DNA47365 (SEQ ID NO:91) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 121-123 and ending at the stop codon (TGA) at nucleotide positions 844-846 (Figure 35), as indicated by bolded underline. The predicted PRO364 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ319, SEQ ID NO:92) is 241 amino acids long (Figure 36). The UNQ319 (SEQ ID NO:92) protein shown in Figure 36 has an estimated molecular weight of about 26,000 daltons and a pI of about 6.34. A potential N-glycosylation sites exists between amino acids 146 and 149 of the amino acid sequence shown in Figure 36. A putative signal sequence is from amino acids 1 to 25 and a potential transmembrane domain exists between amino acids 162 to 180 of the sequence shown in Figure 36. A cDNA clone containing DNA47365



WO 00/53758

PCT/US00/05841

(designated DNA47365-1206) has been deposited with ATCC on November 7, 1997 and is assigned ATCC Deposit No. ATCC 209436.

S. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO356 (UNQ313)(NL4)

- 5 An expressed sequence tag (EST) DNA database (LIFESEQ<sup>®</sup>, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) was searched and an EST (#2939340) was identified which showed homology to human TIE-2 L1 and TIE-2 L2.

Based on the EST, a pair of PCR primers (forward and reverse), and a probe were synthesized:

- 10 NL4.5-1: 5'-TTCAGCACCAAGGACAAGGACAATGACAACT-3' (SEQ ID NO: 103)  
 NL4.3-1: 5'-TGTGCACACTTGTCCAAGCAGTTGTCATTGTC-3' (SEQ ID NO: 104)  
 NL4.3-3: 5'-GTAGTACACTCCATTGAGGTTGG-3' (SEQ ID NO: 105).

- Oligo dT primed cDNA libraries were prepared from uterus mRNA purchased from Clontech, Inc. (Palo Alto, CA, USA, catalog # 6537-1) in the vector pRK5D using reagents and protocols from Life Technologies, Gaithersburg, MD (Super Script Plasmid System). pRK5D is a cloning vector that has an sp6 transcription initiation site followed by an SfiI restriction enzyme site preceding the XhoI/NotI cDNA cloning sites. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to SalI hemikinased adaptors, cleaved with NotI, sized to greater than 1000 bp appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into XhoI/NotI-cleaved pRK5D.

- 20 In order to screen several libraries for a source of a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification with the PCR primer pair identified above. A positive library was then used to isolate clones encoding the PRO356 gene using the probe oligonucleotide and one of the PCR primers.

- DNA sequencing of the clones isolated as described above gave a full-length DNA sequence encoding the native sequence PRO356 (NL4) (*i.e.*, DNA47470, SEQ ID NO:101) and the derived PRO356 protein sequence UNQ313 (SEQ ID NO:102).

- 25 The entire nucleotide sequence of DNA47470 is shown in Figure 37 (SEQ ID NO:101). Clone DNA47470 (SEQ ID NO:101) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 215-217, and a TAA stop codon at nucleotide positions 1038-1040, as indicated by bolded underline. The predicted PRO356 polypeptide is 346 amino acids long (*i.e.*, UNQ313 (SEQ ID NO:102), has a calculated molecular weight of 40,018 daltons and a pI of 8.19. A cDNA clone containing DNA47470 (SEQ ID NO:101) has been deposited with ATCC on October 28, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209422.

T. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO531 (UNQ332)

- 35 Use of the ECD homology procedure identified above in a human fetal brain library resulted in the isolation of the full-length DNA sequence DNA48314 (Fig. 39, SEQ ID NO:106) and the derived PRO531 native sequence protein UNQ332 (Fig. 40, SEQ ID NO:107).

The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probe synthesized were:

- 40 forward PCR primer: 5'-CTGAGAACGCGCCTGAAACTGTG-3' (SEQ ID NO:108)  
reverse PCR primer: 5'-AGCGTTGTCATTGACATCGGCG-3' (SEQ ID NO:109)

WO 00/53758

PCT/US00/05841

hybridization probe:

(SEQ ID NO:110)

5'-TTAGTTGCTCCATTGAGGAGGATCTACCCCTCCTCTGAAATCCGCGGAA-3'

Clone DNA48314 (SEQ ID NO:106) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 171-173 and ending at the stop codon (TGA) at nucleotide positions 2565-2567 (Figure 39), as indicated by bolded underline. The predicted PRO531 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ332, SEQ ID NO:107) is 789 amino acids long. The UNQ332 protein (SEQ ID NO:107) shown in Figure 39 has an estimated molecular weight of about 87552 daltons and a pI of about 4.84. A clone containing DNA48314 (SEQ ID NO:106) has been deposited with the ATCC on 26 March 1998, and has been assigned deposit number 209702.

Analysis of the UNQ332 amino acid sequence of SEQ ID NO:107 reveals a cadherin extracellular repeated domain signature at about amino acids 122-132, 231-241, 336-346, 439-449 and 549-559. An ATP/GTP-binding site motif A (P-loop) is found at about amino acids 285-292 of SEQ ID NO:107. N-glycosylation sites are found at least at about amino acids 567-570, 786-790, 418-421 and 336-339, the signal peptide is at about amino acids 1-26, and the transmembrane domain is at about amino acids 685-712 of SEQ ID NO:107.

U. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO533 (UNQ334)

The EST sequence accession number AF007268, a murine fibroblast growth factor (FGF-15) was used to search various public EST databases (*e.g.*, GenBank, Dayhoff, *etc.*). The search was performed using the computer program BLAST or BLAST2 [Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)] as a comparison of the ECD protein sequences to a 6 frame translation of the EST sequences. The search resulted in the identification of GenBank EST AA220994, which has been identified as stratagene NT2 neuronal precursor 937230.

Based on this sequence, oligonucleotides were synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence. In order to screen several libraries for a source of a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification, as per Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, with the PCR primer pair. A positive library was then used to isolate clones encoding the PRO533 gene of interest by an *in vivo* cloning procedure using the probe oligonucleotide and one of the PCR primers.

RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from human fetal retina. The cDNA libraries used to isolated the cDNA clones were constructed by standard methods using commercially available reagents (*e.g.*, Invitrogen, San Diego, CA; Clontech, *etc.*) The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to SalI hemikinased adaptors, cleaved with NotI, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRKB or pRKD; pRKSB is a precursor of pRKSD that does not contain the SfiI site; Holmes *et al.*, *Science*, 253: 1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NotI sites.

A cDNA clone was sequenced in its entirety. The full length nucleotide sequence DNA49435 (SEQ ID NO:111) is shown in Figure 41. Clone DNA49435 (SEQ ID NO:111) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 464-466 and ending at the stop codon (TAA) at nucleotide positions 649-651, as indicated by bolded underline in Fig. 41. The predicted PRO533

WO 00/53758

PCT/US00/05841

polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ334, SEQ ID NO:112) is 216 amino acids long, has a calculated molecular weight of 24,003 daltons and a pI of 6.99. Clone DNA49435-1219 has been deposited with ATCC (under the designation DNA49435-1219) on November 21, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209480.

The oligonucleotide sequences used in the above procedure were the following:

- 5 FGF15.f: 5'-ATCCGCCAGATGGCTACAATGTGTA-3' (SEQ ID NO:113)  
 FGF15.p: 5'-GCCTCCCGGTCTCCCTGAGCAGTGCCAAACAGCGCAGTGTA-3' (SEQ ID NO:114)  
 FGF15.r: 5'-CCAGTCCGGTGACAAGCCCAA-3' (SEQ ID NO:115)

10

V. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1083 (UNQ540)

Use of the amylose yeast screen procedure described above on tissue isolated from human fetal kidney tissue resulted in an EST sequence which served as the template for the creation of the oligonucleotides below and screening as described above in a human fetal kidney library resulted in the isolation of the full length DNA sequence DNA50921 (Fig. 43, SEQ ID NO: 116) and the derived PRO1083 native sequence protein UNQ540 (SEQ ID NO:117).

The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probes synthesized for use in the above procedure were the following:

- forward primer: (43422.f1): 5'-GGCATTGGAGCAGTGTGGGTG-3' (SEQ ID NO:118)  
 20 forward primer: (43422.f2): 5'-AGAGCAACTCAGACAGCG-3' (SEQ ID NO:119)  
 reverse primer: (43422.r1): 5'-TGGAGGCCTAGATGCGGCTGGACG-3' (SEQ ID NO:120)  
 reverse primer: (43422.r2): 5'-CGAGGAGACATCAGCAC-3' (SEQ ID NO:121)  
 hybridization probe: (43422.p1): (SEQ ID NO:122)  
 5'-CCCAACATCCTGCTTCTGCAACCACTTGACCTACTTTGCAGTGC-3'

- 25 Clone DNA50921 (SEQ ID NO:116) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 154-156 and ending at the stop codon (TAG) at nucleotide positions 2233-2235 (Figure 43), as indicated by bolded underline. The predicted PRO1083 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ540, SEQ ID NO:117, Figure 44) is 693 amino acids long. The UNQ540 (SEQ ID NO:117) protein shown in Figure 44 has an estimated molecular weight of about 77738 and a pI of about  
 30 8.87. A clone containing DNA50921 has been deposited with the ATCC on May 12, 1998 and has been assigned deposit number 209859.

- Analysis of the amino acid sequence UNQ540 (SEQ ID NO:117) reveals the putative signal peptide is at about amino acids 1-25, transmembrane domains are at about amino acids 382-398, 402-420, 445-468, 473-491, 519-537, 568-590 and 634-657, a microbodies C-terminal targeting signal at about amino acids 691-693, cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites at about amino acids 198-201 and 370-373, N-glycosylation sites at about amino acids 39-42, 148-151, 171-174, 234-237, 303-306, 324-227 and 341-344 and a G-protein coupled receptor family domain at about amino acids 475-504.

W. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO865 (UNQ434)

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Use of the amylase yeast screen procedure described above on tissue isolated from human fetal kidney tissue resulted in an EST sequence which served as the template for the creation of the oligonucleotides below and screening as described above in a human fetal kidney library resulted in the isolation of the full length DNA sequence DNA53974 (Fig. 45, SEQ ID NO:123) and the derived PRO865 native sequence protein UNQ434 (SEQ ID NO:124).

The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probes synthesized for use in the above procedure were the following:

forward primer: (48615.f1): 5'-AAGCTGCCGGAGCTGCAATG-3' (SEQ ID NO:125)

forward primer: (48615.f2): 5'-TTGCTTCTTAATCCTGAGCGC-3' (SEQ ID NO:126)

10 forward primer: (48615.f3): 5'-AAAGGAGGACTTTCGACTGC-3' (SEQ ID NO:127)

reverse primer: (48615.r1): 5'-AGAGATTTCATCCACTGCTCCAAGTCG-3' (SEQ ID NO:128)

reverse primer: (48615.r2): 5'-TGTCAGAAACAGGCACATATCAGC-3' (SEQ ID NO:129)

hybridization probe: (43422.p1): (SEQ ID NO:130)

5'-AGACAGCGGCACAGAGGTGCTTCTGCCAGGTTAGTGTTACTTGGATGAT-3'

15 Clone DNA53974 (SEQ ID NO:123) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 173-175 and ending at the stop codon (TAA) at nucleotide positions 1577-1579 (Figure 45), as indicated by bolded underline. The predicted PRO865 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ865, SEQ ID NO:124) is 468 amino acids long. The UNQ434 (SEQ ID NO:124) protein shown in Figure 46 has an estimated molecular weight of about 54,393 and a pI of about 5.63. A clone containing DNA53974 (SEQ ID NO:123) has been deposited with the ATCC on April 14, 1998 and has been assigned deposit number 209774.

20 Analysis of the amino acid sequence UNQ434 (SEQ ID NO:124) reveals the putative signal peptide at about amino acid residues 1-23, potential N-glycosylation sites at about amino acids residue 280 and at about 384, a potential amidation site from about amino acid residue 94 to about residue 97, glycosaminoglycan attachment sites from about amino acid residue 20 to about 23 and from about residue 223 to about residue 226, an aminotransferase class-V pyridoxyl-phosphate amino acid sequence block from about amino acid residue 216 to about residue 222 and an amino acid sequence block similar to that found in the interleukin-7 protein from about amino acid residue 338 to about residue 343.

#### 30 X. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO770 (UNQ408)

A public expressed sequence tag (EST) DNA database (Merck/Washington University) was searched with the full-length murine m-FIZZ1 DNA (DNA53517), and an EST, designated AA524300 was identified, which showed homology with the m-FIZZ1 DNA.

35 The full-length clone corresponding to the EST AA524300 was purchased from Incyte (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) and sequenced in entirety.

The entire nucleotide sequence of the resulting PRO770-encoding full-length clone is shown in Figure 47. This full-length clone, designated DNA54228 (SEQ ID NO:133), contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 100-102 (Fig.47; SEQ ID NO:133) and ending at the stop codon (TGA) at residues 433-435, as indicated by bolded underline. The predicted PRO770 polypeptide precursor (including a putative signal sequence of 20 amino acids) (*i.e.*, UNQ408, SEQ ID

WO 00/53758

PCT/US00/05841

NO:134) is 111 amino acids long, has a calculated molecular weight of 11,730 daltons and a pI of 7.82. Based upon its homology to m-FIZZ1 (50%, using the ALIGN software), the protein is believed to be the human homolog of m-FIZZ1, and has been designated h-FIZZ1. A cDNA clone containing DNA54228 (SEQ ID NO:133) has been deposited with ATCC and is assigned ATCC deposit no. 209801.

5 Identification and cloning of m-FIZZ1 (DNA53517)

*Mouse asthma model* Female Balb/C mice, 6 to 8 weeks of age, were separated into two experimental groups: controls and asthmatics. The asthmatic group was immunized intraperitoneally with 10 µg ovalbumin + 1 mg alum, while the control group was not. Two weeks later, mice were exposed daily to an aerosol of 10 mg/ml ovalbumin in PBS aerosolized with a UltraNeb nebulizer (DeVilbiss) at the rate of 2 ml/min for 30 min each day, for 7 consecutive days. One day after the last aerosol challenge, whole blood, serum and bronchoalveolar lavage (BAL) samples were collected and the lungs were harvested and preserved for histological examination, immuno-histochemistry and *in situ* hybridization.

*Gel electrophoresis of BAL samples* Examination of the BAL samples by gel electrophoresis on a 16% Tricine gel shows that a low molecular weight protein is expressed in the BAL samples from asthmatic mice but not in the BAL samples from control mice. This low molecular weight protein was termed m-FIZZ1 and was seen to co-migrate with a 8300 Dalton marker protein.

*Partial protein sequence* The protein of interest was transferred upon a PVDF membrane and sequenced by Edman degradation. This sequence served as a template for the preparation of various cloning oligos as described below.

20 *Partial cDNA sequence* We designed two degenerate oligonucleotide PCR primers corresponding to the putative DNA sequence for the first 7 and the last 7 amino acids of the partial protein sequence..

Oligo #1:

5'-ACA AAC GCG TGA YGA RAC NAT HGA RAT-3'

(SEQ ID NO:135)

Oligo # 2:

25 5'-TGG TGC ATG CCG RTA RIT NGC NGG RTT-3'

(SEQ ID NO:136)

cDNA prepared from the lungs of normal mice was used as a template for the PCR reaction which yielded an 88 bp product. This 88 bp product contained 54 known base pairs, encoding the PCR primers, and 34 novel base pairs, and encoded another partial mFIZZ-1 sequence.

30 *Full length cDNA clone* This second partial sequence was used to design primers which were ultimately successful in obtaining the full length FIZZ clone (DNA53517) by RT-PCR of mouse lung poly(A)<sup>+</sup> RNA.

Oligo #3:

5'-ACA AAC GCG TGC TGG AGA ATA AGG TCA AGG-3'

(SEQ ID NO:137)

This oligo was used as an RT-PCR primer in combination with 5' and 3' amplimers from Clontech.

35 Oligo #4:

5'-ACT AAC GCG TAG GCT AAG GAA CTT CTT GCC-3'

(SEQ ID NO: 138)

This oligo was used as an RT-PCR primer in combination with oligo d(T).

Y. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO769 (UNQ407)

WO 00/53758

PCT/US00/05841

A public expressed sequence tag (EST) DNA databases (Merck/Washington University) was searched with the full-length murine m-FIZZ1 DNA (DNA 53517) described above and the EST W42069 was identified.

The full-length clones corresponding to the EST fragment W42069 was obtained from Incyte Pharmaceuticals (Palo Alto, California), and sequenced in the entirety, which ultimately resulted in the identification of the full length nucleotide sequence DNA54231 (SEQ ID NO:139).

The nucleotide sequence corresponding to the full length, native sequence PRO769 clone is shown in Figure 49. This clone, designated DNA 54231 (SEQ ID NO:139) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 75-77 and ending at the stop codon (TGA) at residues 417-419, as indicated by bolded underline (Fig. 49). The predicted PRO769 polypeptide precursor (including a signal sequence of 10 amino acids)(i.e., UNQ407, SEQ ID NO:140) is 114 amino acids long, has a calculated molecular weight of 12,492 daltons and a pI of 8.19. Based on its homology to m-FIZZ1 (34%, using the ALIGN software) the protein was designated m-FIZZ3. A clone containing DNA54231 (designated DNA54231-1366) has been deposited with ATCC on April 23, 1998 and has been assigned ATCC deposit no. 209802.

#### Z. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO788 (UNQ430)

Use of the ECD homology procedure identified above resulted in the identification of the partial length EST sequence 2777282. Further analysis of the corresponding full-length sequence resulted in the identification of DNA56405 (SEQ ID NO:141) and the derived native sequence PRO788 protein UNQ430 (SEQ ID NO:142).

Clone DNA56405 (SEQ ID NO:141) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 84-86 and ending at the stop codon (TAG) at nucleotide positions 459-461 (Figure 51), as indicated by bolded underline. The predicted native sequence PRO788 polypeptide precursor (i.e., UNQ430, SEQ ID NO:142) is 125 amino acids long (Figure 52), has a calculated molecular weight of 13,115 daltons and a pI of 5.90. The UNQ430 (SEQ ID NO:142) protein shown in Figure 52 has an estimated molecular weight of about 13115 and a pI of about 5.90. A clone containing DNA56405 (SEQ ID NO:142) has been deposited with the ATCC on May 6, 1998 and has been assigned deposit number 209849. In the event of a discrepancy in the nucleotide sequence of the deposit and the sequences disclosed herein, it is understood that the deposited clone contains the correct sequence. It is further understood that the methodology of sequencing for the sequences provided herein are based on known sequencing techniques.

Analysis of UNQ430 (SEQ ID NO:52) shown in Figure 52 reveals a signal peptide at about amino acids 1-17 and an N-glycosylation site is at about amino acids 46.

#### AA. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1114 (UNQ557)

Use of the amylase yeast screen procedure described above on tissue isolated from human fetal kidney tissue resulted in an EST sequence which served as the template for the creation of the oligonucleotides below and screening as described above in a human breast carcinoma library resulted in the

WO 00/53758

PCT/US00/05841

isolation of the full length DNA sequence DNA57033 (Fig. 53, SEQ ID NO:143) and the derived PRO1114 native sequence protein UNQ557 (Fig. 54, SEQ ID NO:144).

The PCR primers used in the isolation screen described in the previous paragraph were:

forward primer: (48466.f1): 5'-AGGCTTCGCTGCGACTAGACCTC-3' (SEQ ID NO:145)  
 reverse primer: (48466.r1): 5'-CCAGGTCCGGTAAGGATGGTTGAG-3' (SEQ ID NO:146)  
 hybridization probe: 48466.p1):  
 5'-TTTCTACGCATTGATTCCATGTTTGCTCAGATGAAGTGGCCATTCTGC-3' (SEQ ID NO:147)

Clone DNA57033 (SEQ ID NO:143) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 250-252 and ending at the stop codon (TAG) found at nucleotide positions 1183-1185 (Figure 53, SEQ ID NO:143), as indicated by bolded underline. The predicted PRO1114 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ557, SEQ ID NO:144) is 311 amino acids long, has a calculated molecular weight of approximately 35,076 daltons and an estimated pI of approximately 5.04. Analysis of the full-length PRO1114 sequence shown in Figure 54 (SEQ ID NO:144) evidences the presence of the following:  
 a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 29, a transmembrane domain from about amino acid 230 to about amino acid 255, potential N-glycosylation sites from about amino acid 40 to about amino acid 43 and from about amino acid 134 to about amino acid 137, an amino acid sequence block having homology to tissue factor proteins from about amino acid 92 to about amino acid 119 and an amino acid sequence block having homology to integrin alpha chain proteins from about amino acid 232 to about amino acid 262. A cDNA clone containing DNA57033 (SEQ ID NO:143) has been deposited with ATCC on May 27, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 209905.

#### AB. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1007 (UNQ491)

Use of the ECD homology procedure described above resulted in the identification of an EST sequence designated Merck EST T70513, which was derived from human liver tissue (clone 83012 from library 341) was further examined. The corresponding full-length clone was further examined and sequenced, resulting in the isolation of the full-length DNA sequence DNA57690 (Fig. 55, SEQ ID NO:145) and the derived PRO1007 native sequence protein UNQ491 (Fig. 56, SEQ ID NO:146).

Clone DNA57690 (SEQ ID NO:145) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 16-18 and ending at the stop codon (TGA) at nucleotide positions 1054-1056 (Figure 55), as indicated by bolded underline. The predicted PRO1007 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ491, SEQ ID NO:146) is 346 amino acids long (Figure 56), has a calculated molecular weight of 35,971 daltons and a pI of 8.17. The UNQ491 (SEQ ID NO:146) protein shown in Figure 56 has an estimated molecular weight of about 35971 daltons and a pI of about 8.17. A cDNA clone containing DNA57690 (SEQ ID NO:145) has been deposited with the ATCC on 9 June 1998, and has been assigned deposit number 209950.

Analysis of the amino acid sequence of UNQ491 (SEQ ID NO:146) reveals the putative signal peptide at about amino acid residues 1-30, a transmembrane domain at about amino acid residues 325-346, N-glycosylation sites at about amino acid residues 118, 129, 163, 176, 183 and 227 and a Ly-6/u-Par domain proteins at about amino acid residues 17-36 and 209-222. The corresponding nucleotides of the amino acids presented herein can be routinely determined given the sequences provided herein.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

AC. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1184 (UNQ598)

Use of the signal algorithm procedure described above resulted in the identification of Incyte EST 1428374 which was derived from an ileum tissue library (39, SINTBST01). Further examination of the full-length clone corresponding to this sequence resulted in the isolation of the full-length DNA59220 (Fig. 57, SEQ ID NO:147) and the derived PRO1184 native sequence protein UNQ598 (Fig. 58, SEQ ID NO:148).

UNQ598 (SEQ ID NO:148), as shown in Figure 58 exhibits an apparent translation initiation site at nucleotide positions 106-108 and ending at the stop codon (TGA) found at nucleotide positions 532-534, as indicated by bolded underline. The predicted PRO1184 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ598, SEQ ID NO:148) is 142 amino acids long, has a calculated molecular weight of approximately 15690 daltons and an estimated pI of approximately 9.64. Analysis of UNQ598 (SEQ ID NO:148) evidences the presence of a signal peptide at about amino acids 1-38. A cDNA clone containing DNA59220 (SEQ ID NO:147) has been deposited with the ATCC on 9 June 1998, and has been assigned deposit number 209962. It is understood that the deposited clone has the actual sequences and that representations are presented herein.

AD. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1031 (UNQ516)

Use of the ECD homology procedure described above resulted in the identification of the EST sequence Merck W74558 (clone 344649). The corresponding full-length clone was examined and sequenced resulting in the isolation of DNA sequencing gave the full-length DNA sequence DNA59294 (Fig. 59, SEQ ID NO:149) and the derived PRO1031 native sequence protein UNQ516 (Fig. 60, SEQ ID NO:150).

Clone DNA59294 (SEQ ID NO:149) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 42-44 and ending at the stop codon (TGA) at nucleotide positions 582-584 (Figure 59), as indicated by bolded underline. The predicted PRO1031 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ516, SEQ ID NO:150) is 180 amino acids long (Figure 60). The UNQ516 protein shown in Figure 60 has an estimated molecular weight of about 20437 and a pI of about 9.58. Clone DNA59294 (SEQ ID NO:149) has been deposited with the ATCC on May 14, 1998 and has been assigned deposit number 209866. Regarding the sequence, it is understood that the deposited clone contains the correct sequence, and the sequences provided herein are based on known sequencing techniques.

Analysis of the amino acid sequence of UNQ516 (SEQ ID NO:150) reveals the putative signal peptide at about amino acid residues 1-20, an N-glycosylation site is at about amino acid residue 75. A region having sequence identity with IL-17 is at about amino acid residues 96-180. The corresponding nucleotides can be routinely determined given the sequences provided herein.

AE. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1346 (UNQ701)

Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal kidney library resulted in the isolation of the full-length DNA sequence DNA59776 (Fig. 61, SEQ ID NO:151) and the derived PRO1346 native sequence protein UNQ701 (Fig. 62, SEQ ID NO:152).

The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probe used in the isolation of DNA59776 (SEQ ID NO:151) were the following:

40 forward PCR primer (45668.f1): 5'-CACACGTCCAACCTCAATGGGCAG-3' (SEQ ID NO:153)



WO 00/53758

PCT/US00/05841

reverse PCR primer (45668.r1): 5'-GACCAGCAGGGCCAAGGACAAGG-3' (SEQ ID NO:154)

hybridization probe (45668.p1): (SEQ ID NO:155)

5'-GTTCTCTGAGATGAAGATCCGGCCGGTCCGGGAGTACCGCTTAG-3'

Clone DNA59776 (SEQ ID NO:151) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 1-3 (ATG), and an apparent stop codon (TAG) at nucleotide positions 1384-1386 (TAG). The predicted PRO1346 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ701, SEQ ID NO:152) is 461 amino acids long. The protein contains an apparent type II transmembrane domain at amino acid positions from about 31 to about 50, fibrinogen beta and gamma chains C-terminal domain signature at about amino acid positions 409-421 and a leucine zipper patterns at about amino acid positions 140-161, 147-168, 154-175 and 161-182.

A cDNA clone containing DNA59776, designated as DNA59776-1600, has been deposited with ATCC on August 18, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203128. The UNQ701 (SEQ ID NO:152) protein shown in Figure 62 has an estimated molecular weight of about 50744 daltons and a pI of about 6.38.

15 AF. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1155 (UNQ585)

Use of the signal algorithm procedure described above resulted in the identification of Incyte EST 2858870 which was derived from an ileum tissue library (39, SININOT03). Further examination of the full-length clone corresponding to this sequence resulted in the isolation of the full-length DNA sequence DNA59849 (Fig. 63, SEQ ID NO:156) and the derived PRO1155 native sequence protein UNQ585 (Fig. 64, SEQ ID NO:157).

The UNQ585 (SEQ ID NO:157) polypeptide shown in Figure 64 contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 158-160 and ending at the stop codon (TAA) found at nucleotide positions 563-565, as indicated by bolded underline. The predicted PRO1155 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ585, SEQ ID NO:157) is 135 amino acids long, and signal peptide appears at about amino acids residues 1 to about 18, a leucine zipper pattern appears at about amino acid residues 43 to 64 and a tachykinin family signature appears at about amino acid residues 86 to about 91. UNQ585 (SEQ ID NO:157) has a calculated molecular weight of approximately 14833 daltons and an estimated pI of approximately 9.78. A cDNA clone containing DNA59849 (SEQ ID NO:156), designated as DNA59849-1504, has been deposited with ATCC on June 16, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 209986.

30 AG. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1250 (UNQ633)

Use of the signal algorithm procedure described above resulted in the identification of an EST cluster sequence from the Incyte database, designated Incyte EST cluster sequence no. 56523. This sequence was then compared to a variety of various EST databases as described under the signal algorithm procedure above, and further resulted in the identification of Incyte EST 3371784. Further examination and sequencing of the full-length clone corresponding to this EST sequence resulted in the isolation of the full-length DNA sequence DNA60775 (Fig. 65, SEQ ID NO:158) and the derived PRO1250 native sequence protein UNQ633 (Fig. 66, SEQ ID NO:159).

40 Clone DNA60775 (SEQ ID NO:158) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 74-76 and ending at the stop codon (TAG) at nucleotide

WO 00/53758

PCT/US00/05841

positions 2291-2293 (Figure 65). The predicted PRO1250 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ633, SEQ ID NO:159) is 739 amino acids long (Figure 66). The UNQ633 (SEQ ID NO:159) protein shown in Figure 66 has an estimated molecular weight of about 82,263 daltons and a pI of about 7.55. Analysis of UNQ633 (SEQ ID NO:159) evidences the presence of the following: a type II transmembrane domain from about amino acid residues 61 to about 80, a putative AMP-binding domain signature sequence from about amino acid residue 314 to about 325, and potential N-glycosylation sites from about amino acid residues 102 to about 105, from about amino acid residues 588 to about 591 and from about amino acid residues 619 to about 622. A cDNA clone containing DNA60775 (SEQ ID NO:158) has been deposited with the ATCC on September 1, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203173.

#### AH. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1312 (UNQ678)

An EST (DNA55773) was identified in a human fetal kidney cDNA library using a yeast screen, that preferentially represents the 5' ends of the primary cDNA clones. Based on the DNA55773 sequence, oligonucleotides were synthesized for use as probes to isolate the full-length DNA sequence DNA61873 (Fig. 67, SEQ ID NO:160) and the derived PRO1312 native sequence UNQ678 (SEQ ID NO:161).

The full length DNA61873 clone shown in Figures 67 (SEQ ID NO:160) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at about nucleotide positions 7-9 and ending at the stop codon (TGA) found at about nucleotide positions 643-645, as indicated by bolded underline. The predicted PRO1312 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ678, SEQ ID NO:161) is 212 amino acids long. UNQ678 (SEQ ID NO:161) has a calculated molecular weight of approximately 24,024 daltons and an estimated pI of approximately 6.26. Other features include a signal peptide at about amino acids 1-14; a transmembrane domain at about amino acids 141-160, and potential N-glycosylation sites at about amino acids 76-79 and 93-96. A clone containing DNA61873 (SEQ ID NO:160) has been deposited with the ATCC on August 18, 1998, under the designation DNA61873-1312, and has been assigned deposit number 203132.

#### AI. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1192 (UNQ606)

Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal liver library resulted in the isolation of the full-length DNA sequence DNA62814 (Fig. 69, SEQ ID NO:162) and the derived PRO1192 native sequence protein UNQ606 (Fig. 70, SEQ ID NO:163).

The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probe used in the isolation of DNA62814 (SEQ ID NO:162) were the following:

forward PCR primer (35924.f1): 5'-CCGAGGCCATCTAGAGGCCAGAGC-3' (SEQ ID NO:164)

reverse PCR primer (35924.r1): 5'-ACAGGCAGAGCCAATGGCCAGAGC-3' (SEQ ID NO:165).

hybridization probe (35924.p1): 5'-GAGAGGACTGCGGGAGTTTGGGACCTTTGTGCAGACGTGCTCATG-3' (SEQ ID NO:166).

Clone DNA62814 (Fig. 69, SEQ ID NO:162) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 121-123, and an apparent stop codon (TAA) at nucleotide positions 766-768, as indicated by bolded underline. The predicted PRO1192 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ606, SEQ ID NO:163) is 215 amino acids long. The UNQ606 (SEQ ID NO:163) polypeptide precursor shown in Figure 70 has a signal peptide at about amino acids 1-21; a transmembrane domain at about amino

WO 00/53758

PCT/US00/05841

acids 153-176; potential N-glycosylation sites at about amino acids 39-42 and 118-121; and homology with myelin P0 proteins at about amino acids 27-68 and 99-128. The UNQ606 (SEQ ID NO:163) shown in Figure 70 has an estimated molecular weight of about 24,484 Daltons and a pI of about 6.98.

A cDNA clone containing DNA62814 (SEQ ID NO:162), designated as DNA62814-1521, was deposited with the ATCC on August 4, 1998, and is assigned ATCC deposit no. 203093.

#### AJ. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1246 (UNQ630)

Use of the signal algorithm procedure described above resulted in the identification of an EST cluster sequence from the Incyte database, designated Incyte EST cluster sequence no. 56853. This sequence was then compared to a variety of various EST databases as described under the signal algorithm procedure above, and further resulted in the identification of Incyte EST 2481345. Further examination and sequencing of the full-length clone corresponding to this EST sequence resulted in the isolation of the full-length DNA sequence DNA64885 (Fig. 71, SEQ ID NO:167) and the derived PRO1246 native sequence protein UNQ630 (Fig. 72, SEQ ID NO:168).

Clone DNA64885 (SEQ ID NO:167) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 119-121 and ending at the stop codon (TGA) at nucleotide positions 1727-1729 (Figure 71), as indicated by bolded underline. The predicted PRO1246 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ630, SEQ ID NO:168) is 536 amino acids long (Figure 72), has an estimated molecular weight of about 61,450 daltons and a pI of about 9.17. Analysis of UNQ630 (Fig. 72, SEQ ID NO:168) reveals the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 15, potential N-glycosylation sites from about amino acid 108 to about amino acid 111, from about amino acid 166 to about amino acid 169, from about amino acid 193 to about amino acid 196, from about amino acid 262 to about amino acid 265, from about amino acid 375 to about amino acid 378, from about amino acid 413 to about amino acid 416 and from about amino acid 498 to about amino acid 501 and amino acid sequence blocks having homology to sulfatase proteins from about amino acid 286 to about amino acid 315, from about amino acid 359 to about amino acid 369 and from about amino acid 78 to about amino acid 97. A cDNA containing DNA64885 (SEQ ID NO:167), designated DNA64885-1529, has been deposited with ATCC on November 3, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203457.

#### AK. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1283 (UNQ653)

Use of the ECD homology procedure described above in a human breast tumor tissue library resulted in the isolation of the full-length DNA sequence DNA65404 (Fig. 73, SEQ ID NO:169) and the derived PRO1283 native sequence protein UNQ653 (Fig. 74, SEQ ID NO:170).

The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probes used in the isolation of DNA65404 (SEQ ID NO:169) were the following:

forward PCR primer (28753.f1): 5'-GGAGATGAAGACCCCTGTTCTCTG-3' (SEQ ID NO:171)  
 forward PCR primer (28753.f11): 5'-GGAGATGAAGACCCCTGTTCTCTGGGTG-3' (SEQ ID NO:172)  
 reverse PCR primer (28753.r1): 5'-GTCCTCCGAAAGTCCTTATC-3' (SEQ ID NO:173)  
 reverse PCR primer (28753.r11): 5'-GCCTAGTGTTCGGGAACGCAGCTTC-3' (SEQ ID NO:174)  
 hybridization probe (28753.p1): (SEQ ID NO:175)

WO 00/53758

PCT/US00/05841

5'-CAGGGACCTGGTACGTGAAGGCCATGGTGGTCGATAAGGACTTCCGGAG-3'

hybridization probe (28753.p11);

(SEQ ID NO:176)

5'-CTGTCCTTCACCCCTGGAGGAGGAGGATATCACAGGACCTGGTAC-3'

Clone DNA65404 (SEQ ID NO:169) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 45-47 and ending at the stop codon (TAG) at nucleotide positions 555-557 (Figure 73), as indicated by bolded underline. The predicted PRO1283 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ653, SEQ ID NO:170) is 170 amino acids long (Figure 74). The UNQ653 (SEQ ID NO:170) protein shown in Figure 74 has an estimated molecular weight of about 19,457 daltons and a pI of about 9.10. Analysis of the UNQ653 (SEQ ID NO:170) evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 17. A cDNA clone containing DNA65404 (SEQ ID NO:169), designated DNA65404-1551, has been deposited with ATCC on September 9, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203244.

#### AL. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1195 (UNQ608)

Use of the signal algorithm procedure described above resulted in the identification of an EST cluster sequence 32204 from the Incyte database. This sequence was then compared to a variety of various EST databases as described under the signal algorithm procedure above, and further resulted in the identification of Incyte EST352980. Further examination and sequencing of the full-length clone corresponding to this EST sequence resulted in the isolation of the full-length DNA sequence DNA65412 (Fig. 75, SEQ ID NO:177) and the derived PRO1195 native sequence protein UNQ608 (Fig. 76, SEQ ID NO:178).

The full length clone DNA65412 (SEQ ID NO:177) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 58-60 and ending at the stop codon (TAG) found at nucleotide positions 511-513 (Figure 75), as indicate by bolded underline. The predicted PRO1195 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ608, Figure 76, SEQ ID NO:178) is 151 amino acids long, has a calculated molecular weight of 17,227 daltons and a pI of 5.33. Analysis of UNQ608 (SEQ ID NO:178) reveals a signal sequence at about amino acids 1-22, a calculated molecular weight of approximately 17277 daltons and an estimated pI of approximately 5.33. A cDNA clone containing DNA65412 (SEQ ID NO:177), designated as DNA65412-1523, was deposited with the ATCC on August 4, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203094.

#### AM. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1343 (UNQ698)

Use of the amylase yeast screen procedure described above on tissue isolated from human smooth muscle cell tissue resulted in an EST sequence which served as the template for the creation of the oligonucleotides below and screening as described above in a human smooth muscle cell tissue library resulted in the isolation of the full length DNA sequence DNA66675 (Fig. 77, SEQ ID NO:179) and the derived PRO1343 native sequence protein UNQ698 (Fig. 78, SEQ ID NO:180).

The oligonucleotide probes employed were as follows:

forward PCR primer (48921.f1) 5'-CAATATGCATCTTGCACGTCTGG-3' (SEQ ID NO:181)

reverse PCR primer (48921.r1) 5'-AAGCTTCTCTGCTTCCTTCCTGC-3' (SEQ ID NO:182)

hybridization probe (48921.p1)

5'-TGACCCCATGAGAAGGTCATTGAAGGATCAACCGAGGGCTG-3' (SEQ ID NO:183)

WO 00/53758

PCT/US00/05841

The full length clone DNA66675 (SEQ ID NO:179) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 71-73, and a stop signal (TAA) at nucleotide positions 812-814 (Figure 77), as indicated by bolded underline. The predicted PRO1343 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ698, SEQ ID NO:180, Fig. 78) is 247 amino acids long, has a calculated molecular weight of approximately 25,335 daltons and an estimated pI of approximately 7.0. Analysis of the UNQ698 sequence shown in Figure 78 (SEQ ID NO:180) evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 25 and a homologous region to circumsporozoite repeats from about amino acid 35 to about amino acid 225. A cDNA clone containing DNA66675 (SEQ ID NO:179), designated DNA66675-1587, has been deposited with ATCC on September 22, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203282.

Alternatively, a comparison of the yeast EST sequence isolated from the amylase screen above was screened against various EST databases, both public and private (*e.g.*, see ECD homology procedure, above) resulting in the identification of Incyte EST clone no. 4701148. Further analysis and sequencing of the corresponding full-length clone resulted in isolation of the DNA66675 sequence (SEQ ID NO:179) shown in Figure 77.

#### AN. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1418 (UNQ732)

Use of the signal algorithm procedure described above resulted in the identification of an EST cluster sequence 10698 (Incyte cluster 121480). This sequence was then compared to a variety of various EST databases (including those derived from a placenta tissue library) as described under the signal algorithm procedure above, and further resulted in the identification of Incyte EST1306026. Further examination and sequencing of the full-length clone corresponding to this EST sequence resulted in the isolation of the full-length DNA sequence DNA68864 (Fig. 79, SEQ ID NO:184) and the derived PRO1418 native sequence protein UNQ732 (Fig. 80, SEQ ID NO:185).

The full length clone shown in Figure 79 (DNA68864, SEQ ID NO:184) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 138-140 and ending at the stop codon (TAA) found at nucleotide positions 1188-1190, as indicated by bolded underline. The predicted PRO1418 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ732, SEQ ID NO:185) is 350 amino acids long with a signal peptide at about amino acids 1-19, a calculated molecular weight of approximately 39003 daltons and an estimated pI of approximately 5.59. A cDNA clone containing DNA68864 (SEQ ID NO:184), designated as DNA68864-1629 was deposited with the ATCC on September 22, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203276.

#### AO. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1387 (UNQ722)

Use of the signal algorithm procedure described above resulted in the identification of an EST cluster sequence 10298. This sequence was then compared to a variety of various EST databases as described under the signal algorithm procedure above, and further resulted in the identification of Incyte EST3507924. Further examination and sequencing of the full-length clone corresponding to this EST sequence resulted in the isolation of the full-length DNA sequence DNA68872 (Fig. 81, SEQ ID NO:186) and the derived PRO1387 native sequence protein UNQ722 (Fig. 82, SEQ ID NO:187).

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Clone DNA68872 (SEQ ID NO:186) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 76-78 and ending at the stop codon (TGA) at nucleotide positions 1258-1260 (Figure 81), as indicated by bolded underline. The predicted PRO1387 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ722, SEQ ID NO:187) is 394 amino acids long. The UNQ722 (SEQ ID NO:187) protein shown in Figure 82 has an estimated molecular weight of about 44,339 daltons and a pI of about 7.10. UNQ722 (SEQ ID NO:187) further contains a signal peptide from about amino acid residues 1 to about residue 19, a transmembrane domain from about residue 275 to about residue 296, potential N-glycosylation sites at about residues 76, 231, 302, 307 and 376 and amino acid sequence blocks having homology to myelin p0 protein from about amino acid residue 210 to about residue 239 and from about amino acid residue 92 to about residue 121. A cDNA clone containing DNA68872, designated as DNA68872-1620, has been deposited with the ATCC on August 25, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203160.

AP. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1410 (UNQ728)

Use of the signal algorithm procedure described above resulted in the identification of an EST cluster sequence 98502. This sequence was then compared to a variety of various EST databases as described under the signal algorithm procedure above, and further resulted in the identification of Incyte EST1257046. Further examination and sequencing of the full-length clone corresponding to this EST sequence resulted in the isolation of the full-length DNA sequence DNA68874 (Fig. 83, SEQ ID NO:188) and the derived PRO1387 native sequence protein UNQ728 (Fig. 84, SEQ ID NO:189).

Clone DNA68874 (SEQ ID NO:188) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 152-154 and ending at the stop codon (TGA) at nucleotide positions 866-868 (Figure 83), as indicated by bolded underline. The predicted PRO1410 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ728, SEQ ID NO:189) is 238 amino acids long (Figure 84). The UNQ728 protein (SEQ ID NO:189) shown in Figure 84 has an estimated molecular weight of about 25,262 daltons and a pI of about 6.44, a signal peptide from about amino acid residue 1 to about residue 20, a transmembrane domain from about amino acid residue 194 to about residue 220 and a potential N-glycosylation site at about amino acid residue 132. A clone containing DNA68874 (SEQ ID NO:188) has been deposited with ATCC on September 22, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203277.

AQ. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1917 (UNQ900)

Use of the signal algorithm procedure described above resulted in the identification of an EST cluster sequence 85496. This sequence was then compared to a variety of various EST databases as described under the signal algorithm procedure above, and further resulted in the identification of Incyte EST3255033. This EST was derived from an ovarian tumor library. Further examination and sequencing of the full-length clone corresponding to this EST sequence resulted in the isolation of the full-length DNA sequence DNA76400 (Fig. 85, SEQ ID NO:190) and the derived PRO1917 native sequence protein UNQ900 (Fig. 86, SEQ ID NO:191).

The full length clone DNA76400 (SEQ ID NO:190) shown in Figure 85 contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 6 to 9 and ending at the stop codon (TGA) found at nucleotide positions 1467 to 1469 as indicated by bolded underline. The predicted PRO1917 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ900, SEQ ID NO:191) is 487 amino acids long. UNQ900 (SEQ ID

WO 00/53758

PCT/US00/05841

NO:191) has a calculated molecular weight of approximately 55,051 daltons and an estimated pI of approximately 8.14. Additional features include: a signal peptide at about amino acid residues 1-30; potential N-glycosylation sites at about amino acid residues 242 and 481; protein kinase C phosphorylation sites at about amino acid residues 95-97, 182-184, and 427-429; N-myristoylation sites at about amino acid residues 107-112, 113-118, 117-122, 118-123, and 128-133; and an endoplasmic reticulum targeting sequence at about amino acid residues 484-487.

AR. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1868 (UNQ859)

Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal liver library resulted in the identification of EST clone no. 2994689. Further analysis and sequencing of the corresponding full-length clone resulted in the isolation of DNA77624 (Fig. 87, SEQ ID NO:192) and the derived PRO1868 native sequence protein UNQ859 (Fig. 88, SEQ ID NO:193).

Clone DNA77624 (Fig. 88, SEQ ID NO:193) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 51-53 and ending at the stop codon (TGA) at nucleotide positions 981-983, as indicated by bolded underline. The predicted PRO1868 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ859, SEQ ID NO:193, Fig. 89) is 310 amino acids long. The UNQ859 (SEQ ID NO:193) protein shown in Figure 89 has an estimated molecular weight of about 35,020 daltons and a pI of about 7.90, a transmembrane domain from about amino acid residue 243 to about residue 263, potential N-glycosylation sites at about amino acid residues 104 and 192, a cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site from about amino acid residues 107 to about residue 110, casein kinase II phosphorylation sites from about amino acid residues 106 to about residue 109 and from about amino acid residue 296 to about residue 299, a tyrosine kinase phosphorylation site from about amino acid residue 69 to about residue 77 and potential N-myristoylation sites from about amino acid residue 26 to about residue 31, from about residue 215 to about residue 220, from about residue 226 to about residue 231, from about residue 243 to about residue 248, from about residue 244 to about residue 249 and from about residue 262 to about residue 267. A cDNA clone containing DNA77624 (SEQ ID NO:193) has been deposited with ATCC on December 22, 1998 and is assigned ATCC deposit no 203553.

AS. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO205 (UNQ179)

Use of the ECD procedure above resulted in the identification of an EST sequence derived from a human retinal library. Additional effort to identify the full length clone using an *in vitro* cloning procedure were unable to identify another PRO205 encoding DNA sequence.

DNA sequence encoding other polypeptide of substantial homology to the UNQ179 (SEQ ID NO:229) polypeptide of Figure 90 may be found as GenBank submissions AB033089\_1 and HSM802147\_1.

Clone DNA30868 (SEQ ID NO:89) contains what is believed to be an incomplete open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 405-407 as indicated by bolded underline in Figure 89. The predicted partial length PRO1868 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ179, SEQ ID NO:229) is 343 amino acids long, has a calculated molecular weight of 39285 daltons and a pI of 6.06.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Analysis of the UNQ179 (SEQ ID NO:229) shown in Figure 90 reveals a signal peptide at about amino acid residues 1 to 20, an N-glycosylation site at about amino acid residues 318-322, tyrosine kinase phosphorylation sites at about amino acid residues 21-29 and 211-220, N-myristoylation sites at about residues 63-69, 83-89 and 317-323 and a prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site at about residues 260-271. A cDNA clone containing DNA30868 (SEQ ID NO:228) has been deposited with the ATCC on March 2, 2000 under the designation DNA30868-1156 and has been assigned ATCC deposit no. \_\_\_\_\_.

AT. Isolation of cDNA clones Encoding Murine PRO21 (UNQ21)

The isolation of DNA36638 (Fig. 91, SEQ ID NO:230), which encodes the native sequence PRO21 polypeptide UNQ21 (Fig. 92, SEQ ID NO:231) has been previously described in U.S.P. 5,955,420. Additional cloning and characterizing information can be found in Schneider *et al.*, *Cell* 54 (6): 787-93 (1988) and in Manfioletti *et al.*, *Mol Cell Biol.* 13 (8): 4976-85 (1993).

Clone DNA36638 contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide residues 168-170 and ending at the stop codon (TAG) at nucleotide residues 2187-2189 (Figure 91), as indicated by bolded underline. The predicted PRO21 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ21, SEQ ID NO:231) is 673 amino acids long, has a calculated molecular weight of 74,512 daltons and a pI of 5.45. A cDNA clone containing DNA36638 has been deposited with the ATCC under the designation DNA36638-1056 on November 12, 1997 and has been assigned ATCC deposit number 209456.

Analysis of the UNQ21 polypeptide of Figure 92 (SEQ ID NO:231) reveals a signal sequence at about amino acid residues 1-27, a transmembrane domain at about amino acid residues 619-635, N-glycosylation sites at about residues 417-421 and 488-492, N-myristoylation sites at about amino acid residues 126-132, 135-141, 146-152, 173-179, 214-220, 253-259, 346-352, 374-380, 440-446, 479-485, 497-503, 517-523, 612-618, aspartic acid and asparagine hydroxylation sites at about amino acid residues 130-142, 168-180, 209-221 and 248-260, a vitamin K-dependent carboxylation domain and an EGF-like domain cysteine pattern signature at about amino acid residues 139-151.

AU. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO269 (UNQ236)

Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal kidney library in combination with an *in vitro* cloning procedure using the probe oligonucleotide and one of the primer pairs below resulted in the identification of the full length DNA sequence DNA38260 (Fig. 93, SEQ ID NO:232) and the derived PRO269 native sequence protein UNQ236 (Fig. 94, SEQ ID NO:233).

The forward and reverse PCR primers and the hybridization probe used were the following:

forward PCR primer (.f1): (SEQ ID NO:234)

5'-TGGAAGGAGATGCGATGCCACCTG-3'

forward PCR primer (.f2): (SEQ ID NO:235)

5'-TGACCACTGGGGGAAGGACAG-3'

forward PCR primer (.f3): (SEQ ID NO:236)

5'-ACAGAGCAGAGGGTGCCTTG-3'

reverse PCR primer (.r1): (SEQ ID NO:237)

5'-TCAGGGACAAGTGGTGTCTCTCCC-3'



WO 00/53758

PCT/US00/05841

reverse PCR primer(.r2):

(SEQ ID NO:238)

5'-TCAGGGAAGGAGTGTGCAGTTCTG-3'

hybridization probe:

(SEQ ID NO:239)

5'-ACAGTCCCGATCTCAGTTACTTGTCATCGCGGACGAAATCGGCGCTCGCT-3'

5 Clone DNA38260 (SEQ ID NO:232) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 314-316 and ending at the stop codon (TAG) at nucleotide positions 1784-1786 (Fig. 93), as indicated by bolded underline. The predicted PRO269 polypeptide precursor is 490 amino acids long (*i.e.*, UNQ236, Fig. 94, SEQ ID NO:233), has a calculated molecular weight of 51,636 daltons and a pI of 6.29. A cDNA clone containing DNA38260 (SEQ ID NO:232) has been deposited with ATCC on October 17, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209397.

10 Analysis of the UNQ236 polypeptide of Figure 94 (SEQ ID NO:223) reveals a signal sequence at about amino acid residues 1-16, a transmembrane domain at about residues 399-418, N-glycosylation sites at about amino acid residues 189-193 and 381-385, a glycosaminoglycan attachment site at about amino acid residues 289-293, cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites at about amino acid residues 98-102 and 434-438, N-myristoylation sites about amino acid residues 30-36, 35-41, 58-64, 59-65, 121-127, 151-157, 185-191, 209-215, 267-273, 350-356, 374-380, 453-459, 463-469 and 477-483 and an aspartic acid and asparagine hydroxylation site at about amino acid residues 262-274.

#### AV. Isolation of cDNA Encoding Human PRO344 (UNQ303)

20 Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal kidney library in combination with an *in vitro* cloning procedure using the probe oligonucleotide and one of the primer pairs below resulted in the identification of the full length DNA sequence DNA40592 (Fig. 95, SEQ ID NO:240) and the derived PRO344 native sequence protein UNQ303 (Fig. 96, SEQ ID NO:241).

The forward and reverse PCR primers and the hybridization probe used were the following:

25 forward PCR primer (34398.f1): (SEQ ID NO:242)

5'-TACAGGCCAGTCAGGACCGGG-3'

forward PCR primer (34398.f2): (SEQ ID NO:243)

5'-AGCCAGCCTCGTCTCTCGG-3'

forward PCR primer (34398.f3): (SEQ ID NO:244)

30 5'-GTCTGCGATCAGGTCTGG-3'

reverse PCR primer (34398.r1): (SEQ ID NO:245)

5'-GAAAGAGGCAATGGATTTCG-3'

reverse PCR primer (34398.r2): (SEQ ID NO:246)

5'-GACTTACACTTGCCAGCACAGCAC-3'

35 hybridization probe (34398.p1): (SEQ ID NO:247)

5'-GGAGCACCACCACTGGAGGTCCGGAGTAGCGAGCGCCCGAAG-3'

40 Clone DNA40592 (SEQ ID NO:240) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 227-229 and ending at the stop codon (TAG) at nucleotide positions 956-958 (Figure 95). The predicted PRO344 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ303, SEQ ID NO:241) is 243 amino acids long (Figure 96), has a calculated molecular weight of 25,298 daltons and a pI of 6.44.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Analysis of the UNQ303 polypeptide of Figure 96 (SEQ ID NO:241) reveals a signal peptide at about amino acid residue 1-15, N-myristoylation sites at about amino acid residues 11-17, 68-74, and 216-222 and a cell attachment site at about amino acid residues 77-80. A cDNA clone containing DNA40592 (SEQ ID NO:240) has been deposited with ATCC on November 21, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209492.

5 AX. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO333 (UNQ294)

Use of the ECD homology procedure in combination with an *in vivo* cloning procedure resulted in the identification of the partial length sequence DNA41374 (SEQ ID NO:248, Figure 97).

10 Clone DNA41374 (SEQ ID NO:248) contains an incomplete open reading frame with an apparent translation termination site (*i.e.*, stop codon, TGA) at nucleotide residues 1185-1187, as indicated in bolded underline. The predicted partial length PRO333 polypeptide (*i.e.*, UNQ294, SEQ ID NO:249) is 394 amino acids long, a calculate molecular weight of 43,725 daltons and a pI of 8.36.

15 Analysis of the UNQ294 (SEQ ID NO:249) polypeptide of Figure 98 reveals a signal sequence at about amino acid residues 1-14, a transmembrane domain at about residues 359-376, N-myristoylation sites at about amino acid residues 166-172, 206-212, 217-223, 246-252, 308-314, 312-318, 361-367 and an immunoglobulin and major histocompatibility complex proteins signature at amino acid residues 315-323. A cDNA clone containing DNA41374 has been deposited with the ATCC on \_\_\_\_\_ and as assigned ATCC deposit number \_\_\_\_\_.

20 AY. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO381 (UNQ322)

Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal kidney library resulted in the identification of the full length DNA sequence DNA44194 (Fig. 99, SEQ ID NO:250) and the derived PRO381 native sequence protein UNQ322 (Fig. 100, SEQ ID NO:251).

The forward and reverse PCR primers and the hybridization probe used were the following:

25 Forward PCR primer (39651.f1): (SEQ ID NO:252)

5'-CTTTCCTTGCTTCAGCAACATGAGGC-3'

Reverse PCR primer (39651.r1): (SEQ ID NO:253)

5'-GCCCAGAGCAGGAGGAATGATGAGC-3'

hybridization probe (39651.p1): (SEQ ID NO:254)

30 5'-GTGGAACGCGTCTTGACTCTGTCGTCACCTCTTTGATTGGGGCTTTG-3'

Clone DNA44194 (SEQ ID NO:250) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 174-176 and ending at the stop codon (TAG) at nucleotide positions 807-809 (Fig. 99), as indicated by bolded underline. The predicted PRO381 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ322, Fig. 100, SEQ ID NO:251) is 211 amino acids long, has a calculated molecular weight of 24,172 daltons and has a pI of 5.99. The UNQ322 (SEQ ID NO:251) protein shown in Figure 100 has the following features: a signal peptide from about amino acid residues 1 to about 20, a potential N-glycosylation site at about amino acid residue 156, potential casein kinase phosphorylation sites from about amino acid residues 143 to about 146, about residues 156 to about 159, about residues 178 to about 181, about residues 200 to about 203, an endoplasmic reticulum targeting sequence from about amino acid residues 78 to about 114 and from about residues 118 to about 131, EF-hand calcium binding domain from about amino acid residues

WO 00/53758

PCT/US00/05841

140 to about 159, and an S-100/TCaBP type calcium binding domain from about amino acid residues 183 to about 203. A cDNA clone containing DNA44194 (SEQ ID NO:250) has been deposited with the ATCC on April 28, 1998 and is assigned deposit number 209808.

5 AZ. Isolation of cDNA clones Encoding Murine PRO720 (UNQ388)

The preparation of DNA53517 (SEQ ID NO:255) is described above under "X. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO770 (UNQ408)." Clone DNA53517 (SEQ ID NO:255) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide residues 36-38 and ending at the stop codon (TAA) at 369-371 (Figure 101), as indicated by bolded underline. The predicted PRO720 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ388, SEQ ID NO:256) is 111 amino acids long (Figure 102), has a calculated molecular weight of 11,936 daltons and a pI of 5.21.

Analysis of the UNQ388 (SEQ ID NO:256) polypeptide of Figure 102 reveals a signal sequence at about amino acid residues 1-23, N-myristoylation sites at about amino acids residues 70-76 and 75-81 and prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment sites at 66-77 and 68-79. A cDNA clone containing DNA53517 (SEQ ID NO:255) has been deposited with the ATCC on April 23, 1998 and is assigned deposit number 209802.

BA. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO866 (UNQ435)

Use of the ECD homology procedure described above in a human fetal kidney library resulted in the identification of the full length DNA sequence DNA53971 (Fig. 103, SEQ ID NO:257) and the derived PRO866 native sequence protein UNQ435 (Fig. 104, SEQ ID NO:258).

The forward and reverse PCR primers and the hybridization probe used were the following:

|                                                   |                 |
|---------------------------------------------------|-----------------|
| Forward PCR primer (44708.f1):                    | (SEQ ID NO:259) |
| 5'-CAGCACTGCCAGGGAAGAGGG-3'                       |                 |
| 25 Forward PCR primer (44708.f2):                 | (SEQ ID NO:260) |
| 5'-CAGGACTCGCTACGTCCG-3'                          |                 |
| Forward PCR primer (44708.f3):                    | (SEQ ID NO:261) |
| 5'-CAGCCCCCTTCTCCTCCTTTCTCCC-3'                   |                 |
| Reverse PCR primer (44708.r1):                    | (SEQ ID NO:262) |
| 30 5'-GCAGTTATCAGGGACGCACTACGCC-3'                |                 |
| Reverse PCR primer (44706.r2):                    | (SEQ ID NO:263) |
| 5'-CCAGCGAGAGGCAGATAG-3'                          |                 |
| Reverse PCR primer (44706.r3):                    | (SEQ ID NO:264) |
| 5'-CGGTACCGTGTCTCGGGATG-3'                        |                 |
| 35 hybridization probe (44708.p1):                | (SEQ ID NO:265) |
| 5'-CAGCCCCCTTCTCCTCCTTTCTCCCACGTCCTATCTGCCTCTC-3' |                 |

The clone DNA53971 (SEQ ID NO:257) contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 275-277 and ending at the stop codon (TAA) at nucleotide positions 1268-1270 (Figure 103), as indicated by bolded underline. The predicted native sequence PRO866 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ435, SEQ ID NO:258) is 331 amino acids (Figure 104), has a calculated

WO 00/53758

PCT/US00/05841

molecular weight of 35.844 daltons and a pI of 5.45. The UNQ435 (SEQ ID NO:258) protein shown in Figure 104 has an estimated molecular weight of about 35.844 daltons and a pI of about 5.45. Further analysis reveals a signal peptide from about amino acid residue 1 to about residue 26, glycosaminoglycan attachment sites at about amino acid residues 131-135, cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites at about amino acid residues 144-148 and N-myristoylation sites at amino acid residues 26-32, 74-80, 132-138, 134-140, 190-196, 287-293 and 290-296. A cDNA clone containing DNA53971 (SEQ ID NO:257) has been deposited with the ATCC on April 6, 1998 and is assigned deposit no. 209750.

BB. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO840 (UNQ433)

The use of a yeast screen procedure on tissue isolated from a human thyroid library resulted in an EST sequence which served as the template for the creation of PCR oligonucleotides which ultimately resulted in the isolation of DNA53987 (SEQ ID NO:266, Figure 105) and the derived PRO840 native sequence protein UNQ433 (SEQ ID NO:267, Figure 106).

A nucleotide sequence encoding a polypeptide of substantial homology with UNQ433 (SEQ ID NO:267) of Figure 106 is also available from GenBank as accession number HEEPSSARC\_1.

DNA53987 (SEQ ID NO:266) as shown in Figure 105 contains an open reading frame with a translation initiation site at about nucleotide residues 18-20 and ending at the stop codon (TGA) at nucleotide residues 1329-1331, as indicated by bolded underline. The second methionine codon at nucleotide residues 90-92 could possibly also be the actual translation initiation site - alternatively, this codes for an internal methionine. The predicted PRO840 polypeptide (*i.e.*, the longer translation) has been termed UNQ433 (SEQ ID NO:267) and is 437 amino acids long (Figure 106), has a calculated molecular weight of 49.851 daltons and a pI of 6.47.

A cDNA clone containing DNA53987 (SEQ ID NO:266) has been deposited with the ATCC on May 12, 1998 under ATCC deposit number 209858.

Analysis of the UNQ433 polypeptide of Figure 106 (SEQ ID NO:267) reveals a signal sequence at about amino acid residues 1-46, a transmembrane domain at about amino acid residues 319-338, an N-glycosylation site at about residues 200-204, a cAMP and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites at amino acid residues 23-27, tyrosine kinase phosphorylation sites at amino acid residues 43-52 and N-myristoylation sites at residues 17-23, 112-118, 116-122 and 185-191.

BC. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO982 (UNQ483)

Use of the signal algorithm procedure described above resulted in the identification of an EST cluster sequence no. 43715. This sequence was then compared to a variety of various EST databases as described under the signal algorithm procedure above, and further resulted in the identification of Merck EST No. AA024389. The full-length clone corresponding to this EST resulted in the identification of the full-length sequence DNA57700 (Fig. 107, SEQ ID NO:268) and the derived PRO982 native sequence protein UNQ483 (Fig. 108, SEQ ID NO:269).

The DNA57700 sequence of Figure 107 (SEQ ID NO:268) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 26-28 and ending at the stop codon (TAA) found at nucleotide positions 401-403, as indicated by bolded underline. The predicted PRO982 polypeptide precursor

WO 00/53758

PCT/US00/05841

(i.e., UNQ982, SEQ ID NO:191) is 124 amino acids in length, has a calculated molecular weight of approximately 14,198 daltons and an estimated pI of approximately 9.01 (Fig. 108). Further analysis of the UNQ483 (SEQ ID NO:269) polypeptide of Figure 108 reveals a signal peptide from about amino acid residues 1 to about 21 and potential anaphylatoxin domain from about amino acid residue 1 to about residue 59. A cDNA clone containing DNAS7700 (SEQ ID NO:268) was deposited with the ATCC on January 12, 1999 and is assigned ATCC deposit No. 203583.

BD. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO836 (UNQ545)

Use of the signal algorithm procedure described above resulted in the identification of EST clusters which were then compared to a variety of various EST databases as described under the signal algorithm procedure above, and further resulted in the identification of Incyte EST 2610075, an EST derived from colon tumor tissue. The full-length clone corresponding to this EST resulted in the identification of the full-length sequence DNA59620 (Fig. 109, SEQ ID NO:270) and the derived PRO836 native sequence protein UNQ545 (Fig. 110, SEQ ID NO:271).

The nucleotide sequence DNA59620 (SEQ ID NO:270) shown in Figure 109 contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 65-67 and ending at the stop codon (TGA) at nucleotide positions 1448-1450 (Fig. 109), as indicated by bolded underline. The predicted PRO836 polypeptide precursor (i.e., UNQ545, Fig. 110, SEQ ID NO:271) is 461 amino acids in length. UNQ545 (SEQ ID NO:271) shown in Figure 110 has an estimated molecular weight of about 52,085 daltons and a pI of about 5.36. Further analysis reveals a signal peptide at about amino acid residues 1 to about 29, N-glycosylation sites at about amino acid residues 193 and 236 and N-myristoylation sites at about residues 15, 19, 234, 251, 402 and 451, a domain conserved in the YJL126w/YLR351c/yhcX family of proteins at about amino acid residues 364 to about 372, and a region having sequence identity with SLS1 protein at about amino acid residues 68 to about 340.

A cDNA clone containing DNA59620 (SEQ ID NO:270) has been deposited with the ATCC on 16 June 1998 and is assigned deposit number 209989.

BE. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1159 (UNQ589)

Use of the signal algorithm procedure described above resulted in the identification of EST cluster sequence 77245, which was then compared to a variety of various EST databases as described under the signal algorithm procedure above, and further resulted in the identification of Incyte EST no. 376776. Analysis of the full-length clone corresponding to this EST resulted in the identification of the full-length sequence DNA60627 (Fig. 111, SEQ ID NO:272) and the derived PRO1159 native sequence protein UNQ589 (Fig. 112, SEQ ID NO:273).

Clone DNA60627 (SEQ ID NO:272) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 92-94 and ending at the stop codon (TAG) at nucleotide positions 362-364 (Figure 111), as indicated by bolded underline. The predicted PRO1159 polypeptide precursor (i.e., UNQ589, SEQ ID NO:273) is 90 amino acids long (Figure 112). The UNQ589 (SEQ ID NO:273) protein shown in Figure 112 has an estimated molecular weight of about 9,840 daltons and a pI of about 10.13.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Analysis of the UNQ589 (SEQ ID NO:273) sequence shown in Figure 112 evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid residue 1 to about residue 15 and a potential N-glycosylation site at about amino acid residue 38. Clone DNA60627 (SEQ ID NO:272) has been deposited with ATCC on August 4, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203092.

5

BF. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1358 (UNQ707)

Use of the signal algorithm procedure described above resulted in the identification of an EST cluster sequence, which was then compared to a variety of various EST databases as described under the signal algorithm procedure above, and further resulted in the identification of Incyte EST 088718, a fragment derived from a liver tissue library. Analysis of the full-length clone corresponding to the EST resulted in the identification of the full-length sequence DNA64890 (Fig. 113, SEQ ID NO:274) and the derived PRO1358 native sequence protein UNQ707 (Fig. 114, SEQ ID NO:275).

10

The DNA64890 (SEQ ID NO:274) clone shown in Figure 113 contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 86 through 88 and ending at the stop codon (TAA) found at nucleotide positions 1418 through 1420 (Figure 113), as indicated by bolded underline. The predicted PRO1358 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ707, SEQ ID NO:275) is 444 amino acids long, and a signal peptide is at about amino acid residues 1-18. UNQ707 (SEQ ID NO:275) has a calculated molecular weight of approximately 50719 daltons and an estimated pI of approximately 8.82. A cDNA clone containing DNA64890 (SEQ ID NO:274), designated as DNA64890-1612, was deposited with the ATCC on August 18, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203131.

15

20

BG. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1325 (UNQ685)

Use of the signal algorithm procedure described above resulted in the identification of the EST cluster sequence no. 139524, which was then compared to a variety of various EST databases as described under the signal algorithm procedure above, and further resulted in the identification of Incyte EST 3744079. Analysis of the full-length clone corresponding to the EST resulted in the identification of the full-length sequence DNA66659 (Fig. 115, SEQ ID NO:276) and the derived PRO1325 native sequence protein UNQ685 (Fig. 116, SEQ ID NO:277).

25

Clone DNA66659 (Fig. 115, SEQ ID NO:276) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 51-53 and ending at the stop codon (TAG) at nucleotide positions 2547-2549, as indicated by bolded underline. The predicted PRO1325 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ685, SEQ ID NO:227) is 832 amino acids long. The UNQ685 (SEQ ID NO:227) protein shown in Figure 116 has an estimated molecular weight of about 94,454 daltons and a pI of about 6.94. Further analysis of UNQ685 (SEQ IDNO:227) reveals: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 18, transmembrane domains from about amino acid 292 to about amino acid 317, from about amino acid 451 to about amino acid 470, from about amino acid 501 to about amino acid 520, from about amino acid 607 to about amino acid 627 from about amino acid 751 to about amino acid 770, a leucine zipper pattern sequence from about amino acid 497 to about amino acid 518 and potential N-glycosylation sites from about amino acid 27 to about amino acid 30, from about amino acid 54 to about amino acid 57, from about amino acid 60 to about amino acid 63, from about amino acid position 123 to about amino acid position 126, from about amino

30

35

40

WO 00/53758

PCT/US00/05841

acid position 141 to about amino acid position 144, from about amino acid position 165 to about amino acid position 168, from about amino acid position 364 to about amino acid position 367, from about amino acid position 476 to about amino acid position 479, from about amino acid position 496 to about amino acid position 499, from about amino acid position 572 to about amino acid position 575, from about amino acid position 603 to about amino acid position 606 and from about amino acid position 699 to about amino acid position 702. A cDNA clone containing DNA66659 (SEQ ID NO:276)) has been deposited with ATCC on September 22, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203269.

BH. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1338 (UNQ693)

The use of yeast screens resulted in EST sequences which were then compared to various public and private EST databases in a manner similar to that described above under ECD homology resulted in the identification of Incyte EST2615184, an EST derived from cholecystitis gall bladder tissue. Analysis of the corresponding full-length sequence ultimately resulted in the isolation of DNA66667 (SEQ ID NO:278, Figure 117) and the derived PRO1338 native sequence protein UNQ693 (SEQ ID NO:279, Figure 118).

DNA66667 (SEQ ID NO:278) as shown in Figure 117 contains a single open reading frame with a translation initiation site at about nucleotide residues 115-117 and ending at the stop codon (TAA) at nucleotide positions 2263-2265, as indicated by bolded underline. The predicted PRO1338 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ693, SEQ ID NO:118) is 716 amino acids in length (Figure 118), has a calculated molecular weight of 80.716 daltons and a pI of 6.06.

Analysis of the UNQ693 polypeptide (SEQ ID NO:278) of Figure 118 reveals a signal sequence at about amino acid residues 1 to 25, a transmembrane domain at about amino acid residues 629-648, N-glycosylation sites at about amino acid residues 69-73, 96-100, 106-110, 117-121, 385-389, 517-521, 582-586 and 611-615, a tyrosine kinase phosphorylation site at about residues 573-582 and N-myristoylation sites at about amino acid residues 16-22, 224-230, 464-470, 637-643 and 698-704.

A cDNA containing DNA66667 (SEQ ID NO:278) has been deposited with the ATCC under the designation DNA66667-1596 on September 22, 1998 and has been assigned ATCC deposit number 203267.

BI. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1434 (UNQ739)

Use of ECD homology procedure described above in a human retina tissue library resulted in the identification of the full-length DNA sequence DNA68818 (Fig. 119, SEQ ID NO:280) and the derived PRO1434 native sequence protein UNQ739 (Fig. 120, SEQ ID NO:281).

The PCR primers (forward and reverse) and hybridization probe synthesized in this procedure were the following:

forward PCR primer:  
 5'-GAGGTGTCGCTGTGAAGCCAACGG-3' (SEQ ID NO:282)  
reverse PCR primer:  
 5'-CGCTCGATTCTCCATGTGCCTTCC-3' (SEQ ID NO:283)  
hybridization probe:  
 5'-GACGGAGTGTGTGGACCCTGTGTACGAGCCTGATCAGTGCTGTCC-3' (SEQ ID NO:284)

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Clone DNA68818 (SEQ ID NO:280) contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 581-583 and ending at the stop codon (TAG) at nucleotide positions 1556-1558 (Figure 119), as indicated by bolded underline. The predicted PRO1434 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ739, SEQ ID NO:281) is 325 amino acids long (Figure 120). The UNQ739 (SEQ ID NO:281) protein shown in Figure 120 has an estimated molecular weight of about 35,296 daltons and a pI of about 5.37. Further analysis reveals a signal sequence at about amino acid residues 1-27, a glycosaminoglycan attachment site at about amino acid residues 80-84, M-myristoylation sites at about amino acid residues 10-16, 102-108, 103-109, a cell attachment sequence at about amino acid residues 114-117 and an EGF-like domain cysteine pattern signature at about amino acid residues 176-188.

A clone containing DNA68818 (SEQ ID NO:280) has been deposited with ATCC under the designation DNA68818-2536 on February 9, 1999 and is assigned ATCC deposit no. 203657.

#### BJ. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO4333 (UNQ1888)

An expressed sequence tag (EST) DNA database (LIFESEQ<sup>®</sup>, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) was searched in a manner similar to that described above under the ECD homology procedure described above and an EST was identified which showed homology to lymphotoxin-beta receptor.

The EST served as the template to create oligonucleotide primers and probes to screen a human fetal kidney library in a manner similar to that described above under the ECD homology procedure.

The oligonucleotides created for the above procedure were the following:

forward PCR primer: (SEQ ID NO:287)

5'-GCAAGAAATTCAGGGATCGGTCTGG-3'

probe: (SEQ ID NO:288)

5'-CTGTGTTCCCTGCAACCAAGTGTGGCCAGGCATGG AGTTGTCTAAGG-3'

reverse: (SEQ ID NO:289)

5'-AGATGGCATCACTG GTGGCTGAAC-3'

forward: (SEQ ID NO:290)

5'-CAGAAGGCCAAATTGTTACAGCCACCAG-3'

reverse: (SEQ ID NO:291)

5'-ACAGTTTCCAGACCGATCCCTGAATTC-3'

The result was the isolation of the full-length DNA sequence DNA84210 (SEQ ID NO:285, Figure 121). The DNA84210 (SEQ ID NO:285) clone depicted in Figure 121 contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 185-187, and a stop codon (TAA) at nucleotide positions 1436-1438, as indicated by bolded underline. The predicted PRO4333 polypeptide precursor (*i.e.*, UNQ1888, SEQ ID NO:286) is 417 amino acids long. The UNQ1888 protein (SEQ ID NO:286) shown in Figure 121 has an estimated molecular weight of about 45305 daltons and a pI of about 5.12.

Analysis of the UNQ1888 polypeptide (SEQ ID NO:286) of Figure 121 reveals a signal peptide at about amino acid residues 1-25, a transmembrane domain at about residues 169-192, N-glycosylation sites about residues 105-109, 214-218, 319-323, 350-354, 368-372, 379-383, cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites at about residues 200-204 and 238-242, a tyrosine kinase phosphorylation site at



WO 00/53758

PCT/US00/05841

about residues 207-214, an N-myristoylation site at about residues 55-61, 215-218 and 270-276, a prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site at about residues 259-270 and a TNFR/NGFR family cysteine-rich region at about residues 89-96.

A cDNA clone containing DNA84210 (SEQ ID NO:285), designated as DNA84210-2576, has been deposited with ATCC on March 2, 1999 and is assigned ATCC deposit no. 203818.

BK. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO4302 (UNQ1866)

Use of the amylose screen procedure described above on tissue isolated from human tissue resulted in an EST sequence which was then compared against various EST databases to create a consensus sequence by a methodology as described above under the amylose yeast screen procedure and/or the ECD homology procedure. Further analysis of this consensus sequence resulted in the identification of Incyte EST no. 2408081H1. Analysis of the full-length clones corresponding to EST no. 2408081H1 resulted in the isolation of the full length native sequence clones DNA92218 (SEQ ID NO:292) and the derived PRO4302 full-length native sequence protein UNQ1866 (SEQ ID NO:293).

The full length clone DNA92218 (SEQ ID NO:292) shown in Figure 123 has a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 174-176 and a stop signal (TAG) at nucleotide positions 768-770, as indicated by bolded underline. The predicted PRO4302 polypeptide precursor (i.e., UNQ1866, SEQ ID NO:293) is 198 amino acids long, has a calculated molecular weight of approximately 22,285 daltons and an estimated pI of approximately 9.35. Analysis of UNQ1866 (Fig. 124, SEQ ID NO:293) reveals a signal peptide from about amino acid residue 1 to about residue 23, a transmembrane domain from about amino acid residue 111 to about residue 130, a cAMP and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites at residues 26-30, casein kinase II phosphorylation sites at residues 44-47 and 58-61, a tyrosine kinase phosphorylation site at residues 36-43 and N-myristoylation sites at residues 124-130, 144-150 and 189-195.

A cDNA clone containing DNA92218 (SEQ ID NO:292), designated DNA92218-2554, was deposited with the ATCC on March 9, 1999 and has been assigned deposit number 203834.

BL. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO4430 (UNQ1947)

Use of the signal algorithm procedure described above resulted in the identification of an EST cluster sequence, which was then compared to a variety of various EST databases as described under the signal algorithm procedure above, and further resulted in the identification of a consensus sequence. Further analysis of the consensus sequence resulted in the identification of the full-length sequence DNA96878 (Fig. 125, SEQ ID NO:294) and the derived PRO4430 native sequence protein UNQ1947 (Fig. 126, SEQ ID NO:295).

The native sequence DNA sequence DNA96878 (SEQ ID NO:294) shown in Figure 125 contains a single open reading frame with an apparent translation initiation site at nucleotide positions 56-58 and ending at the stop codon (TGA) found at nucleotide positions 431-433, as indicated by bolded underline. The predicted PRO4430 polypeptide precursor (UNQ1947, Fig. 126, SEQ ID NO:295) is 125 amino acids long. The UNQ4430 protein (SEQ ID NO:295) of Figure 126 has a calculated molecular weight of approximately 13821 daltons and an estimated pI of approximately 8.6. Further analysis reveals the presence of a signal sequence at about amino acid residues 1 to about 18, N-glycosylation sites at about residues 77-80 and again at

WO 00/53758

PCT/US00/05841

about residues 88-91, a casein kinase II phosphorylation site at about residues 67-70, an N-myristoylation site at about residues 84-89 and a Lys-6/u-PAR domain at about residues 85-98.

A clone containing DNA96878 (SEQ ID NO:294), designated DNA96878-2626, was deposited with the ATCC on May 4, 1999 and is assigned ATCC deposit no. 23-PTA.

#### 5 BM. Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO5727 (UNQ2448)

Various known TNF-receptors were used to screen public and private EST databases (e.g., see ECD homology procedure, above) resulting in the identification Incyte clone 5091511H. This EST sequence, which was derived from uterine tumor tissue, then served as a template for the construction of the cloning oligos indicated below which were then used to identify by PCR a human thymus cDNA library that contained the sequence of interest. These oligonucleotides were:

Forward primer (509-1):

5'-GAGGGGCTGGGTGAGATGTG-3' (SEQ ID NO:298)

Reverse primer (509-4AS):

15 5'-TGCTTTTGTACCTGCGAGGAGG-3' (SEQ ID NO:299)

To isolate the DNA sequence encoding the full-length DNA98853 polypeptide, an inverse long distance PCR procedure was carried out (Figure 129). The PCR primers generally ranged from 20 to 30 nucleotides. For inverse long distance PCR, primer pairs were designed in such a way that the 5' to 3' direction of each primer pointed away from each other.

20 A pair of inverse long distance PCR primers for cloning DNA98853 were synthesized:

Primer 1 (left primer) (509-P5):

5'-pCATGGTGGGAAGCCCGTAACG-3' (SEQ ID NO:300)

Primer 2 (right primer) (509-P6):

5'-pGATTGCCAAGAAAATGAGTACTGGGACC-3' (SEQ ID NO:301)

25 In the inverse long distance PCR reaction, the template is the plasmid cDNA library. As a result, the PCR products contain the entire vector sequence in the middle with insert sequences of interest at both ends. After the PCR reaction, the PCR mixture was treated with Dpn I which digests only the template plasmids, followed by agarose gel purification of PCR products of larger than the size of the library cloning vector. Since the primers used in the inverse long distance PCR were also 5'-phosphorylated, the purified products were then self-ligated and transformed into *E.coli* competent cells. Colonies were screened by PCR using 5' vector primer and proper gene specific primer to identify clones with larger 5' sequence. Plasmids prepared from positive clones were sequenced. If necessary, the process could be repeated to obtain more 5' sequences based on new sequence obtained from the previous round.

30 The purpose of inverse long distance PCR is to obtain the complete sequence of the gene of interest.

The clone containing the full length coding region was then obtained by conventional PCR.

The primer pair used to clone the full length coding region of DNA98853 (SEQ ID NO:296) were the following:

Forward primer (Cla-MD-509):

5'-GGAGGATCGATACCATGGATTGCCAAGAAAATGAG-3' (SEQ ID NO:302)

40 Reverse primer (509.TAA.not):

WO 00/53758

PCT/US00/05841

5'-GGAGGAGCGCGCGCTTAAGGGCTGGGAACCTCAAAGGGCAC-3' (SEQ ID NO:303)

For cloning purposes, a Cla I site and a Not I site were included in the forward primer and reverse primer respectively.

To ensure the accuracy of the PCR products, independent PCR reactions were performed and several  
5 cloned products were sequenced.

DNA sequencing of the clones isolated as described above gave the full-length DNA sequence for DNA98853 (SEQ ID NO:296, Figure 127) and the derived PRO5727 native sequence protein UNQ2448 (SEQ ID NO:297, Figure 128).

Clone DNA98853 (SEQ ID NO:296) contains a single open reading frame with an apparent  
10 translation initiation site at nucleotide positions 1-3 and ending at the stop codon (TAA) at nucleotide positions 901-903 (Figure 127), as indicated by bolded underline. The predicted PRO5727 polypeptide precursor (i.e., UNQ2448, SEQ ID NO:297) is 299 amino acids long (Figure 128), has a calculated molecular weight of 32,929 daltons and a pI of 4.95. The UNQ2448 polypeptide (SEQ ID NO:297) shown in Figure 128 has an estimated molecular weight of about 3.3 kilodaltons and a pI of about 4.72. A potential N-glycosylation site  
15 exists between amino acids 74 and 77 of the amino acid sequence shown in Figure 128. A potential N-myristoylation site exists between amino acids 24 and 29 of the amino acid sequence shown in Figure 128. Potential casein kinase II phosphorylation sites exist between amino acids 123-126, 185-188, 200-203, 252-255, 257-260, 271-274, and 283-286 of the amino acid sequence shown in Figure 128. A potential transmembrane domain exists between amino acids 137 to 158 of the sequence shown in Figure 128. It is  
20 presently believed that the polypeptide does not include a signal sequence.

A cDNA clone containing DNA98853 (SEQ ID NO:296, designated DNA98853-1739, has been deposited with ATCC on April 6, 1999 and is assigned ATCC Deposit No. April 6, 1999.

## EXAMPLE 2

25 Stimulatory Activity in Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) Assay (no.24)

This example shows that the polypeptides of the invention are active as a stimulator of the proliferation of stimulated T-lymphocytes. Compounds which stimulate proliferation of lymphocytes are useful therapeutically where enhancement of an immune response is beneficial. A therapeutic agent may take the form of antagonists of the polypeptide of the invention, for example, murine-human chimeric, humanized  
30 or human antibodies against the polypeptide.

The basic protocol for this assay is described in *Current Protocols in Immunology*, unit 3.12, edited by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober, National Institutes of Health, Published by John Wiley & Sons, Inc.

More specifically, in one assay variant, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are isolated from  
35 mammalian individuals, for example a human volunteer, by leukopheresis (one donor will supply stimulator PBMCs, the other donor will supply responder PBMCs). If desired, the cells are frozen in fetal bovine serum and DMSO after isolation. Frozen cells may be thawed overnight in assay media (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) and then washed and resuspended to 3 x 10<sup>6</sup> cells/ml of assay media (RPMI; 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 1% glutamine, 1% HEPES, 1% non-essential amino acids, 1% pyruvate).

WO 00/53758

PCT/US00/05841

The stimulator PBMCs are prepared by irradiating the cells (about 3000 Rads). The assay is prepared by plating in triplicate wells a mixture of: 100µl of test sample diluted to 1% or to 0.1%; 50 µl of irradiated stimulator cells and 50 µl of responder PBMC cells. 100 microliters of cell culture media or 100 microliter of CD4-IgG is used as the control. The wells are then incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 4 days. On day 5 and each well is pulsed with tritiated thymidine (1.0 mCi/well; Amersham). After 6 hours the cells are washed 3 times and then the uptake of the label is evaluated.

In another variant of this assay, PBMCs are isolated from the spleens of Balb/c mice and C57B6 mice. The cells are teased from freshly harvested spleens in assay media (RPMI; 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 1% glutamine, 1% HEPES, 1% non-essential amino acids, 1% pyruvate) and the PBMCs are isolated by overlaying these cells over Lympholyte M (Organon Teknika), centrifuging at 2000 rpm for 20 minutes, collecting and washing the mononuclear cell layer in assay media and resuspending the cells to 1x 10<sup>7</sup> cells/ml of assay media. The assay is then conducted as described above. The results of this assay for compounds of the invention are shown below. Positive increases over control are considered positive with increases of greater than or equal to 180% being preferred. However, any value greater than control indicates a stimulatory effect for the test protein.

Table 7

|    | <u>PRO</u> | <u>PRO Concentration</u> | <u>Percent Increase Over Control</u> |
|----|------------|--------------------------|--------------------------------------|
|    | PRO356     | 0.1%                     | 133.8                                |
| 20 | PRO356     | 0.1%                     | 208.9                                |
|    | PRO356     | 1.0%                     | 251.6                                |
|    | PRO356     | 1.0%                     | 332.1                                |
|    | PRO273     | 12.4 nM                  | 112                                  |
|    | PRO273     | 124 nM                   | 192.7                                |
| 25 | PRO769     | 23.86 nM                 | 76.3                                 |
|    | PRO769     | 238.6 nM                 | 226                                  |
|    | PRO1184    | 16.88 nM                 | 81.6                                 |
|    | PRO1184    | 168.82 nM                | 194.4                                |
|    | PRO1346    | 3.34 nM                  | 86.6                                 |
| 30 | PRO1346    | 33.41 nM                 | 188.5                                |
|    | PRO1246    | 0.07 nM                  | 145                                  |
|    | PRO1246    | 0.7 nM                   | 180.9                                |
|    | PRO269     | 0.1%                     | 122.4                                |
|    | PRO269     | 1%                       | 194.1                                |
| 35 | PRO344     | 0.1%                     | 148.6                                |
|    | PRO344     | 1%                       | 259.9                                |
|    | PRO333     | 0.1%                     | 187.8                                |
|    | PRO333     | 1%                       | 220                                  |
|    | PRO381     | 14.5 nM                  | 87.3                                 |
| 40 | PRO381     | 14.5 nM                  | 135.4                                |

128

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/53758

PCT/US00/05841

|   |        |         |       |
|---|--------|---------|-------|
|   | PRO381 | 145 nM  | 248.1 |
|   | PRO381 | 145 nM  | 290.8 |
|   | PRO533 | 0.06 nM | 163   |
|   | PRO533 | 0.61 nM | 382.9 |
| 5 | PRO720 | 0.1 nM  | 198.4 |
|   | PRO720 | 1.0 nM  | 293.5 |
|   | PRO866 | 0.1 nM  | 131.8 |
|   | PRO866 | 1.04 nM | 223.2 |

10

## EXAMPLE 3

Hairless Guinea pig Proinflammatory Assay (no. 32)

This assay is designed to determine whether the PRO polypeptides show the ability to induce vascular permeability. Polypeptides testing positive in this assay are expected to be useful for the therapeutic treatment of conditions which would benefit from enhanced vascular permeability including, for example, conditions which may benefit from enhanced local immune system cell infiltration.

Hairless guinea pigs weighing 350 grams or more were anesthetized with Ketamine (75-80 mg/kg) and 5 mg/kg Xylazine intramuscularly. Test samples containing the PRO polypeptide or a physiological buffer without the test polypeptide are injected into skin on the back of the test animals with 100 µl per injection site intradermally. There were approximately 16-24 injection sites per animal. One ml of Evans blue dye (1% in PBS) is then injected intracardially. Skin vascular permeability responses to the compounds (*i.e.*, blemishes at the injection sites of injection) are visually scored by measuring the diameter (in mm) of blue-colored leaks from the site of injection at 1, 6 and/or 24 hours post administration of the test materials. The mm diameter of blueness at the site of injection is observed and recorded as well as the severity of the vascular leakage for values scoring above 4 standard deviations over the same animal control. Blemishes of at least 5 mm in diameter are considered positive for the assay when testing purified proteins, being indicative of the ability to induce vascular leakage or permeability. A response greater than 7 mm diameter is considered positive for conditioned media samples. Human VEGF is used as a positive control, inducing a response of 4-8 mm diameter at 0.1 µg/100 µl, and 15-23 mm diam. at 1 µg/100 µl.

The tested polypeptide are diluted to 1% of the initial stock solution. UNQ 585 was diluted into 10 mM HEPES/140 mM NaCl/4% mannitol/1 mg/ml BSA pH 6.8, while UNQ334 was diluted into 140 mM NaCl, 10 mM Hepes, 4% Mannitol pH 7.4.

Table 8

| <u>UNQ polypeptide</u> | <u>Stock solution concentration</u> | <u>Time (hr)</u> | <u>dilation (mm)</u> |
|------------------------|-------------------------------------|------------------|----------------------|
| PRO1155                | 20,384 nM                           | 1                | 6                    |
| 35 PRO1155             | 20,384 nM                           | 6                | 6                    |
| PRO533                 | 1024 nM                             | 1                | 5.4                  |
| PRO533                 | 1024 nM                             | 6                | 7                    |
| PRO21                  | 22,000 nM                           | 1                | 2.0                  |
| 40 PRO21               | 22,000 nM                           | 6                | 14.0                 |

WO 00/53758

PCT/US00/05841

## EXAMPLE 4

Skin Vascular Permeability Assay (no. 64)

This assay shows that certain PRO polypeptides stimulate an immune response and induce inflammation by inducing mononuclear cell, eosinophil and PMN infiltration at the site of injection of the animal. This skin vascular permeability assay is conducted as follows. Hairless guinea pigs weighing 350 grams or more are anesthetized with ketamine (75-80 mg/Kg) and 5 mg/Kg Xylazine intramuscularly (IM). A sample of purified PRO polypeptide or a conditioned media test sample is injected intradermally onto the backs of the test animals with 100 uL per injection site. It is possible to have about 10-30, preferably about 16-24, injection sites per animal. One mL of Evans blue dye (1% in physiologic buffered saline) is injected intracardially. Blemishes at the injection sites are then measured (mm diameter) at 1hr, 6 hrs and 24 hrs post injection. Animals were sacrificed at 6 hrs after injection. Each skin injection site is biopsied and fixed in paraformaldehyde. The skins are then prepared for histopathologic evaluation. Each site is evaluated for inflammatory cell infiltration into the skin. Sites with visible inflammatory cell inflammation are scored as positive. Inflammatory cells may be neutrophilic, eosinophilic, monocytic or lymphocytic

At least a minimal perivascular infiltrate at the injection site is scored as positive, no infiltrate at the site of injection is scored as negative.

Table 9

| UNQ     | Time (hrs) | Infiltrate |
|---------|------------|------------|
| PRO172  | 24         | positive   |
| PRO200  | 24         | positive   |
| PRO200  | 24         | positive   |
| PRO216  | 24         | positive   |
| PRO272  | 24         | positive   |
| PRO362  | 24         | positive   |
| PRO1007 | 24         | positive   |
| PRO1031 | 24         | positive   |
| PRO1283 | 24         | positive   |
| PRO1343 | 24         | positive   |
| PRO1358 | 6          | positive   |
| PRO1325 | 6          | positive   |
| PRO1434 | 24         | positive   |
| PRO4333 | 6          | positive   |

## EXAMPLE 5

Inhibitory Activity in Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) Assay (no. 67)

This example shows that one or more of the PRO polypeptides are active as inhibitors of the proliferation of stimulated T-lymphocytes. Compounds which inhibit proliferation of lymphocytes are useful therapeutically where suppression of an immune response is beneficial.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

The basic protocol for this assay is described in *Current Protocols in Immunology*, unit 3.12; edited by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober, National Institutes of Health, Published by John Wiley & Sons, Inc.

More specifically, in one assay variant, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are isolated from mammalian individuals, for example a human volunteer, by leukopheresis (one donor will supply stimulator PBMCs, the other donor will supply responder PBMCs). If desired, the cells are frozen in fetal bovine serum and DMSO after isolation. Frozen cells may be thawed overnight in assay media (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) and then washed and resuspended to 3x10<sup>6</sup> cells/ml of assay media (RPMI; 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 1% glutamine, 1% HEPES, 1% non-essential amino acids, 1% pyruvate). The stimulator PBMCs are prepared by irradiating the cells (about 3000 Rads).

The assay is prepared by plating in triplicate wells a mixture of:

100:1 of test sample diluted to 1% or to 0.1%,

50:1 of irradiated stimulator cells, and

50:1 of responder PBMC cells.

100 microliters of cell culture media or 100 microliter of CD4-IgG is used as the control. The wells are then incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 4 days. On day 5, each well is pulsed with tritiated thymidine (1.0 mCi/well; Amersham). After 6 hours the cells are washed 3 times and then the uptake of the label is evaluated.

In another variant of this assay, PBMCs are isolated from the spleens of Balb/c mice and C57B6 mice. The cells are teased from freshly harvested spleens in assay media (RPMI; 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 1% glutamine, 1% HEPES, 1% non-essential amino acids, 1% pyruvate) and the PBMCs are isolated by overlaying these cells over Lympholyte M (Organon Teknika), centrifuging at 2000 rpm for 20 minutes, collecting and washing the mononuclear cell layer in assay media and resuspending the cells to 1x10<sup>7</sup> cells/ml of assay media. The assay is then conducted as described above.

Any decreases below control is considered to be a positive result for an inhibitory compound, with decreases of less than or equal to 80% being preferred. However, any value less than control indicates an inhibitory effect for the test protein.

Table 10

| PRO       | PRO Concentration | Percent Decrease Below Control |
|-----------|-------------------|--------------------------------|
| 30 PRO204 | 0.1%              | 86                             |
| PRO204    | 1.0%              | 35                             |
| PRO212    | 0.59 nM           | 0                              |
| PRO212    | 5.9 nM            | 52.6                           |
| PRO212    | 0.87 nM           | 82.7                           |
| 35 PRO212 | 8.7 nM            | 66                             |
| PRO212    | 1.9 nM            | 81.6                           |
| PRO212    | 19 nM             | 61.5                           |
| PRO212    | 0.46 nM           | 66.1                           |
| PRO212    | 4.6 nM            | 59.5                           |
| 40 PRO212 | 2.1 nM            | 0                              |

WO 00/53758

PCT/US00/05841

|    |        |           |       |
|----|--------|-----------|-------|
|    | PRO212 | 2.1 nM    | 116.2 |
|    | PRO212 | 21 nM     | 0     |
|    | PRO212 | 21 nM     | 62.2  |
|    | PRO216 | 0.13 nM   | 74.3  |
| 5  | PRO216 | 1.3 nM    | 63.3  |
|    | PRO226 | 0.12 nM   | 67.9  |
|    | PRO226 | 1.2 nM    | 40.6  |
|    | PRO235 | 0 nM      | 83.6  |
|    | PRO235 | 0.02 nM   | 69.7  |
| 10 | PRO240 | 5.3 nM    | 68.2  |
|    | PRO240 | 53 nM     | 68.2  |
|    | PRO240 | 35 nM     | 72.2  |
|    | PRO240 | 350 nM    | 64    |
|    | PRO245 | 19.1 nM   | 53    |
| 15 | PRO245 | 191 nM    | 54    |
|    | PRO245 | 0.93 nM   | 71.8  |
|    | PRO245 | 0.93 nM   | 80.9  |
|    | PRO245 | 9.3 nM    | 49.6  |
|    | PRO245 | 9.3 nM    | 51.9  |
| 20 | PRO273 | 31.46 nM  | 81    |
|    | PRO273 | 314.56 nM | 67    |
|    | PRO332 | 0.35 nM   | 74.2  |
|    | PRO332 | 3.5 nM    | 68    |
|    | PRO332 | 0.35 nM   | 20.2  |
| 25 | PRO332 | 3.5 nM    | 61.2  |
|    | PRO361 | 1.5 nM    | 63.2  |
|    | PRO361 | 15 nM     | 64.7  |
|    | PRO363 | 8.6 nM    | 76.9  |
|    | PRO363 | 86 nM     | 63.6  |
| 30 | PRO363 | 8.6 nM    | 64.4  |
|    | PRO363 | 86 nM     | 2.1   |
|    | PRO364 | 0.31 nM   | 68.1  |
|    | PRO364 | 3.1 nM    | 67.4  |
|    | PRO364 | 1.7 nM    | 92.8  |
| 35 | PRO364 | 17 nM     | 68.4  |
|    | PRO364 | 1.7 nM    | 94.2  |
|    | PRO364 | 17 nM     | 63.3  |
|    | PRO526 | 0.12 nM   | 68.5  |
|    | PRO526 | 1.2 nM    | 62.5  |
| 40 | PRO531 | 0.2 nM    | 66.1  |



| WO 00/53758 |         | PCT/US00/05841 |      |
|-------------|---------|----------------|------|
|             | PRO531  | 2 nM           | 54.3 |
|             | PRO531  | 0.2 nM         | 70.4 |
|             | PRO531  | 2 nM           | 68.4 |
|             | PRO701  | 0.74 nM        | 72.5 |
| 5           | PRO701  | 0.74 nM        | 90.2 |
|             | PRO701  | 7.4 nM         | 64.8 |
|             | PRO701  | 7.4 nM         | 69   |
|             | PRO770  | 0.69 nM        | 65.8 |
|             | PRO770  | 6.9 nM         | 67.4 |
| 10          | PRO788  | 12.96 nM       | 88.4 |
|             | PRO788  | 129.6 nM       | 57.7 |
|             | PRO788  | 2.9 nM         | 64.4 |
|             | PRO788  | 29 nM          | 67.4 |
|             | PRO865  | 0.27 nM        | 67.9 |
| 15          | PRO865  | 2.7 nM         | 63.7 |
|             | PRO1083 | 7.1 nM         | 80.5 |
|             | PRO1083 | 71 nM          | 63.7 |
|             | PRO1083 | 7.1 nM         | 40.9 |
|             | PRO1083 | 71 nM          | 65   |
| 20          | PRO1114 | 0.37 nM        | 44.9 |
|             | PRO1114 | 3.7 nM         | 42.4 |
|             | PRO1192 | 12.1 nM        | 31.6 |
|             | PRO1192 | 121 nM         | 32.6 |
|             | PRO1195 | 0.5 nM         | 67   |
| 25          | PRO1195 | 5 nM           | 66.8 |
|             | PRO1250 | 0.05 nM        | 75.4 |
|             | PRO1250 | 0.5 nM         | 57.2 |
|             | PRO1250 | 0.05 nM        | 94.6 |
|             | PRO1250 | 0.5 nM         | 61.2 |
| 30          | PRO1312 | 8.5 nM         | 52   |
|             | PRO1312 | 85 nM          | 49.3 |
|             | PRO1312 | 14.2 nM        | 73.1 |
|             | PRO1312 | 142 nM         | 62.9 |
|             | PRO1287 | 0.8 nM         | 79.1 |
| 35          | PRO1387 | 8 nM           | 52.3 |
|             | PRO1410 | 4 nM           | 89   |
|             | PRO1410 | 40 nM          | 64.8 |
|             | PRO1418 | 6.4 nM         | 67.7 |
|             | PRO1418 | 6.4 nM         | 81.1 |
| 40          | PRO1418 | 64 nM          | 56.3 |

| WO 00/53758 |         | PCT/US00/05841 |
|-------------|---------|----------------|
|             | PRO1418 | 64 nM          |
|             | PRO1868 | 39.4 nM        |
|             | PRO1868 | 394 nM         |
|             | PRO1917 | 2.1 nM         |
| 5           | PRO1917 | 2.1 nM         |
|             | PRO1917 | 21 nM          |
|             | PRO1917 | 21 nM          |
|             | PRO205  | 0.7 nM         |
|             | PRO205  | 7 nM           |
| 10          | PRO840  | 24.4 nM        |
|             | PRO982  | 244 nM         |
|             | PRO836  | 2.5 nM         |
|             | PRO836  | 25 nM          |
|             | PRO1159 | 11.06 nM       |
| 15          | PRO1159 | 110.55 nM      |
|             | PRO1159 | 11.06 nM       |
|             | PRO1159 | 110.55 nM      |
|             | PRO1338 | 0.14 nM        |
|             | PRO1338 | 1.4 nM         |
| 20          | PRO4302 | 13.56 nM       |
|             | PRO4302 | 135.57 nM      |
|             | PRO4430 | 24.2 nM        |
|             | PRO4430 | 242 nM         |
|             | PRO5727 | 19.6 nM        |
| 25          | PRO5727 | 196 nM         |

## EXAMPLE 6

*In situ* Hybridization

*In situ* hybridization is a powerful and versatile technique for the detection and localization of nucleic acid sequences within cell or tissue preparations. It may be useful, for example, to identify sites of gene expression, analyze the tissue distribution of transcription, identify and localize viral infection, follow changes in specific mRNA synthesis and aid in chromosome mapping.

*In situ* hybridization was performed following an optimized version of the protocol by Lu and Gillett, *Cell Vision* 1: 169-176 (1994), using PCR-generated <sup>33</sup>P-labeled riboprobes. Briefly, formalin-fixed, paraffin-embedded human tissues were sectioned, deparaffinized, deproteinized in proteinase K (20 g/ml) for 15 minutes at 37°C, and further processed for *in situ* hybridization as described by Lu and Gillett, *supra*. A [<sup>33</sup>P] UTP-labeled antisense riboprobe was generated from a PCR product and hybridized at 55°C overnight. The slides were dipped in Kodak NTB2 nuclear track emulsion and exposed for 4 weeks.

<sup>33</sup>P-Riboprobe synthesis

WO 00/53758

PCT/US00/05841

6.0  $\mu$ l (125 mCi) of  $^{33}$ P-UTP (Amersham BF 1002, SA<2000 Ci/mmol) were speed vac dried. To each tube containing dried  $^{33}$ P-UTP, the following ingredients were added: 2.0  $\mu$ l 5x transcription buffer; 1.0  $\mu$ l DTT (100 mM); 2.0  $\mu$ l NTP mix (2.5 mM : 10  $\mu$ l; each of 10 mM GTP, CTP & ATP + 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O); 1.0  $\mu$ l UTP (50  $\mu$ M); 1.0  $\mu$ l Rnasin; 1.0  $\mu$ l DNA template (1 $\mu$ g); 1.0  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

5 The tubes were incubated at 37°C for one hour. 1.0  $\mu$ l RQ1 DNase were added, followed by incubation at 37°C for 15 minutes. 90  $\mu$ l TE (10 mM Tris pH 7.6/1mM EDTA pH 8.0) were added, and the mixture was pipetted onto DE81 paper. The remaining solution was loaded in a Microcon-50 ultrafiltration unit, and spun using program 10 (6 minutes). The filtration unit was inverted over a second tube and spun using program 2 (3 minutes). After the final recovery spin, 100  $\mu$ l TE were added. 1  $\mu$ l of the final product  
10 was pipetted on DE81 paper and counted in 6 ml of Biofluor II.

The probe was run on a TBE/urea gel. 1-3  $\mu$ l of the probe or 5  $\mu$ l of RNA Mrk III were added to 3  $\mu$ l of loading buffer. After heating on a 95°C heat block for three minutes, the gel was immediately placed on ice. The wells of gel were flushed, the sample loaded, and run at 180-250 volts for 45 minutes. The gel was wrapped in saran wrap and exposed to XAR film with an intensifying screen in -70°C freezer one hour to  
15 overnight.

#### $^{33}$ P-Hybridization

*Pretreatment of frozen sections* The slides were removed from the freezer, placed on aluminum trays and thawed at room temperature for 5 minutes. The trays were placed in 55°C incubator for five minutes to reduce condensation. The slides were fixed for 10 minutes in 4% paraformaldehyde on ice in the fume  
20 hood, and washed in 0.5 x SSC for 5 minutes, at room temperature (25 ml 20 x SSC + 975 ml SQ H<sub>2</sub>O). After deproteinization in 0.5  $\mu$ g/ml proteinase K for 10 minutes at 37°C (12.5 $\mu$ l of 10 mg/ml stock in 250 ml prewarmed RNase-free RNase buffer), the sections were washed in 0.5 x SSC for 10 minutes at room temperature. The sections were dehydrated in 70%, 95%, 100% ethanol, 2 minutes each.

*Pretreatment of paraffin-embedded sections* The slides were deparaffinized, placed in SQ H<sub>2</sub>O, and  
25 rinsed twice in 2 x SSC at room temperature, for 5 minutes each time. The sections were deproteinized in 20  $\mu$ g/ml proteinase K (500  $\mu$ l of 10 mg/ml in 250 ml RNase-free RNase buffer; 37°C, 15 minutes) - human embryo, or 8 x proteinase K (100  $\mu$ l in 250 ml RNase buffer, 37°C, 30 minutes) - formalin tissues. Subsequent rinsing in 0.5 x SSC and dehydration were performed as described above.

*Prehybridization* The slides were laid out in plastic box lined with Box buffer (4 x SSC, 50%  
30 formamide) - saturated filter paper. The tissue was covered with 50  $\mu$ l of hybridization buffer (3.75g Dextran Sulfate + 6 ml SQ H<sub>2</sub>O), vortexed and heated in the microwave for 2 minutes with the cap loosened. After cooling on ice, 18.75 ml formamide, 3.75 ml 20 x SSC and 9 ml SQ H<sub>2</sub>O were added, the tissue was vortexed well, and incubated at 42°C for 1-4 hours.

*Hybridization* 1.0 x 10<sup>6</sup> cp. probe and 1.0  $\mu$ l RNA (50 mg/ml stock) per slide were heated at  
35 95°C for 3 minutes. The slides were cooled on ice, and 48  $\mu$ l hybridization buffer were added per slide. After vortexing, 50  $\mu$ l  $^{33}$ P mix were added to 50  $\mu$ l prehybridization on slide. The slides were incubated overnight at 55°C.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

5 *Washes* Washing was done 2x10 minutes with 2xSSC, EDTA at room temperature (400 ml 20 x SSC + 16 ml 0.25M EDTA,  $V_f=4L$ ), followed by RNaseA treatment at 37°C for 30 minutes (500  $\mu$ L of 10 mg/ml in 250 ml Rnase buffer - 20  $\mu$ g/ml). The slides were washed 2x10 minutes with 2 x SSC, EDTA at room temperature. The stringency wash conditions were as follows: 2 hours at 55°C, 0.1 x SSC, EDTA (20 ml 20 x

10 SSC + 16 ml EDTA,  $V_f=4L$ ).  
Alternatively, multi-tissue blots containing poly A<sup>+</sup> RNA (2  $\mu$ g per lane) from various human tissues were purchased from Clontech (Palo Alto, CA). DNA probes were labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP by random priming DNA labeling Beads (Pharmacia Biotech). Hybridization was performed with Expresshyb (Clontech) at 68°C for 1 hr. The blots were then washed with 2X SSC/0.05% SDS solution at room temperature for 40 min, followed by washes in 0.1X SSC/0.1%SDS solution at 55°C for 40 min with one change of fresh solution. The blots were exposed in a phosphorimager.

#### DNA 29101 (VEGFB9)

15 DNA29101 (SEQ ID NO:1) was examine in three separate *in situ* studies wherein the following probes were used:

VEGFB9-p1 (SEQ ID NO:194):

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCGGCGGAATCCAACTGAGTAG-3'

VEGFB9-p2 (SEQ ID NO:195):

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GCG GCT ATC CTC CTG TGC TC-3'

20

#### IS97-029:

Expression observed in the developing lower fetal limb bones at the edge of the cartilagenous anlage (*i.e.*, around the outside edge); in developing tendons, in vascular smooth muscle and in cells embracing developing skeletal muscle myocytes and myotubes. Expression also observed in the following tissues:  
25 epiphyseal growth plate; lymph nodes - marginal sinus; thymus - subcapsular region of the thymic cortex, possibly representing either the subcapsular epithelial cells or the proliferating, double negative, thymocytes that are found in this region; tracheal smooth muscle; brain (cerebral cortex) - focal expression in cortical neurones; small intestine - smooth muscle; thyroid - thyroid epithelium; liver - ductal plates; stomach - mural smooth muscle; fetal skin - basal layer of squamous  
30 epithelium; placenta - interstitial cells in trophoblastic villi; spinal cord - no expression except in wall of arteries and veins. No expression was observed in the spleen and adrenals.

The above expression pattern suggests that DNA29101 may be involved in cell differentiation /proliferation.

#### 35 IS97-037:

Expression in superovulated rat ovaries were negative in all sections with both antisense and sense probes. Either the message is not expressed in this model, or the human probe does not cross react with rat.

#### IS97-087:

WO 00/53758

PCT/US00/05841

High expression levels were observed at the following sites: chimp ovary - granulosa cells of maturing follicles, lower intensity signal observed over thecal cells; chimp parathyroid - high expression over chief cells; human fetal testis - moderate expression over stromal cells surrounding developing tubules; human fetal lung - high expression over chondrocytes in developing bronchial tree, and low level expression over branching bronchial epithelium.

Fetal tissues examined (E12-E16 weeks) include: placenta, umbilical cord, liver, kidney, adrenals, thyroid, lungs, heart, great vessels, esophagus, stomach, small intestine, spleen, thymus, pancreas, brain, eye, spinal cord, body wall, pelvis and lower limb. Adult tissues examined include liver, kidney, adrenal, myocardium, aorta, spleen, lymph node, pancreas, lung, skin, cerebral cortex (rm), hippocampus(rm), cerebellum(rm), penis, eye, bladder, stomach, gastric carcinoma, colon, colonic carcinoma and chondrosarcoma. Also examined were acetaminophen induced liver injury and hepatic cirrhosis

#### 15 DNA30871:

IS97-044: In fetal tissues, strong signals were observed over neurones in fetal cerebral cortex, spinal cord, spinal ganglia as well as enteric neurones in the wall of the fetal stomach. Signal also observed over cells around the root of the aorta (possibly the conducting system), adrenal medulla, mesenchymal cells in neurovascular bundle, renal parenchyma and cells lying between skeletal muscle myocytes. All other fetal tissues negative.

No expression was observed in adult tissue. Fetal tissues (12-16 weeks) examined include: placenta, umbilical cord, liver, kidney, adrenals, thyroid, lungs, heart, great vessels, esophagus, stomach, small intestine, spleen, thymus, pancreas, brain, eye, spinal cord, body wall, pelvis and lower limb. Adult tissues examined include: liver, kidney, adrenal, myocardium, aorta, spleen, lymph node, pancreas, lung and skin.

25 The probes used in the above analysis were the following:

DNA30871-p1 (SEQ ID NO:196):

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CTC CCG TCT CCT CCT GTC CTC-3'

DNA30871-p2 (SEQ ID NO:197):

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CCT CGG CAT CTT CGT CAC ATT-3'

30

#### DNA30942:

DNA30942 (SEQ ID NO:13) was examined in four separate *in situ* studies (including two in the diseased tissue study of Example 7 using the following probes:

DNA30942-p1 (SEQ ID NO:198)

35 5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TCG CTG CTG TGC CTG GTG TTG-3'

DNA30942-p2: (SEQ ID NO:199)

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CCG CTG CAG CCT CTT GAT GGA-3'

IS97-043:

WO 00/53758

PCT/US00/05841

No expression was observed in fetal tissues. The fetal tissues examined included: placenta, umbilical cord, brain, spinal cord, eye, optic nerve, trachea, lung, heart, thymus, liver, spleen, esophagus, small intestine, pancreas, adrenal, thyroid, body wall and lower limb.

5 No expression was observed in adult tissues. The adult tissues examined included liver, kidney, adrenal, myocardium, aorta, spleen, lymph node, pancreas, lung and skin.

DNA33087 (IS97-051):

10 In fetal tissue, expression of DNA33087 (SEQ ID NO:18) was observed in osteoblasts at all sites of enchondral and periosteal new bone formation, the developing pulmonary arterial and aortic trunks. The fetal tissues examined included: placenta, umbilical cord, brain, spinal cord, eye, optic nerve, trachea, lung, heart, thymus, liver, spleen, esophagus, small intestine, pancreas, adrenal, thyroid, body wall and lower limb.

No expression was observed in the adult tissues examined including: Liver, kidney, adrenal, myocardium, aorta, spleen, lymph node, pancreas, lung and skin.

The probable role in control of bone matrix deposition and or osteoblast growth.

15 All adult tissues in the multiblock were positive for beta-actin.

The probes used in this procedure were the following:

DNA33087-p1 (SEQ ID NO:200):

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CCC GAG TGT TTT CCA AGA-3'

20 DNA33087-p2 (SEQ ID NO:201):

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CAA GTT TAC TAG CCC ATC CAT-3'

DNA33087-p3 (SEQ ID NO:202):

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TGG ATG GGC TAG TAA ACT TGA-3'

DNA33087-p4 (SEQ ID NO:203):

25 5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CCC TTC TGC TCC TTC TTG TT-3'

DNA34387 (IS97-109):

The expression pattern of DNA34387 (SEQ ID NO:25) was observed in fetal and adult human tissues at the following sites:

30 Fetal - thyroid epithelium, small intestinal epithelium, gonad, pancreatic epithelium, hepatocytes in liver and renal tubules. Expression also seen in vascular tissue in developing long bones.

Adult - Moderate signal in placental cytotrophoblast, renal tubular epithelium, bladder epithelium, parathyroid and epithelial tumors.

35 The fetal (E12-E16 weeks) tissues examined included: placenta, umbilical cord, liver, kidney, adrenals, thyroid, lungs, heart, great vessels, esophagus, stomach, small intestine, spleen, thymus, pancreas, brain, eye, spinal cord, body wall, pelvis and lower limb.

The adult human tissues examined: kidney (normal and end-stage), adrenal, myocardium, aorta, spleen, lymph node, gall bladder, pancreas, lung, skin, eye (inc. retina), prostate, bladder, liver (normal, cirrhotic, acute failure).

40 The non-human primate tissues examined included the following:

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Chimp tissues: Salivary gland, stomach, thyroid, parathyroid, skin, thymus, ovary, lymph node.

Rhesus Monkey Tissues: Cerebral cortex, hippocampus, cerebellum, penis.

The probes used in this procedure were the following:

DNA34387-p1 (SEQ ID NO:206):

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CCG AGA TAT GCA CCC AAT GTC-3'

DNA34387-p2 (SEQ ID NO:207):

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TCC CAG AAT CCC GAA GAA CA-3'

DNA35638:

10 LS97-078:

Expression of DNA35638 (SEQ ID NO:35) was observed in the endothelium lining a subset of fetal and placental vessels. Endothelial expression was confined to these tissue blocks. Expression also observed over intermediate trophoblast cells of placenta.

15 The fetal tissues examined (E12-E16 weeks) included: placenta, umbilical cord, liver, kidney, adrenals, thyroid, lungs, heart, great vessels, esophagus, stomach, small intestine, spleen, thymus, pancreas, brain, eye, spinal cord, body wall, pelvis and lower limb.

The adult tissues examined included: liver, kidney, adrenal, myocardium, aorta, spleen, lymph node, pancreas, lung, skin, cerebral cortex (rm), hippocampus(rm), cerebellum(rm), penis, eye, bladder, stomach, gastric carcinoma, colon, colonic carcinoma, thyroid (chimp), parathyroid (chimp)

20 ovary (chimp) and chondrosarcoma. Also examined was tissue derived from acetaminophen induced liver injury and hepatic cirrhosis.

The oligos used for the above procedure were the following:

DNA35638-p1 (SEQ ID NO:208):

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GGG AAG ATG GCG AGG AGG AG-3'

25 DNA35638-p2 (SEQ ID NO:209):

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CCA AGG CCA CAA ACG GAA ATC-3'

DNA39523:

The following probes were used in the *in situ* studies below:

30 DNA39523-p1 (SEQ ID NO:210):

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AGC GCA CGG CCA CAG ACA-3'

DNA39523-p2 (SEQ ID NO:211):

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GAC CCT GCG CTT CTC GTT CCA-3'

35 198-052:

DNA39523 (SEQ ID NO:45) in normal human skin (neonatal foreskin) and adult psoriatic skin both exhibited specific strong expression in the epithelial cells of the stratum basale - the single layer along the basement membrane which is the progenitor for all of the overlying epidermal cells in the skin.

40 There was no expression in epidermal cells in the overlying layers (stratum spinosum, stratum granulosum, etc.). The intensity of the signal was slightly increased in psoriatic skin. Expression was also

WO 00/53758

PCT/US00/05841

apparent in the dermis (the connective tissue immediately underlying the epidermis) of both normal and psoriatic skin. Expression here was most apparent in spindle shape cells within the collagen matrix - the stromal fibroblasts.

5 In the brain, sections of cerebrum had strong specific expression in a subset of superficial cortical neurons - a distinct pattern suggestive of a specific population of cortex neurons.

In inflamed and normal bowel: Normal human large bowel and bowel with either Crohn's disease or ulcerative colitis had specific moderate to strong expression in a multifocal pattern within the lamina propria of villi. The cells labeled by *in situ* were spindloid stromal cells best delineated as  
10 fibroblasts. There was no expression by intestinal epithelial cells and there was no apparent increased expression (intensity or frequency) in diseased bowel. Specifically there was also no correlation of expression and lesions in the inflamed bowel.

In human fetal kidney, there was specific weak to moderate expression in multifocal developing tubules; expression was in the tubular epithelium in these foci.

The expression of DNA39523 (SEQ ID NO:45) in the skin and specific localization to the basal  
15 epithelial cells of the epidermis cells suggests a potential role in differentiation/maintenance of the basal epidermal cells. This expression pattern in combination with the fact that expression occurs in cells that are directly adjacent to the basement lamina, suggests that the cells regulate trafficking of leukocytes into the epidermis. As a result DNA39523 (SEQ ID NO:45) may be a constitutively expressed signal for the trafficking of dendritic/Langerhan cells or lymphocytes into the epidermis. Such trafficking is a normal  
20 physiologic event that occurs in normal skin and is thought to be involved in immunosurveillance of the skin.

The expression of DNA39523 (SEQ ID NO:45) in inflammatory bowel disease was not increased from normal tissue, and there was no correlation of its expression to inflammatory lesions. Similarly, its expression in the basal epidermal cells in psoriatic skin lesions was equivalent to or only slightly greater than that seen in normal neonatal skin (but age-matched control adult skin was not available at the time of the  
25 study).

IS97-128:

The expression of DNA39523 (SEQ ID NO:45) was observed in the epithelium of mouse embryo skin as well as the basal epithelium and dermis of human fetal skin. The basal epithelial pegs of the squamous  
30 mucosa of the chimp tongue are also positive. Expression was also observed in a subset of cells in developing glomeruli of fetal kidney, adult renal tubules, and over "thyroidized" epithelium in end-stage renal disease. However, low expression was also seen in a renal cell carcinoma, probably over the epithelial cells. Expression was also observed in the stromal cells both (1) at low levels in fetal lung, and (2) in the apical portion of gastric glands. High expression was indicated in the lamina propria of the fetal small intestinal villi,  
35 normal colonic mucosa and over stromal cells in a colonic carcinoma. Strong expression occurred in benign connective tissue cells in the hyalinized stroma of a sarcoma. Expression also occurred in stromal cells in the placental villi and the splenic red pulp. In the brain, expression occurred in cortical neurones.

DNA39523 (SEQ ID NO:45) was also expressed in the connective tissue surrounding developing bones and over nerve sheath cells in the fetus.



WO 00/53758

PCT/US00/05841

The fetal tissues examined (E12-E16 weeks) included: placenta, umbilical cord, liver, kidney, adrenals, thyroid, lungs, heart, great vessels, esophagus, stomach, small intestine, spleen, thymus, pancreas, brain, eye, spinal cord, body wall, pelvis and lower limb. The adult tissues examined included: liver, kidney, adrenal, myocardium, aorta, spleen, lymph node, pancreas, lung, skin, cerebral cortex (rm), hippocampus(rm), eye, stomach, gastric carcinoma, colon, colonic carcinoma, thyroid (chimp), parathyroid (chimp) ovary (chimp) and chondrosarcoma. Also examined included acetaminophen induced liver injury and hepatic cirrhosis.

IS98-092:

The expression of DNA39523 (SEQ ID NO:45) was present in many cells in the outer layers (I and II) of the monkey cerebral cortex. A small subset of cells in the deeper cortical layers also expressed mRNA for the chemokine homolog. Scattered cells within the molecular layers of the hippocampus and bordering the inner edge of the dentate gyrus showed expression of DNA39523 (SEQ ID NO:45). No expression was detected within the cerebellar cortex. Expression of DNA39523 (SEQ ID NO:45) was not observed in infarcted brain, where cell death has occurred in the regions where the chemokine homolog normally is expressed. DNA39523 (SEQ ID NO:45) could possibly serve as a marker of a subset of neurons of outer layers of the cerebral cortex and could possibly reveal neuronal migration disorders. Abnormal neuronal migration is a possible cause of some seizure disorders and schizophrenia.

20

IS98-126:

DNA39523 (SEQ ID NO:45) showed intriguing and specific patterns of hybridization within postnatal day (P)10 and adult mouse brains. In one sagittal section of P10 mouse brain, strong signal was observed scattered within the molecular layer of the hippocampus and inner edges of the dentate gyrus. Cells in the presubiculum were moderately labeled; the signal extended in a strong band through outer layers of the retrosplenial cortex to the occipital cortex, where the signal diminished to background levels. A small set of positive neurons were detected in deeper regions of P10 motor cortex; neurons in outer layers of P10 cortex did not exhibit signal above background levels. Moderate hybridization signal was also detected in the inferior colliculus. Chemokine homolog signal in the adult mouse brain was evaluated in three coronal sections at different levels. Strong signal was detected in the septum and in scattered neurons in the pontine nuclei and motor root of the trigeminal nerve; moderate signal was seen in the molecular layers of the hippocampus and outer layers of the retrosplenial cortex.

IS99-027:

Bolekin (also known as BRAK - the chemokine to which DNA39523 (SEQ ID NO:45) bear significant homology) belongs to a chemokine subgroup characterized by a cys-x-cys (CXC) motif and absence of an amino-terminal glu-leu-arg (ELR). Non-ELR CXC chemokines (including SDF-1, IP10, Mig and PF4) are chemotactic for subsets of leukocytes including B and T lymphocytes. They also have angiostatic activity.

DNA39523 (SEQ ID NO:45) was detected in Postnatal day (P) 1 mouse brain, bolekin signal was detected in the hippocampus (stratum lacunosum moleculare and hilus of the dentate gyrus) and anterior

WO 00/53758

PCT/US00/05841

olfactory nucleus, but not in the developing cerebral cortex or cerebellum. By P10, signal is present in a subset of cells in layers 1 & 2 of the cerebral cortex. A small population of cells in the deeper layers also express DNA39523 (SEQ IDNO:45). The pattern in the hippocampus resembled the P1 brain. Weak signal is present in the cerebellum, especially lobules IX and X. Signal is also present in the dorsal striatum and colliculi.

5 In the adult mouse brain, bolekin-positive cells were difficult to detect in the adult cerebral cortex, but signal is present in the anterior olfactory nucleus and hippocampus. In ischemic mouse brains, however, bolekin signal is induced in the penumbra.

In the developing cerebral cortex, bolekin expression correlates with final stages of neuronal migration and the establishment of axonal projections and synaptogenesis. Other CXC chemokines have roles in neuronal migration and patterning in the central nervous system (SDF-1) and modulation of neuronal activity (IL-8 and GRO- $\alpha$ ).

Bolekin expression is induced in ischemic -reperfusion injury in the brain, but not in other inflammatory states.

15 DNA47365 (IS97-142): In fetal tissues, the expression of DNA47365 (SEQ ID NO:91) was observed in the fascia lining the anterior surface of the vertebral body. There is expression over the fetal retina. Low level expression over fetal neurones.

The following probes were used in the above analysis:

DNA47365-p1 (SEQ ID NO:214):

20 5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AAC CCG AGC ATG GCA CAG CAC-3'

DNA47365-p2 (SEQ ID NO:215):

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TCT CCC AGC CGC CCC TTC TC-3'

DNA49435 (IS97-136):

25 Moderate expression of DNA49435 (SEQ ID NO:111) was observed over cortical neurones in the fetal brain. Expression was also present over the inner aspect of the fetal retina, possible expression in the developing lens. Expression was seen over fetal skin, cartilage, small intestine, placental villi and umbilical cord. In adult tissues there is an extremely high level of expression over the gallbladder epithelium. Moderate expression of DNA49435 (SEQ ID NO:111) was seen over the adult kidney, gastric and colonic epithelia.

30 The human fetal tissues examined (E12-E16 weeks) included: placenta, umbilical cord, liver, kidney, adrenals, thyroid, lungs, heart, great vessels, esophagus, stomach, small intestine, spleen, thymus, pancreas, brain, eye, spinal cord, body wall, pelvis, testis and lower limb. The adult human tissues examined included: kidney (normal and end-stage), adrenal, spleen, lymph node, pancreas, lung, eye (inc. retina), bladder, liver (normal, cirrhotic, acute failure).

35 The non-human primate tissues examined included the adrenal glands from chimp tissues and the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of rhesus monkey tissues.

The probes used in the above analysis were the following:

DNA49435-p1 (SEQ ID NO:218):

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GGA TCC TGG CCG GCC TCT G-3'

40 DNA49435-p2 (SEQ ID NO:219):

WO 00/53758

PCT/US00/05841

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GCC CGG GCA TGG TCT CAG TTA-3'

DNA54228 (IS98-105):

Expression of DNA54228 (SEQ ID NO:133) was observed in bone spicules: fetal metaphyseal bone, fetal calvarium (skull) and bone tissue in human neoplasia (osteosarcoma and chondrosarcoma). There is weak but consistent signal in small bone spicules in the metaphysis of fetal bone and in ossified spicules in a chondrosarcoma and an osteosarcoma. No signal was detected in human lung, liver, thymus, kidney, thyroid, brain, spleen, fetal tissues including adrenal, brain, cartilage, lung, liver, intestine, gonad, heart and skin.

The probes used in the above procedure were the following:

10 hmDETI-p1 (SEQ ID NO:220):

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC ACC ACC ACC CAG GAG C-3'

hmDETI-p2 (SEQ ID NO:221):

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA AAT GAA GTG GGA CGT TTG AGT-3'

DNA54228-p1 (SEQ ID NO:222):

15 5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CTT CTT TCC TTC ACC ACC ACC-3'

DNA54228-p2 (SEQ ID NO:223):

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TCT GCC TTG GCT TTT GAC AC-3'

DNA54231 (mFIZZ3):20 *IS98-070:*

DNA54231 (SEQ ID NO:139) showed a moderate signal that is specific to adipocytes. This signal was present in mesenteric fat and in interstitial fat in the neck around the trachea. The expression pattern appears to be specific for adult fat.

25 *IS98-109:*

The expression of DNA54231 (SEQ ID NO:139) was specific to adipocytes and was present wherever such cells were found which in this study included the peritoneal mesentery, perirenal fat in the renal pelvis, and the mammary fat pad. There was no expression in any other cell type in normal murine brain, liver, kidney, mammary gland, pancreas, spleen, pancreas, bone marrow, stomach, duodenum, jejunum, ileum, colon, cecum, testis, skin, or lung.

The selective distribution of this molecule to adipocytes suggests a role in either fat metabolism or the production/genesis of adipocytes, either of which is important in obesity.

The probes used for the above procedure were the following:

DNA54231-p1 (SEQ ID NO:224):

35 5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CGA GGG GGA CAG GAG CTA ATA-3'

DNA54231-p2 (SEQ ID NO:225):

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GTC CCA CGA GCC ACA GG-3'

DNA59294 (IS98-138):

WO 00/53758

PCT/US00/05841

DNA 59294 (SEQ ID NO:149) was evaluated in a panel consisting of normal adult and fetal tissues and tissues with inflammation, predominantly chronic lymphocytic inflammation. In summary, the expression was specific to muscle, certain types of smooth muscle in the adult and in skeletal and smooth muscle in the human fetus. The expression in adult human was in smooth muscle of tubular organs evaluated including colon and gall bladder. There was no expression in the smooth muscle of vessels or bronchi. No adult human skeletal muscle was evaluated. In fetal tissues there was moderate to high diffuse expression in skeletal muscle the axial skeleton and limbs. There was weak expression in the smooth muscle of the intestinal wall but no expression in cardiac muscle.

In adult tissues, the colon showed a low level of diffuse expression in the smooth muscle (tunica muscularis) in 5 specimens with chronic inflammatory bowel disease. In the gall bladder, there was weak to low level expression in the smooth muscle of the gall bladder.

In fetal human tissues, there was moderate diffuse expression in skeletal muscle and weak to low expression in smooth muscle. However expression was not detected in the fetal heart or any other fetal organ including liver, spleen, CNS, kidney, gut, lung.

The additional human tissues tested with no detectable expression included: lung with chronic granulomatous inflammation and chronic bronchitis (5 patients), peripheral nerve, prostate, heart, placenta, liver (disease multiblock including acetaminophen induced injury and cirrhosis), brain (cerebrum and cerebellum), tonsil (reactive hyperplasia), peripheral lymph node, thymus.

The probes used in the above procedure were the following:

626.p1 (SEQ ID NO:226):

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CGG AAT GGA CTG GCC TCA CAA-3'

626.p2 (SEQ ID NO:227):

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA AGG ATG GTC TCG GGC TGC TG-3'

DNA30868 (IS97-044)

DNA30868 expression was found in the following fetal tissues: spinal cord, autonomic ganglia, enteric nerves, sacral plexus, peripheral and cranial nerves.

The fetal tissues examined were the following: Placenta, umbilical cord, liver, kidney, adrenals, thyroid, lungs, heart, great vessels, esophagus, stomach, small intestine, spleen, thymus, pancreas, brain, eye, spinal cord, body wall, pelvis and lower limb.

The adult tissues examined included: Liver, kidney, adrenal, myocardium, aorta, spleen, lymph node, pancreas, lung and skin.

The probes used for the above procedure were the following:

DNA30868.p1 (C111-G):

(SEQ ID NO:304)

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AGA GAC AGG GCA AGC AGA ATG-3'

DNA30868.p2 (C111-H):

(SEQ ID NO:305)

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GAA GGG GAT GAC TGG AGG AAC-3'

DNA53517:

IS98-070:

WO 00/53758

PCT/US00/05841

DNA53517 (SEQ ID NO:255) expression in the normal adult murine lung was patchy, with expression in a subset of mucosal epithelial cell in the large airway (bronchi/bronchioles). There is also expression within the rare discrete cells in the submucosal interstitium adjacent to the large airways. These cells, typically 1-3 within a positive focus, are adjacent to large vessels and may represent smooth muscle cells, peripheral nerves or Schwann cells, or lymphatics.

In the murine adult lung with allergic inflammation (eosinophilic, lymphocytic vasculitis, bronchiolitis and pneumonitis), there was diffuse strong expression in all mucosal epithelial cells of all of the large airways (bronchi/bronchioles) of the lung. There was also strong expression in discrete cells that represent a subset of epithelial cells that line the alveoli; these cells are type II pneumocytes. There is also expression, as in normal lung, present within rare discrete cells in the submucosal interstitium adjacent to the large airways.

In normal adult murine small and large intestine, there is strong expression within multifocal few discrete single cells that are present in the submucosa, the tunica muscularis and the mesentery. The cells that express the signal are almost always associated with nerve, vein, artery triads within these areas. These cells are spindle shaped and may be either a peripheral nerves, Schwann cells associated with such nerves or some type of support cell associated with vessel or lymphatics. Interestingly, there is no expression within identifiable myenteric plexi that are present within the tunica muscularis.

In inflamed large bowel (from an IL10R KO mouse) the pattern of expression is similar but expression level is significantly decreased.

IS98-093:

The distribution of DNA53715 (SEQ ID NO:255) was further evaluated in a broad screen of normal murine tissues. In normal lung, expression is variable but when present was restricted to murine bronchial epithelial cells and type II alveolar cells in the lung. There is a marked increase in expression in these cells in inflamed lung (allergic inflammation with bronchial mucosal hypertrophy/hyperplasia: asthma model). The expression of DNA53715 (SEQ ID NO:255) in the bowel is most prominent in the colon and is present in few discrete cells within the submucosa and mucosa muscularis, the thin, well vascularized tissue layer between the muscle wall of the bowel and the mucosa proper. The exact identity of these cells has not been delineated, however, their spindloid morphology and close association to capillaries and small vessels in the submucosa suggest the following possibilities: a subset of vascular pericytes or non-myelinated nerve fibers.

The expression of DNA53715 (SEQ ID NO:255) in discrete cells in the bowel submucosa was restricted to the colon and was not seen in sections of jejunum, ileum, proximal duodenum or stomach. Expression was not detected in the following normal murine tissues: liver, kidney, spleen, bone marrow, lung, pancreas, stomach, proximal duodenum, jejunum, ileum, brain, skin, testis, or mammary glands.

It is possible that DNA53715 (SEQ ID NO:255) has a role in enhancing or stimulating mucosal immunity in the lung.

The probes used for the above procedure were the following:

DNA53517.p1 (C301-P): (SEQ ID NO:308)

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CCC AGG ATG CCA ACT TTG A-3'

DNA53517.p2 (C301-Q): (SEQ ID NO:309)

WO 00/53758

PCT/US00/05841

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA AGG AGG CCC ATC TGT TCA TAG-3'

## EXAMPLE 7

In situ Hybridization in Cells and Diseased Tissues

5 The *in situ* hybridization method of Example 6 is used to determine gene expression, analyze the tissue distribution of transcription, and follow changes in specific mRNA synthesis for the genes/DNAs and the proteins of the invention in diseased tissues isolated from human individuals suffering from a specific disease. These results show more specifically where in diseased tissues the genes of the invention are expressed and are more predictive of the particular localization of the therapeutic effect of the inhibitory or stimulatory compounds of the invention (and agonists or antagonists thereof) in a disease. Hybridization is performed according to the method of Example 6 using one or more of the following tissue and cell samples:

- 10 (a) lymphocytes and antigen presenting cells (dendritic cells, Langerhans cells, macrophages and monocytes, NK cells);
- (b) lymphoid tissues: normal and reactive lymph node, thymus, Bronchial Associated Lymphoid Tissues (BALT), Mucosal Associated Lymphoid Tissues (MALT);
- 15 (c) human disease tissues:
  - Synovium and joint of patients with Arthritis and Degenerative Joint Disease;
  - Colon from patients with Inflammatory Bowel Disease including Ulcerative Colitis and Crohn's disease;
  - 20 • Skin lesions from Psoriasis and other forms of dermatitis;
  - Lung tissue including BALT and tissue lymph nodes from chronic and acute bronchitis, pneumonia, pneumonitis, pleuritis;
  - Lung tissue including BALT and tissue lymph nodes from Asthma;
  - nasal and sinus tissue from patients with rhinitis or sinusitis;
  - 25 • Brain and Spinal cord from Multiple Sclerosis, Alzheimer's Disease and Stroke;
  - Kidney from Nephritis, Glomerulonephritis and Systemic Lupus Erythematosus;
  - Liver from Infectious and non-infectious Hepatitis and acetaminophen-induced liver cirrhosis;
  - Tissues from Neoplasms/Cancer.

30 Expression is observed in one or more cell or tissue samples indicating localization of the therapeutic effect of the compounds of the invention (and agonists or antagonists thereof) in the disease associated with the cell or tissue sample.

The sequences of the oligonucleotides used, where expression overlaps with the non-diseased tissue distribution reported earlier is recited in Example 6.

35

DNA30942:

*IS98-021*: Expression was observed in mononuclear phagocytes in the normal chimp thymus, as well as in a gastric carcinoma (1/1) colorectal cancer (1/1), breast cancer (2/5) and a lung cancer (1/4). Expressed by malignant cells in an osteosarcoma and a poorly differentiated liposarcoma. Possible signal in the malignant cells of a testicular teratoma and breast cancers (1/5). In one of the lung cancers scattered signal is seen over a

40

WO 00/53758

PCT/US00/05841

- high endothelial venule within pulmonary lymphoid tissue. The fetal tissues examined (E12-E16 weeks) included: placenta, umbilical cord, liver, kidney, adrenals, thyroid, lungs, heart, great vessels, esophagus, stomach, small intestine, spleen, thymus, pancreas, brain, eye, spinal cord, body wall, pelvis and lower limb. The adult human tissues examined included: liver, kidney, adrenal, myocardium, aorta, spleen, lung, skin, chondrosarcoma, eye, stomach, gastric carcinoma, colon, colonic carcinoma, renal cell carcinoma, prostate, bladder mucosa and gall bladder. Also examined was tissue derived from acetaminophen induced liver injury and hepatic cirrhosis. The rhesus tissues examined include: cerebral cortex (rm), hippocampus(rm). The chimp tissues examined included: thyroid, parathyroid, ovary, nerve, tongue, thymus, adrenal, gastric mucosa and salivary gland.
- 10 1598-085: Expression was observed in eight adenocarcinomas and seven squamous lung carcinomas. Actins were strongly positive in all tumors, indicating that all are suitable for *in situ* hybridization analysis. Expression of DNA30942 was observed in 6 of the tumors as follows:  
6727-95 / squamous carcinoma - Strongly expressed over neoplastic epithelium;  
9558-95 / squamous carcinoma - Expression over neoplastic epithelium;
- 15 12235-95 / adenocarcinoma - Expression over *in situ* and infiltrating tumor cells:  
6545-95 & 4187-96 / squamous carcinomas - Expression over cells in tumor stroma, no expression seen over tumor cells;  
12954-94 / squamous carcinoma - possible weak expression over stromal cells.
- 20 1599-112:  
The *in situ* expression of DNA30942 (SEQ ID NO:13) was evaluated numerous chronic inflammatory conditions and lymphoid organs. In summary, DNA30942 (SEQ ID NO:13) was strongly expressed in high endothelial venules (HEV) in the tonsil, hilar lymph node, bronchial mucosal-associated lymphoid tissue (BALT) in chronic asthma, patchy expression in colonic mucosa and weak inconsistent expression in gut-mucosal associated lymphoid tissues (GALT) HEV.
- 25 In lymphoid tissues, there was observed strong specific expression in single sections of tonsil, hilar lymph node, bronchial mucosal-associated lymphoid tissue BALT in a case of chronic asthma, and in gut mucosal associated lymphoid tissues in sections of IBD (GALT/MALT). In each of these lymphoid organs expression specifically was present in high-endothelial venules (HEV).
- 30 In tissue in a chronic asthmatic lung, additionally to expression in BALT HEVs, specific expression was observed in small capillaries lined with high or reactive swollen endothelial cells in the submucosa of inflamed bronchi. This region was not intimately associated with BALT but was specific to the submucosal site for inflammatory cell trafficking to the bronchi. There was a significant submucosal infiltrate of eosinophils in these areas. In other sections of diseased lung (COPD and chronic interstitial pneumonia) there was not any expression of DNA30942 (SEQ ID NO:13), these sections had some artifact (loss of tissue from slide).
- 35 In psoriatic tissue, there was weak expression in some small dermal capillaries in psoriatic plaques. In tonsillar tissue, additional to expression in HEVs associated with follicles, there was also strong expression within the reticulated tonsillar crypt epithelium. Expression here was also in vessels in the small intra-epithelial

WO 00/53758

PCT/US00/05841

capillaries present. Expression was also within some of the epithelial cells. This is an important immunological site and is involved with antigen presentation and may play a role in tolerance induction.

In tissue isolated from patients suffering from Crohns' Disease and ulcerative colitis, colonic expression was present in the mucosa with patchy distribution in some but not in all cases. Expression in HEV in GALT was present as a significantly weaker signal than seen in other lymphoid tissues and was not consistently present even in sections where there was strong but patchy expression in the mucosa.

In tissue isolated from acetaminophen induced liver injury and cirrhosis, there was weak expression in small capillaries within areas in the portal tracts with chronic lymphocytic inflammation.

10 DNA33460 (IS98-015):

The expression of DNA33460 (SEQ ID NO:20) was observed over cells in loose connective tissue immediately adjacent to developing extra ocular muscle in the fetal eye. Moderate expression over soft-tissue sarcoma. The fetal tissues examined (E12-E16 weeks) included: placenta, umbilical cord, liver, kidney, adrenals, thyroid, lungs, heart, great vessels, esophagus, stomach, small intestine, spleen, thymus, pancreas, brain, eye, spinal cord, body wall, pelvis and lower limb. The adult tissues examined included the liver, kidney, renal cell carcinoma, adrenal, aorta, spleen, lymph node, pancreas, lung, myocardium, skin, cerebral cortex (rm), hippocampus (rm), cerebellum (rm), bladder, prostate, stomach, gastric carcinoma, colon, colonic carcinoma, thyroid (chimp), parathyroid (chimp) ovary (chimp) and chondrosarcoma. Also examined was tissue extracted from acetaminophen induced liver injury and hepatic cirrhosis.

20 The probes used in this procedure were the following:

DNA33460-p1 (SEQ ID NO:204):

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CAG CAC TGC CGG GAT GTC AAC-3'

DNA33460-p2 (SEQ ID NO:205):

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GTT TGG GCC TCG GAG CAC TG-3'

25 DNA34387 (IS98-083):

Expression observed in lung cancer tumors and was positive in all eight squamous carcinomas and in 6/8 adenocarcinomas. Expression levels are low to moderate in the adenocarcinomas and very strong in the squamous carcinomas. No expression was seen in the tumor stroma, alveoli or normal respiratory epithelium.

30 Possible low level expression in the lymph nodes.

Expression was observed in lung cancer. The gene was amplified in Taqman analysis of a lung tumor panel. Expression was observed in eight squamous carcinomas and in 6/8 adenocarcinomas. Expression was seen in *in situ* and infiltrating components. Expression levels were low to moderate in the adenocarcinomas. In general expression was higher in the squamous carcinomas and in two the expression was strong. Possible low level expression in lymph nodes.

35 DNA35638:  
IS98-124:

This study examined the expression of DNA35638 (SEQ ID NO:35) in inflamed human tissues (psoriasis, IBD, inflamed kidney, inflamed lung, hepatitis (liver block), normal tonsil, adult and chimp



WO 00/53758

PCT/US00/05841

multiblocks) DNA35638 (SEQ ID NO:35) has been shown elsewhere in this application to have immunostimulatory (enhances T lymphocyte proliferation in the MLR and costimulation) and proinflammatory properties (induces a neutrophil infiltrate *in vivo*).

This study evaluated the differential expression of this molecule in vessels of inflamed human tissues as compared to non-inflamed tissues. In summary, expression was present in the endothelium/intima of large vessels in the lung afflicted with chronic inflammation, in the superficial dermal vessels of the psoriatic skin, in arterioles in a specimen of chronic sclerosing nephritis, and in capillaries including the perifollicular sinuses of tonsil. DNA35638 (SEQ ID NO:35) was not expressed (as detectable by this methodology) in normal skin (human foreskin specimens), normal lung, inflamed (8 IBD specimens) or normal large bowel, chronically inflamed or cirrhotic liver, normal adult cardiac tissue, or adrenal gland.

#### DNA39523:

198-052:

DNA39523 (SEQ ID NO:45) in normal human skin (neonatal foreskin) and adult psoriatic skin both exhibited specific strong expression in the epithelial cells of the stratum basale - the single layer along the basement membrane which is the progenitor for all of the overlying epidermal cells in the skin.

There was no expression in epidermal cells in the overlying layers (stratum spinosum, stratum granulosum, etc.). The intensity of the signal was slightly increased in psoriatic skin. Expression was also apparent in the dermis (the connective tissue immediately underlying the epidermis) of both normal and psoriatic skin. Expression here was most apparent in spindle shape cells within the collagen matrix - the stromal fibroblasts.

In inflamed and normal bowel: Normal human large bowel and bowel with either Crohn's disease or ulcerative colitis had specific moderate to strong expression in a multifocal pattern within the lamina propria of villi. The cells labeled by *in situ* were spindloid stromal cells best delineated as fibroblasts. There was no expression by intestinal epithelial cells and there was no apparent increased expression (intensity or frequency) in diseased bowel. Specifically there was also no correlation of expression and lesions in the inflamed bowel.

The expression of DNA39523 (SEQ ID NO:45) in the skin and specific localization to the basal epithelial cells of the epidermis suggests a potential role in differentiation/maintenance of the basal epidermal cells. This expression pattern in combination with the fact that expression occurs in cells that are directly adjacent to the basement lamina, suggests that the cells regulate trafficking of leukocytes into the epidermis. As a result DNA39523 (SEQ ID NO:45) may be a constitutively expressed signal for the trafficking of dendritic/Langerhan cells or lymphocytes into the epidermis. Such trafficking is a normal physiologic event that occurs in normal skin and is thought to be involved in immunosurveillance of the skin.

The expression of DNA39523 (SEQ ID NO:45) in inflammatory bowel disease was not increased from normal tissue, and there was no correlation of its expression to inflammatory lesions. Similarly, its expression in the basal epidermal cells in psoriatic skin lesions was equivalent to or only slightly greater than that seen in normal neonatal skin (but age-matched control adult skin was not available at the time of the study).

WO 00/53758

PCT/US00/05841

DNA45416 (IS98-140):

The expression of DNA45416 (SEQ ID NO:79) was evaluated in a variety of human and non-human primate tissues and was found to be highly specific. Expression was present only in alveolar macrophages in the lung and in Kupffer cells of the hepatic sinusoids. Expression in these cells was significantly increased when these distinct cell populations were activated. Though these two subpopulations of tissue macrophages are located in different organs, they have similar biological functions. Both types of these phagocytes act as biological filters to remove material from the blood stream or airways including pathogens, senescent cells and proteins and both are capable of secreting a wide variety of important proinflammatory cytokines.

In inflamed lung (7 patient samples) expression was prominent in reactive alveolar macrophage cell populations defined as large, pale often vacuolated cells present singly or in aggregates within alveoli and was weak to negative in normal, non-reactive macrophages (single scattered cells of normal size). Expression in alveolar macrophages was increased during inflammation when these cells were both increased in numbers and size (activated). Despite the presence of histocytes in areas of interstitial inflammation and peribronchial lymphoid hyperplasia in these tissues, expression was restricted to alveolar macrophages. Many of the inflamed lungs also had some degree of suppurative inflammation: expression was not present in neutrophilic granulocytes.

In liver, there was strong expression in reactive/activated Kupffer cells in livers with acute centrilobular necrosis (acetaminophen toxicity) or fairly marked periportal inflammation. However there was weak or no expression in Kupffer cells in normal liver or in liver with only mild inflammation or mild to moderate lobular hyperplasia/hypertrophy. Thus, as in the lung, there was increased expression in activated/reactive cells.

There was no expression of this molecule in histiocytes/macrophages present in inflamed bowel, hyperplastic/reactive tonsil or normal lymph node. The lack of expression in these tissues which all contained histiocytic inflammation or resident macrophage populations strongly supports restricted expression to the unique macrophage subset populations defined as alveolar macrophage and hepatic Kupffer cells. However, the expression of DNA45416 (SEQ ID NO:79) spleen or bone marrow was not available for evaluation.

Human tissues evaluated which had no detectable expression included: Inflammatory Bowel disease (7 patient samples with moderate to severe disease), tonsil with reactive hyperplasia, peripheral lymph node, psoriatic skin (2 patient samples with mild to moderate disease), heart, peripheral nerve. Chimp tissues evaluated which had no detectable expression included: tongue, stomach, thymus.

The probes used for the above studies were the following:

628.p1 (SEQ ID NO:212):

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CTC CAA GCC CAC AGT GAC AA-3'

628.p2 (SEQ ID NO:213):

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CCT CCA CAT TTC CTG CCA GTA-3'

DNA41374:

IS-98-077:

DNA41374 (SEQ ID NO:248) was expressed in thymic T lymphocytes

WO 00/53758

PCT/US00/05841

- Summary: In numerous tissues evaluated there expression was only detected as weak diffuse expression in thymic T lymphocytes. The limited distribution pattern suggests expression by T lymphocytes or cells closely associated with T lymphocytes such as antigen presenting cells (dendritic cell populations, etc). In inflamed human tissue with significant lymphocytic inflammation and presence of reactive follicle formation (inflammatory bowel disease and chronic lymphocytic interstitial pneumonia/bronchitis) there was no detectable expression in areas which contained significant numbers of T lymphocytes. The tissues tested for which there was no detectable expression included: human normal tissues: placenta, lung, spleen, adrenal gland, skin, kidney, eye, liver; human diseased tissue: liver disease: chronic hepatitis, chronic cholangitis, acute centrilobular necrosis (acetaminophen toxicity); Neoplasia (tumor multiblock): osteosarcoma, squamous cell carcinoma; human fetal tissues: brain, spinal cord, lung, heart, kidney, axial and limb musculoskeleton vessels, umbilical cord; non-human primate: tongue, thyroid gland, parathyroid gland, stomach, salivary gland.
- 15 DNA41374 (SEQ ID NO:248) has low level expression in non-human primate thymus and in human tonsil in T lymphocyte specific regions. The limited distribution pattern suggests expression by T lymphocytes or cells closely associated with T lymphocytes such as antigen presenting cells (dendritic cell populations, etc). In inflamed tissue with significant lymphocytic inflammation and presence of reactive follicle formation (inflammatory bowel disease and chronic lymphocytic interstitial pneumonia/bronchitis) there was no detectable expression in areas which likely contain significant numbers of T lymphocytes.
- 20 Inflamed lung: (chronic lymphocytic and granulomatous pneumonitis): weak to negative signal in the interstitium compared to the control sense probe. There was weak expression in normal chimp thymus (human thymus not available) and in human tonsil. In the latter the expression was predominantly in T lymphocyte areas of this structure including the perifollicular marginal zone and in the paracortex.
- 25 There was no detectable expression in the following human tissues: inflammatory bowel disease (8 patient specimens), chronically inflamed and normal lung (6 patient specimens), chronic sclerosing nephritis (1), chronically and acutely inflamed and cirrhotic liver (10 specimen multiblock), normal and psoriatic skin, peripheral lymph node (non-reactive).  
The probes used for the above procedures were the following:
- 30 41374.p1 (C337-G): (SEQ ID NO:306)  
5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CTC CAC AGA ACC TCG CCA TCA-3'  
41374.p2 (C337-H): (SEQ ID NO:307)  
5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TGG GGC AAG ACT CAC AAG CAG-3'
- 35 DNA53517:  
1598-070:  
DNA53517 (SEQ ID NO:255) expression in the normal adult murine lung was patchy, with expression in a subset of mucosal epithelial cell in the large airway (bronchi/bronchioles). There is also expression within the rare discrete cells in the submucosal interstitium adjacent to the large airways. These

WO 00/53758

PCT/US00/05841

cells, typically 1-3 within a positive focus, are adjacent to large vessels and may represent smooth muscle cells, peripheral nerves or Schwann cells, or lymphatics.

5 In the murine adult lung with allergic inflammation (eosinophilic, lymphocytic vasculitis, bronchiolitis and pneumonitis), there was diffuse strong expression in all mucosal epithelial cells of all of the large airways (bronchi/bronchioles) of the lung. There was also strong expression in discrete cells that represent a subset of epithelial cells that line the alveoli; these cells are type II pneumocytes. There is also expression, as in normal lung, present within rare discrete cells in the submucosal interstitium adjacent to the large airways.

10 In normal adult murine small and large intestine, there is strong expression within multifocal few discrete single cells that are present in the submucosa, the tunica muscularis and the mesentery. The cells that express the signal are almost always associated with nerve, vein, artery triads within these areas. These cells are spindle shaped and may be either a peripheral nerves, Schwann cells associated with such nerves or some type of support cell associated with vessel or lymphatics. Interestingly, there is no expression within identifiable myenteric plexi that are present within the tunica muscularis.

15 In inflamed large bowel (from an IL10R KO mouse) the pattern of expression is similar but expression level is significantly decreased.

IS98-135:

20 DNA53715 (SEQ ID NO:255, mouse FIZZ-1) was used as a detection probe in the following human tissues: gastric carcinoma, inflamed lung (3 patients) (vessels, alveoli, large airways and mucous glands), aorta, heart, placenta and gall bladder.

Expression of mouse DNA53715 (SEQ ID NO:255) was present in normal mouse lung in large airway epithelium and had marked increased expression in inflamed murine lung (airway epithelium, type II alveolar pneumocytes). It was also expressed in discrete cells in the submucosa of the large bowel along vascular channels.

DNA84210:

The following probes were used in the *in situ* studies indicated below:

84210.p1 (F-79619): (SEQ ID NO:310)

30 5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GCG GTC GCA GGA CAT TCA GTA-3'

84210.p2 (F-79620): (SEQ ID NO:311)

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ACT CTT TGG GTT CCA GCA CAC-3'

35 DNA84210 (SEQ ID NO:285) is expressed in fetal kidney, primarily in developing glomeruli and tubules of the cortical zone and also weakly in fetal lung and spinal cord. There is also expression in stromal cells adjacent to developing cartilage and bone. In adult tissues, weak expression is seen in normal bronchial epithelium, in one (adenocarcinoma) of five lung tumors (2 squamous and 3 adenocarcinomas) and in a chondrosarcoma. There is possibly expression in the skin and its appendages, however, the section is folded and difficult to evaluate.

40 IS99-102:

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Expression of DNA84210 (SEQ ID NO:285) in malignant melanoma, lung tumor, colon tumor, cell pellet, mouse tissues, fetal tissues.

Expression of DNA84210 (SEQ ID NO:285) is seen in several adult (neoplastic and non-neoplastic) and fetal tissues. As far as normal adult tissues are concerned, DNA84210 (SEQ ID NO:285) is seen in the epidermis of skin (mostly in basally located cells) and in skin appendages, such as hair follicles and sebaceous glands associated with them. Expression is also seen in bronchial epithelium and submucosal bronchial glands. In human fetal tissues, expression of DNA84210 (SEQ ID NO:285) is seen in skin and skin appendages, lung, renal cortex and pancreatic ducts. It is also seen in mesenchymal cells adjacent to developing bone and cartilage. There is no hybridization signal seen in mouse embryos. Expression of DNA84210 (SEQ ID NO:285) is seen in one of six colorectal adenocarcinomas (weak), 2 of 3 lung adenocarcinomas (one shows strong, but very focal expression, one is very weakly positive), 0 of 3 lung squamous cell carcinomas and 1 of 1 chondrosarcomas (weak). Expression is also seen in 5 of 5 malignant melanomas, the intensity of expression ranges from very weak to strong. These sections also demonstrate expression of DNA84210 (SEQ ID NO:285) in normal epidermis and skin appendages.

## EXAMPLE 8

Use of the PRO polypeptides as a hybridization probe

The following method describes use of a nucleotide sequence encoding the PRO polypeptides as a hybridization probe.

DNA comprising the coding sequence of full-length or mature PRO polypeptides is employed as a probe to screen for homologous DNAs (such as those encoding naturally-occurring variants) in human tissue cDNA libraries or human tissue genomic libraries.

Hybridization and washing of filters containing either library DNAs is performed under the following high stringency conditions. Hybridization of radiolabeled PRO - derived probe (e.g., PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727) to the filters is performed in a solution of 50% formamide, 5x SSC, 0.1% SDS, 0.1% sodium pyrophosphate, 50 mM sodium phosphate, pH 6.8, 2x Denhardt's solution, and 10% dextran sulfate at 42°C for 20 hours. Washing of the filters is performed in an aqueous solution of 0.1x SSC and 0.1% SDS at 42°C.

DNAs having a desired sequence identity with the DNA encoding full-length native sequence PRO polypeptide can then be identified using standard techniques known in the art.

## EXAMPLE 9

Expression of the PRO polypeptide in *E. coli*

This example illustrates preparation of an unglycosylated form of the PRO polypeptides by

WO 00/53758

PCT/US00/05841

recombinant expression in *E. coli*.

The DNA sequence encoding the PRO polypeptide is initially amplified using selected PCR primers. The primers should contain restriction enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector. A variety of expression vectors may be employed. An example of a suitable vector is pBR322 (derived from *E. coli*; see Bolivar *et al.*, *Gene*, 2:95 (1977)) which contains genes for ampicillin and tetracycline resistance. The vector is digested with restriction enzyme and dephosphorylated. The PCR amplified sequences are then ligated into the vector. The vector will preferably include sequences which encode for an antibiotic resistance gene, a trp promoter, a polyhis leader (including the first six STII codons, polyhis sequence, and enterokinase cleavage site), the PRO polypeptide coding region, lambda transcriptional terminator, and an argU gene.

The ligation mixture is then used to transform a selected *E. coli* strain using the methods described in Sambrook *et al.*, *supra*. Transformants are identified by their ability to grow on LB plates and antibiotic resistant colonies are then selected. Plasmid DNA can be isolated and confirmed by restriction analysis and DNA sequencing.

Selected clones can be grown overnight in liquid culture medium such as LB broth supplemented with antibiotics. The overnight culture may subsequently be used to inoculate a larger scale culture. The cells are then grown to a desired optical density, during which the expression promoter is turned on.

After culturing the cells for several more hours, the cells can be harvested by centrifugation. The cell pellet obtained by the centrifugation can be solubilized using various agents known in the art, and the solubilized PRO polypeptide protein can then be purified using a metal chelating column under conditions that allow tight binding of the protein.

The PRO polypeptides may also be expressed in *E. coli* in a poly-His tagged form, using the following procedure. The DNA encoding a PRO polypeptide is initially amplified using selected PCR primers. The primers contain restriction enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector, and other useful sequences providing for efficient and reliable translation initiation, rapid purification on a metal chelation column, and proteolytic removal with enterokinase. The PCR-amplified, poly-His tagged sequences are then ligated into an expression vector, which is used to transform an *E. coli* host based on strain 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq). Transformants are first grown in LB containing 50 mg/ml carbenicillin at 30°C with shaking until an O.D.600 of 3-5 is reached. Cultures are then diluted 50-100 fold into CRAP media (prepared by mixing 3.57 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.71 g sodium citrate·2H<sub>2</sub>O, 1.07 g KCl, 5.36 g Difco yeast extract, 5.36 g Sheffield hycase SF in 500 mL water, as well as 110 mM MPOS, pH 7.3, 0.55% (w/v) glucose and 7 mM MgSO<sub>4</sub>) and grown for approximately 20-30 hours at 30°C with shaking. Samples are removed to verify expression by SDS-PAGE analysis, and the bulk culture is centrifuged to pellet the cells. Cell pellets are frozen until purification and refolding.

*E. coli* paste from 0.5 to 1 L fermentations (6-10 g pellets) is resuspended in 10 volumes (w/v) in 7 M guanidine, 20 mM Tris, pH 8 buffer. Solid sodium sulfite and sodium tetrathionate is added to make final concentrations of 0.1M and 0.02 M, respectively, and the solution is stirred overnight at 4°C. This step results in a denatured protein with all cysteine residues blocked by sulfonolization. The solution is centrifuged at 40,000 rpm in a Beckman Ultracentrifuge for 30 min. The supernatant is diluted with 3-5 volumes of metal chelate column buffer (6 M guanidine, 20 mM Tris, pH 7.4) and filtered through 0.22 micron filters to clarify.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Depending on condition the clarified extract is loaded onto a 5 ml Qiagen Ni-NTA metal chelate column equilibrated in the metal chelate column buffer. The column is washed with additional buffer containing 50 mM imidazole (Calbiochem, Ultrapure grade), pH 7.4. The protein is eluted with buffer containing 250 mM imidazole. Fractions containing the desired protein was pooled and stored at 4°C. Protein concentration is estimated by its absorbance at 280 nm using the calculated extinction coefficient based on its amino acid sequence.

The proteins are refolded by diluting sample slowly into freshly prepared refolding buffer consisting of: 20 mM Tris, pH 8.6, 0.3 M NaCl, 2.5 M urea, 5 mM cysteine, 20 mM glycine and 1 mM EDTA. Refolding volumes are chosen so that the final protein concentration is between 50 to 100 micrograms/ml. The refolding solution is stirred gently at 4°C for 12-36 hours. The refolding reaction is quenched by the addition of TFA to a final concentration of 0.4% (pH of approximately 3). Before further purification of the protein, the solution is filtered through a 0.22 micron filter and acetonitrile is added to 2-10% final concentration. The refolded protein is chromatographed on a Poros R1/H reversed phase column using a mobile buffer of 0.1% TFA with elution with a gradient of acetonitrile from 10 to 80%. Aliquots of fractions with A280 absorbance are analyzed on SDS polyacrylamide gels and fractions containing homogeneous refolded protein are pooled. Generally, the properly refolded species of most proteins are eluted at the lowest concentrations of acetonitrile since those species are the most compact with their hydrophobic interiors shielded from interaction with the reversed phase resin. Aggregated species are usually eluted at higher acetonitrile concentrations. In addition to resolving misfolded forms of proteins from the desired form, the reversed phase step also removes endotoxin from the samples.

Fractions containing the desired folded PRO polypeptide proteins are pooled and the acetonitrile removed using a gentle stream of nitrogen directed at the solution. Proteins are formulated into 20 mM HEPES, pH 6.8 with 0.14 M sodium chloride and 4% mannitol by dialysis or by gel filtration using G25 Superfine (Pharmacia) resins equilibrated in the formulation buffer and sterile filtered.

## EXAMPLE 10

Expression of the PRO polypeptides in mammalian cells

This example illustrates preparation of a potentially glycosylated form of the PRO polypeptide in recombinant expression in mammalian cells.

The vector, pRK5 (see EP 307,247, published March 15, 1989), is employed as the expression vector. Optionally, the PRO DNA is ligated into pRK5 with selected restriction enzymes to allow insertion of the respective PRO DNA using ligation methods such as described in Sambrook *et al.*, *supra*. The resulting vector is called, for example, pRK5-PRO.

In one embodiment, the selected host cells may be 293 cells. Human 293 cells (ATCC CCL 1573) are grown to confluence in tissue culture plates in medium such as DMEM supplemented with fetal calf serum and optionally, nutrient components and/or antibiotics. About 10 µg of the pRK5-PRO DNA is mixed with about 1 µg DNA encoding the VARNA gene [Thimmapaya *et al.*, *Cell*, 31:543 (1982)] and dissolved in 500 µL of 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.227 M CaCl<sub>2</sub>. To this mixture is added, dropwise, 500 µL of 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM NaPO<sub>4</sub>, and a precipitate is allowed to form for 10 minutes at 25°C. The precipitate is suspended and added to the 293 cells and allowed to settle for about four hours at 37°C. The

WO 00/53758

PCT/US00/05841

culture medium is aspirated off and 2 ml of 20% glycerol in PBS is added for 30 seconds. The 293 cells are then washed with serum free medium, fresh medium is added and the cells are incubated for about 5 days.

Approximately 24 hours after the transfections, the culture medium is removed and replaced with culture medium (alone) or culture medium containing 200 uCi/ml  $^{35}\text{S}$ -cysteine and 200 uCi/ml  $^{35}\text{S}$ -methionine.

5 After a 12 hour incubation, the conditioned medium is collected, concentrated on a spin filter, and loaded onto a 15% SDS gel. The processed gel may be dried and exposed to film for a selected period of time to reveal the presence of the polypeptide of the invention polypeptide. The cultures containing transfected cells may undergo further incubation (in serum free medium) and the medium is tested in selected bioassays.

10 In an alternative technique, pRK5-PRO may be introduced into 293 cells transiently using the dextran sulfate method described by Sompayrac *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12:7575 (1981). 293 cells are grown to maximal density in a spinner flask and 700  $\mu\text{g}$  pRK5-PRO is added. The cells are first concentrated from the spinner flask by centrifugation and washed with PBS. The DNA-dextran precipitate is incubated on the cell pellet for four hours. The cells are treated with 20% glycerol for 90 seconds, washed with tissue culture medium, and re-introduced into the spinner flask containing tissue culture medium, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bovine insulin and 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bovine transferrin. After about four days, the conditioned media is centrifuged and filtered to remove cells and debris. The sample containing the expressed polypeptide of the invention can then be concentrated and purified by any selected method, such as dialysis and/or column chromatography.

20 In another embodiment, the polypeptides of the invention can be expressed in CHO cells. The pRK5-PRO can be transfected into CHO cells using known reagents such as  $\text{CaPO}_4$  or DEAE-dextran. As described above, the cell cultures can be incubated, and the medium replaced with culture medium (alone) or medium containing a radiolabel such as  $^{35}\text{S}$ -methionine. After determining the presence of a polypeptide of the invention polypeptide, the culture medium may be replaced with serum free medium. Preferably, the cultures are incubated for about 6 days, and then the conditioned medium is harvested. The medium containing the expressed polypeptide of the invention can then be concentrated and purified by any selected method.

25 Epitope-tagged polypeptide of the invention may also be expressed in host CHO cells. The DNA encoding the desired polypeptide of the invention may be subcloned out of the pRK5 vector. The subclone insert can undergo PCR to fuse in frame with a selected epitope tag such as a poly-his tag into a Baculovirus expression vector. The poly-his tagged polypeptide of the invention insert can then be subcloned into a SV40 driven vector containing a selection marker such as DHFR for selection of stable clones. Finally, the CHO cells can be transfected (as described above) with the SV40 driven vector. Labeling may be performed, as described above, to verify expression. The culture medium containing the expressed poly-His tagged polypeptide of the invention can then be concentrated and purified by any selected method, such as by  $\text{Ni}^{2+}$ -chelate affinity chromatography.



WO 00/53758

PCT/US00/05841

## EXAMPLE 11

Expression of PRO in Yeast

The following method describes recombinant expression of PRO in yeast.

First, yeast expression vectors are constructed for intracellular production or secretion of the PRO polypeptide from the ADH2/GAPDH promoter. DNA encoding a polypeptide of the invention and the promoter is inserted into suitable restriction enzyme sites in the selected plasmid to direct intracellular expression of the PRO. For secretion, DNA encoding the PRO can be cloned into the selected plasmid, together with DNA encoding the ADH2/GAPDH promoter, a native sequence PRO signal peptide or other mammalian signal peptide, or, for example, a yeast alpha-factor or invertase secretory signal/leader sequence, and linker sequences (if needed) for expression of the polypeptide of the invention.

Yeast cells, such as yeast strain AB110, can then be transformed with the expression plasmids described above and cultured in selected fermentation media. The transformed yeast supernatants can be analyzed by precipitation with 10% trichloroacetic acid and separation by SDS-PAGE, followed by staining of the gels with Coomassie Blue stain.

Recombinant PRO can subsequently be isolated and purified by removing the yeast cells from the fermentation medium by centrifugation and then concentrating the medium using selected cartridge filters. The concentrate containing the polypeptide of the invention may further be purified using selected column chromatography resins.

## EXAMPLE 12

Expression of PRO in Baculovirus-Infected Insect Cells

The following method describes recombinant expression of PRO in Baculovirus-infected insect cells.

The sequence coding for PRO is fused upstream of an epitope tag contained within a baculovirus expression vector. Such epitope tags include poly-his tags and immunoglobulin tags (like Fc regions of IgG). A variety of plasmids may be employed, including plasmids derived from commercially available plasmids such as pVL1393 (Novagen). Briefly, the sequence encoding a polypeptide of the invention or the desired portion of the coding sequence of the DNA encoding a PRO polypeptide [such as the sequence encoding the extracellular domain of a transmembrane protein or the sequence encoding the mature protein if the protein is extracellular] is amplified by PCR with primers complementary to the 5' and 3' regions. The 5' primer may incorporate flanking (selected) restriction enzyme sites. The product is then digested with those selected restriction enzymes and subcloned into the expression vector.

Recombinant baculovirus is generated by co-transfecting the above plasmid and BaculoGold™ virus DNA (Pharmingen) into *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") cells (ATCC CRL 1711) using lipofectin (commercially available from GIBCO-BRL). After 4 - 5 days of incubation at 28°C, the released viruses are harvested and used for further amplifications. Viral infection and protein expression are performed as described by O'Reilly *et al.*, *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994).

Expressed poly-his tagged polypeptide of the invention can then be purified, for example, by Ni<sup>2+</sup>-chelate affinity chromatography as follows. Extracts are prepared from recombinant virus-infected Sf9 cells as described by Rupert *et al.*, *Nature*, 362:175-179 (1993). Briefly, Sf9 cells are washed, resuspended in

WO 00/53758

PCT/US00/05841

sonication buffer (25 mL Hepes, pH 7.9; 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1 mM EDTA; 10% glycerol; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl), and sonicated twice for 20 seconds on ice. The sonicates are cleared by centrifugation, and the supernatant is diluted 50-fold in loading buffer (50 mM phosphate, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 7.8) and filtered through a 0.45 µm filter. A Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose column (commercially available from Qiagen) is prepared with a bed volume of 5 mL, washed with 25 mL of water and equilibrated with 25 mL of loading buffer. The filtered cell extract is loaded onto the column at 0.5 mL per minute. The column is washed to baseline A<sub>280</sub> with loading buffer, at which point fraction collection is started. Next, the column is washed with a secondary wash buffer (50 mM phosphate; 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 6.0), which elutes nonspecifically bound protein. After reaching A<sub>280</sub> baseline again, the column is developed with a 0 to 500 mM Imidazole gradient in the secondary wash buffer. One mL fractions are collected and analyzed by SDS-PAGE and silver staining or Western blot with Ni<sup>2+</sup>-NTA-conjugated to alkaline phosphatase (Qiagen). Fractions containing the eluted His<sub>6</sub>-tagged polypeptide of the invention are pooled and dialyzed against loading buffer.

Alternatively, purification of the IgG tagged (or Fc tagged) PRO polypeptide can be performed using known chromatography techniques, including for instance, Protein A or protein G column chromatography.

## EXAMPLE 13

Preparation of Antibodies that Bind PRO

This example illustrates preparation of monoclonal antibodies which can specifically bind the polypeptides of the invention.

Techniques for producing the monoclonal antibodies are known in the art and are described, for instance, in Goding, *supra*. Immunogens that may be employed include the purified polypeptide of the invention itself, fusion proteins containing the respective polypeptide of the invention, and cells expressing recombinant polypeptide of the invention on the cell surface. Selection of the immunogen can be made by the skilled artisan without undue experimentation.

Mice, such as Balb/c, are immunized with the polypeptide of the invention immunogen emulsified in complete Freund's adjuvant and injected subcutaneously or intraperitoneally in an amount from 1-100 micrograms. Alternatively, the immunogen is emulsified in MPL-TDM adjuvant (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) and injected into the animal's hind foot pads. The immunized mice are then boosted 10 to 12 days later with additional immunogen emulsified in the selected adjuvant. Thereafter, for several weeks, the mice may also be boosted with additional immunization injections. Serum samples may be periodically obtained from the mice by retro-orbital bleeding for testing in ELISA assays to detect antibodies specific to the respective polypeptide of the invention.

After a suitable antibody titer has been detected, the animals "positive" for antibodies can be injected with a final intravenous injection of the respective polypeptide of the invention. Three to four days later, the mice are sacrificed and the spleen cells are harvested. The spleen cells are then fused (using 35% polyethylene glycol) to a selected murine myeloma cell line such as P3X63AgU.1, available from ATCC, No. CRL 1597. The fusions generate hybridoma cells which can then be plated in 96 well tissue culture plates containing HAT (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine) medium to inhibit proliferation of non-fused cells, myeloma hybrids, and spleen cell hybrids.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

The hybridoma cells are screened in an ELISA for reactivity against the respective polypeptide of the invention. Determination of "positive" hybridoma cells secreting the desired monoclonal antibodies against the polypeptides of the invention is within the skill in the art.

The positive hybridoma cells can be injected intraperitoneally into syngeneic Balb/c mice to produce ascites containing the anti-PRO200, anti-PRO204, anti-PRO212, anti-PRO216, anti-PRO226, anti-PRO240, anti-PRO235, anti-PRO245, anti-PRO172, anti-PRO273, anti-PRO272, anti-PRO332, anti-PRO526, anti-PRO701, anti-PRO361, anti-PRO362, anti-PRO363, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO531, anti-PRO533, anti-PRO1083, anti-PRO865, anti-PRO770, anti-PRO769, anti-PRO788, anti-PRO1114, anti-PRO1007, anti-PRO1184, anti-PRO1031, anti-PRO1346, anti-PRO1155, anti-PRO1250, anti-PRO1312, anti-PRO1192, anti-PRO1246, anti-PRO1283, anti-PRO1195, anti-PRO1343, anti-PRO1418, anti-PRO1387, anti-PRO1410, anti-PRO1917, anti-PRO1868, anti-PRO205, anti-PRO21, anti-PRO269, anti-PRO344, anti-PRO333, anti-PRO381, anti-PRO720, anti-PRO866, anti-PRO840, anti-PRO982, anti-PRO836, anti-PRO1159, anti-PRO1358, anti-PRO1325, anti-PRO1338, anti-PRO1434, anti-PRO4333, anti-PRO4302, anti-PRO4430 or anti-PRO5727 monoclonal antibodies. Alternatively, the hybridoma cells can be grown in tissue culture flasks or roller bottles. Purification of the monoclonal antibodies produced in the ascites can be accomplished using ammonium sulfate precipitation, followed by gel exclusion chromatography. Alternatively, affinity chromatography based upon binding of antibody to protein A or protein G can be employed.

#### Deposit of Material

The following materials have been deposited with the American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

| Material      | UNQ | PRO | ATCC # | ATCC Deposit Date  |
|---------------|-----|-----|--------|--------------------|
| DNA29101-1276 | 174 | 200 | 209653 | March 5, 1998      |
| DNA30871-1157 | 178 | 204 | 209380 | October 16, 1997   |
| DNA30942-1154 | 186 | 212 | 209254 | September 16, 1997 |
| DNA33087-1158 | 190 | 216 | 209381 | October 16, 1997   |
| DNA33460-1166 | 200 | 226 | 209376 | October 16, 1997   |
| DNA34387-1133 | 214 | 240 | 209260 | September 16, 1997 |
| DNA35558-1167 | 209 | 235 | 209374 | October 16, 1997   |
| DNA35638-1141 | 219 | 245 | 209265 | September 16, 1997 |
| DNA35916-1161 | 146 | 172 | 209419 | October 28, 1997   |
| DNA39523-1192 | 240 | 273 | 209424 | October 31, 1997   |
| DNA40620-1183 | 239 | 272 | 209388 | October 17, 1997   |
| DNA40982-1235 | 293 | 332 | 209433 | November 17, 1997  |
| DNA44184-1319 | 330 | 526 | 209704 | March 26, 1998     |
| DNA44205-1285 | 365 | 701 | 209720 | March 31, 1998     |
| DNA45410-1250 | 316 | 361 | 209621 | February 5, 1998   |
| DNA45416-1251 | 317 | 362 | 209620 | February 5, 1998   |
| DNA45419-1252 | 318 | 363 | 209616 | February 5, 1998   |

WO 00/53758

PCT/US00/05841

|    |               |     |      |        |                    |
|----|---------------|-----|------|--------|--------------------|
|    | DNA47365-1206 | 319 | 364  | 209436 | November 7, 1997   |
|    | DNA47470-1130 | 313 | 356  | 209422 | October 28, 1997   |
|    | DNA48314-1320 | 332 | 531  | 209702 | March 26, 1998     |
|    | DNA49435-1219 | 334 | 533  | 209480 | November 21, 1997  |
| 5  | DNA50921-1458 | 540 | 1083 | 209859 | May 12, 1998       |
|    | DNA53974-1401 | 434 | 865  | 209774 | April 14, 1998     |
|    | DNA54228-1366 | 408 | 770  | 209801 | April 23, 1998     |
|    | DNA54231-1366 | 407 | 769  | 209802 | April 23, 1998     |
|    | DNA56405-1357 | 430 | 788  | 209849 | May 6, 1998        |
| 10 | DNA57033-1403 | 557 | 1114 | 209905 | May 27, 1998       |
|    | DNA57690-1374 | 491 | 1007 | 209950 | June 9, 1998       |
|    | DNA59220-1514 | 598 | 1184 | 209962 | June 9, 1998       |
|    | DNA59294-1381 | 516 | 1031 | 209866 | May 14, 1998       |
|    | DNA59776-1600 | 701 | 1346 | 203128 | August 18, 1998    |
| 15 | DNA59849-1504 | 585 | 1155 | 209986 | June 16, 1998      |
|    | DNA60775-1532 | 633 | 1250 | 203173 | September 1, 1998  |
|    | DNA61873-1574 | 678 | 1312 | 203132 | August 18, 1998    |
|    | DNA62814-1521 | 606 | 1192 | 203093 | August 4, 1998     |
|    | DNA64885-1529 | 630 | 1246 | 203457 | November 3, 1998   |
| 20 | DNA65404-1551 | 653 | 1283 | 203244 | September 9, 1998  |
|    | DNA65412-1523 | 608 | 1195 | 203094 | August 4, 1998     |
|    | DNA66675-1587 | 698 | 1343 | 203282 | September 22, 1998 |
|    | DNA68864-1629 | 732 | 1418 | 203276 | September 22, 1998 |
|    | DNA68872-1620 | 722 | 1387 | 203160 | August 25, 1998    |
| 25 | DNA68874-1622 | 728 | 1410 | 203277 | September 22, 1998 |
|    | DNA76400-2528 | 900 | 1917 | 203573 | January 12, 1999   |
|    | DNA77624-2515 | 859 | 1868 | 203553 | December 22, 1998  |
|    | DNA30868-1156 | 179 | 205  | -----  | March 2, 2000      |
|    | DNA36638-1056 | 21  | 21   | 209456 | November 12, 1997  |
| 30 | DNA38260-1180 | 236 | 269  | 209397 | October 17, 1997   |
|    | DNA40592-1242 | 303 | 344  | 209492 | November 21, 1997  |
|    | DNA41374-1312 | 294 | 333  | -----  | -----              |
|    | DNA44194-1317 | 322 | 381  | 209808 | April 28, 1998     |
|    | DNA53517-1366 | 388 | 720  | 209802 | April 23, 1998     |
| 35 | DNA53971-1359 | 435 | 866  | 209750 | April 7, 1998      |
|    | DNA53987-1438 | 433 | 840  | 209858 | May 12, 1998       |
|    | DNA57700-1408 | 483 | 982  | 203583 | January 12, 1999   |
|    | DNA59620-1463 | 545 | 836  | 209989 | June 16, 1998      |
|    | DNA60627-1508 | 589 | 1159 | 203092 | August 4, 1998     |
| 40 | DNA64890-1612 | 707 | 1358 | 203131 | August 18, 1998    |

WO 00/53758

PCT/US00/05841

|   |               |      |      |        |                    |
|---|---------------|------|------|--------|--------------------|
|   | DNA66659-1593 | 685  | 1325 | 203269 | September 22, 1998 |
|   | DNA66667-1596 | 693  | 1338 | 203267 | September 22, 1998 |
|   | DNA68818-2536 | 739  | 1434 | 203657 | February 9, 1999   |
|   | DNA84210-2576 | 1888 | 4333 | 203818 | March 2, 1999      |
| 5 | DNA92218-2554 | 1866 | 4302 | 203834 | March 9, 1999      |
|   | DNA96878-2626 | 1947 | 4430 | 23-PTA | May 5, 1999        |
|   | DNA98853-1739 | 2448 | 5727 | 203906 | April 6, 1999      |

These deposits was made under the provisions of the Budapest Treaty on the International  
 10 Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations  
 thereunder (Budapest Treaty). This assures maintenance of a viable culture of the deposit for 30 years from the  
 date of deposit. The deposit will be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and  
 subject to an agreement between Genentech, Inc. and ATCC, which assures permanent and unrestricted  
 availability of the progeny of the culture of the deposit to the public upon issuance of the pertinent U.S. patent  
 15 or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures  
 availability of the progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be  
 entitled thereto according to 35 USC 122 and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 CFR  
 1.14 with particular reference to 886 OG 638).

The assignee of the present application has agreed that if a culture of the materials on deposit should  
 20 die or be lost or destroyed when cultivated under suitable conditions, the materials will be promptly replaced  
 on notification with another of the same. Availability of the deposited material is not to be construed as a  
 license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in  
 accordance with its patent laws.

The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to  
 25 practice the invention. The present invention is not to be limited in scope by the construct deposited, since the  
 deposited embodiment is intended as a single illustration of certain aspects of the invention and any constructs  
 that are functionally equivalent are within the scope of this invention. The deposit of material herein does not  
 constitute an admission that the written description herein contained is inadequate to enable the practice of any  
 aspect of the invention, including the best mode thereof, nor is it to be construed as limiting the scope of the  
 30 claims to the specific illustrations that it represents. Indeed, various modifications of the invention in addition  
 to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing  
 description and fall within the scope of the appended claims.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

What is claimed:

1. A composition useful for the treatment of immune related diseases, comprising a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727 polypeptide, agonist or fragment thereof and a carrier or excipient, having the properties of:
  - (a) increasing infiltration of inflammatory cells into a tissue of a mammal in need thereof,
  - (b) stimulating or enhancing an immune response in a mammal in need thereof, or
  - (c) increasing the proliferation of T-lymphocytes in a mammal in need thereof in response to an antigen.
2. The composition of claim 1 comprising an effective amount of a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727 polypeptide, agonist, antagonist or fragment thereof.
3. The composition of claim 2 further comprising a growth inhibitory agent, cytotoxic agent or chemotherapeutic agent.
4. Use of a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727 polypeptide, agonist or a fragment thereof to prepare a composition having the properties of:
  - (a) increasing infiltration of inflammatory cells into a tissue of a mammal in need thereof,
  - (b) stimulating or enhancing an immune response in a mammal in need thereof, or
  - (c) increasing the proliferation of T-lymphocytes in a mammal in need thereof in response to an antigen.
5. The use of claims 4 comprising an effective amount of a PRO200, PRO204, PRO212,

WO 00/53758

PCT/US00/05841

- PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430, PRO5727 polypeptide, agonist, antagonist or fragment thereof.
6. The composition of claim 2 further comprising a growth inhibitory agent, cytotoxic agent or chemotherapeutic agent.
7. A method of treating an immune related disorder, such as a T cell mediated disorder, in a mammal in need thereof, comprising administering to the mammal an effective amount of a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727 polypeptide, an agonist antibody thereof, an antagonist antibody thereto, or a fragment thereof.
8. The method of claim 7, wherein the disorder is selected from systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, juvenile chronic arthritis, spondyloarthropathies, systemic sclerosis, idiopathic inflammatory myopathies, Sjögren's syndrome, systemic vasculitis, sarcoidosis, autoimmune hemolytic anemia, autoimmune thrombocytopenia, thyroiditis, diabetes mellitus, immune-mediated renal disease, demyelinating diseases of the central and peripheral nervous systems such as multiple sclerosis, idiopathic demyelinating polyneuropathy or Guillain-Barre syndrome, and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, hepatobiliary diseases such as infectious, autoimmune chronic active hepatitis, primary biliary cirrhosis, granulomatous hepatitis, and sclerosing cholangitis, inflammatory bowel disease, gluten-sensitive enteropathy, and Whipple's disease, autoimmune or immune-mediated skin diseases including bullous skin diseases, erythema multiforme and contact dermatitis, psoriasis, allergic diseases such as asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, food hypersensitivity and urticaria, immunologic diseases of the lung such as eosinophilic pneumonias, idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis, transplantation associated diseases including graft rejection and graft-versus-host-disease.
9. The composition or use of any of the preceding claims, wherein the agonist or antagonist is a monoclonal antibody.
10. The composition or use of any of the preceding claims, wherein the agonist or antagonist is an antibody fragment or a single-chain antibody.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

11. The composition or use of claims 9 or 10, wherein the antibody has nonhuman complementarity determining region (CDR) residues and human framework region (FR) residues.

5 12. A method for determining the presence of a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, 10 PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430, PRO5727 polypeptide, comprising exposing a cell suspected of containing the polypeptide to an anti- PRO200, anti-PRO204, anti-PRO212, anti-PRO216, anti-PRO226, anti-PRO240, anti-PRO235, anti-PRO245, anti-PRO172, anti-PRO273, anti-PRO272, anti-PRO332, anti-PRO326, anti-PRO701, anti-PRO361, anti-PRO362, anti-PRO363, anti-PRO364, anti-PRO356, anti- 15 PRO531, anti-PRO533, anti-PRO1083, anti-PRO865, anti-PRO770, anti-PRO769, anti-PRO788, anti-PRO1114, anti-PRO1007, anti-PRO1184, anti-PRO1031, anti-PRO1346, anti-PRO1155, anti-PRO1250, anti-PRO1312, anti-PRO1192, anti-PRO1246, anti-PRO1283, anti-PRO1195, anti-PRO1343, anti-PRO1418, anti-PRO1357, anti-PRO1410, anti-PRO1917, anti-PRO1868, anti-PRO205, anti-PRO21, anti-PRO269, anti-PRO344, anti-PRO333, anti-PRO381, anti-PRO720, anti-PRO866, anti-PRO840, anti-PRO982, anti-PRO836, 20 anti-PRO1159, anti-PRO1358, anti-PRO1325, anti-PRO1338, anti-PRO1434, anti-PRO4333, anti-PRO4302, anti-PRO4430, anti-PRO5727 antibody, respectively, and determining binding of the antibody to the cell.

13. A method of diagnosing an immune related disease in a mammal, comprising detecting the level of expression of a gene encoding a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, 25 PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, 30 PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727 polypeptide (a) in a test sample of tissue cells obtained from the mammal, and (b) in a control sample of known normal tissue cells of the same cell type, wherein a higher or lower expression level in the test sample as compared to the control indicates the presence of immune related disease in the mammal from which the test tissue cells were obtained.

14. A method of diagnosing an immune related disease in a mammal, comprising (a) contacting 35 an anti-PRO200, anti-PRO204, anti-PRO212, anti-PRO216, anti-PRO226, anti-PRO240, anti-PRO235, anti-PRO245, anti-PRO172, anti-PRO273, anti-PRO272, anti-PRO332, anti-PRO526, anti-PRO701, anti-PRO361, anti-PRO362, anti-PRO363, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO531, anti-PRO533, anti-PRO1083, anti-PRO865, anti-PRO770, anti-PRO769, anti-PRO788, anti-PRO1114, anti-PRO1007, anti-PRO1184, anti- 40 PRO1031, anti-PRO1346, anti-PRO1155, anti-PRO1250, anti-PRO1312, anti-PRO1192, anti-PRO1246, anti-



WO 00/53758

PCT/US00/05841

PRO1283, anti-PRO1195, anti-PRO1343, anti-PRO1418, anti-PRO1387, anti-PRO1410, anti-PRO1917, anti-PRO1868, anti-PRO205, anti-PRO21, anti-PRO269, anti-PRO344, anti-PRO333, anti-PRO381, anti-PRO720, anti-PRO866, anti-PRO840, anti-PRO982, anti-PRO836, anti-PRO1159, anti-PRO1358, anti-PRO1325, anti-PRO1338, anti-PRO1434, anti-PRO4333, anti-PRO4302, anti-PRO4430 or anti-PRO5727 antibody with a test sample of tissue cells obtained from the mammal, and (b) detecting the formation of a complex between the antibody and the polypeptide in the test sample.

15. An immune related disease diagnostic kit, comprising an anti-PRO200, anti-PRO204, anti-PRO212, anti-PRO216, anti-PRO226, anti-PRO240, anti-PRO235, anti-PRO245, anti-PRO172, anti-PRO273, anti-PRO272, anti-PRO332, anti-PRO526, anti-PRO701, anti-PRO361, anti-PRO362, anti-PRO363, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO531, anti-PRO533, anti-PRO1083, anti-PRO865, anti-PRO770, anti-PRO769, anti-PRO788, anti-PRO1114, anti-PRO1007, anti-PRO1184, anti-PRO1031, anti-PRO1346, anti-PRO1155, anti-PRO1250, anti-PRO1312, anti-PRO1192, anti-PRO1246, anti-PRO1283, anti-PRO1195, anti-PRO1343, anti-PRO1418, anti-PRO1387, anti-PRO1410, anti-PRO1917, anti-PRO1868, anti-PRO205, anti-PRO21, anti-PRO269, anti-PRO344, anti-PRO333, anti-PRO381, anti-PRO720, anti-PRO866, anti-PRO840, anti-PRO982, anti-PRO836, anti-PRO1159, anti-PRO1358, anti-PRO1325, anti-PRO1338, anti-PRO1434, anti-PRO4333, anti-PRO4302, anti-PRO4430 or anti-PRO5727 antibody or fragment thereof and a carrier in suitable packaging.

16. The kit of claim 15, further comprising instructions for using the antibody to detect a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727 polypeptide.

17. An article of manufacture, comprising:  
a container;  
an instruction on the container; and  
a composition comprising an active agent contained within the container; wherein the composition is effective for inhibiting or reducing an immune response in a mammal, the instruction on the container indicates that the composition can be used for treating an immune related disease, and the active agent in the composition is an agent inhibiting the expression and/or activity of a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358,

WO 00/53758

PCT/US00/05841

PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727 polypeptide.

18. The article of manufacture of claim 17 wherein said active agent is an anti-PRO200, anti-PRO204, anti-PRO212, anti-PRO216, anti-PRO226, anti-PRO240, anti-PRO235, anti-PRO245, anti-PRO172, anti-PRO273, anti-PRO272, anti-PRO332, anti-PRO526, anti-PRO701, anti-PRO361, anti-PRO362, anti-PRO363, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO531, anti-PRO533, anti-PRO1083, anti-PRO865, anti-PRO770, anti-PRO769, anti-PRO788, anti-PRO1114, anti-PRO1007, anti-PRO1184, anti-PRO1031, anti-PRO1346, anti-PRO1155, anti-PRO1250, anti-PRO1312, anti-PRO1192, anti-PRO1246, anti-PRO1283, anti-PRO1195, anti-PRO1343, anti-PRO1418, anti-PRO1387, anti-PRO1410, anti-PRO1917, anti-PRO1868, anti-PRO205, anti-PRO21, anti-PRO269, anti-PRO344, anti-PRO333, anti-PRO381, anti-PRO720, anti-PRO866, anti-PRO840, anti-PRO982, anti-PRO836, anti-PRO1159, anti-PRO1358, anti-PRO1325, anti-PRO1338, anti-PRO1434, anti-PRO4333, anti-PRO4302, anti-PRO4430 or anti-PRO5727 antibody.

19. A method for identifying a compound capable of inhibiting the expression or activity of a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727 polypeptide, comprising contacting a candidate compound with the polypeptide under conditions and for a time sufficient to allow these two components to interact.

20. The method of claim 19, wherein the candidate compound or the PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727 polypeptide is immobilized on a solid support.

21. The method of claim 20, wherein the non-immobilized component carries a detectable label.

22. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to a nucleotide sequence that encodes an amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 3 (SEQ ID NO:11), Figure 5 (SEQ ID NO:13), Figure 7 (SEQ ID NO:18), Figure 9 (SEQ ID NO:20), Figure 11 (SEQ ID NO:25), Figure 13 (SEQ ID NO:30), Figure 15 (SEQ ID NO:35), Figure 17 (SEQ ID NO:40), Figure 19 (SEQ ID NO:45), Figure 21 (SEQ ID NO:50), Figure 23 (SEQ ID NO:56), Figure 25 (SEQ ID NO:61), Figure 27 (SEQ ID NO:66), Figure 29 (SEQ ID NO:71), Figure

WO 00/53758

PCT/US00/05841

31 (SEQ ID NO:79), Figure 33 (SEQ ID NO:86), Figure 35 (SEQ ID NO:91), Figure 37 (SEQ ID NO:101), Figure 39 (SEQ ID NO:106), Figure 41 (SEQ ID NO:111), Figure 43 (SEQ ID NO:116), Figure 45 (SEQ ID NO:123), Figure 47 (SEQ ID NO:133), Figure 49 (SEQ ID NO:139), Figure 51 (SEQ ID NO:141), Figure 53 (SEQ ID NO:143), Figure 55 (SEQ ID NO:145), Figure 57 (SEQ ID NO:147), Figure 59 (SEQ ID NO:149), Figure 61 (SEQ ID NO:151), Figure 63 (SEQ ID NO:156), Figure 65 (SEQ ID NO:158), Figure 67 (SEQ ID NO:160), Figure 69 (SEQ ID NO:162), Figure 71 (SEQ ID NO:167), Figure 73 (SEQ ID NO:169), Figure 75 (SEQ ID NO:177), Figure 77 (SEQ ID NO:179), Figure 79 (SEQ ID NO:184), Figure 81 (SEQ ID NO:186), Figure 83 (SEQ ID NO:188), Figure 85 (SEQ ID NO:190), Figure 87 (SEQ ID NO:192), Figure 89 (SEQ ID NO:228), Figure 91 (SEQ ID NO:230), Figure 93 (SEQ ID NO:232), Figure 95 (SEQ ID NO:240), Figure 97 (SEQ ID NO:248), Figure 99 (SEQ ID NO:250), Figure 101 (SEQ ID NO:255), Figure 103 (SEQ ID NO:257), Figure 105 (SEQ ID NO:266), Figure 107 (SEQ ID NO:268), Figure 109 (SEQ ID NO:270), Figure 111 (SEQ ID NO:272), Figure 113 (SEQ ID NO:274), Figure 115 (SEQ ID NO:276), Figure 117 (SEQ ID NO:278), Figure 119 (SEQ ID NO:280), Figure 121 (SEQ ID NO:285), Figure 123 (SEQ ID NO:292), Figure 125 (SEQ ID NO:294) or Figure 127 (SEQ ID NO:296).

15

23. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to a nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 3 (SEQ ID NO:11), Figure 5 (SEQ ID NO:13), Figure 7 (SEQ ID NO:18), Figure 9 (SEQ ID NO:20), Figure 11 (SEQ ID NO:25), Figure 13 (SEQ ID NO:30), Figure 15 (SEQ ID NO:35), Figure 17 (SEQ ID NO:40), Figure 19 (SEQ ID NO:45), Figure 21 (SEQ ID NO:50), Figure 23 (SEQ ID NO:56), Figure 25 (SEQ ID NO:61), Figure 27 (SEQ ID NO:66), Figure 29 (SEQ ID NO:71), Figure 31 (SEQ ID NO:79), Figure 33 (SEQ ID NO:86), Figure 35 (SEQ ID NO:91), Figure 37 (SEQ ID NO:101), Figure 39 (SEQ ID NO:106), Figure 41 (SEQ ID NO:111), Figure 43 (SEQ ID NO:116), Figure 45 (SEQ ID NO:123), Figure 47 (SEQ ID NO:133), Figure 49 (SEQ ID NO:139), Figure 51 (SEQ ID NO:141), Figure 53 (SEQ ID NO:143), Figure 55 (SEQ ID NO:145), Figure 57 (SEQ ID NO:147), Figure 59 (SEQ ID NO:149), Figure 61 (SEQ ID NO:151), Figure 63 (SEQ ID NO:156), Figure 65 (SEQ ID NO:158), Figure 67 (SEQ ID NO:160), Figure 69 (SEQ ID NO:162), Figure 71 (SEQ ID NO:167), Figure 73 (SEQ ID NO:169), Figure 75 (SEQ ID NO:177), Figure 77 (SEQ ID NO:179), Figure 79 (SEQ ID NO:184), Figure 81 (SEQ ID NO:186), Figure 83 (SEQ ID NO:188), Figure 85 (SEQ ID NO:190), Figure 87 (SEQ ID NO:192), Figure 89 (SEQ ID NO:228), Figure 91 (SEQ ID NO:230), Figure 93 (SEQ ID NO:232), Figure 95 (SEQ ID NO:240), Figure 97 (SEQ ID NO:248), Figure 99 (SEQ ID NO:250), Figure 101 (SEQ ID NO:255), Figure 103 (SEQ ID NO:257), Figure 105 (SEQ ID NO:266), Figure 107 (SEQ ID NO:268), Figure 109 (SEQ ID NO:270), Figure 111 (SEQ ID NO:272), Figure 113 (SEQ ID NO:274), Figure 115 (SEQ ID NO:276), Figure 117 (SEQ ID NO:278), Figure 119 (SEQ ID NO:280), Figure 121 (SEQ ID NO:285), Figure 123 (SEQ ID NO:292), Figure 125 (SEQ ID NO:294) or Figure 127 (SEQ ID NO:296).

35

24. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to a nucleotide sequence selected from the group consisting of the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 3 (SEQ ID NO:11), Figure 5 (SEQ ID NO:13), Figure 7 (SEQ ID NO:18), Figure 9 (SEQ ID NO:20), Figure 11 (SEQ ID NO:25), Figure 13 (SEQ ID NO:30), Figure 15 (SEQ ID NO:35), Figure 17 (SEQ ID NO:40), Figure 19 (SEQ ID NO:45), Figure 21 (SEQ ID NO:50), Figure 23 (SEQ ID NO:56), Figure 25 (SEQ ID NO:61), Figure 27 (SEQ ID NO:66), Figure 29 (SEQ ID NO:71), Figure 31 (SEQ ID NO:79), Figure 33 (SEQ ID NO:86), Figure 35 (SEQ ID NO:91), Figure 37 (SEQ ID NO:101), Figure 39 (SEQ ID NO:106), Figure 41 (SEQ ID NO:111), Figure 43 (SEQ ID NO:116), Figure 45 (SEQ ID NO:123), Figure 47 (SEQ ID NO:133), Figure 49 (SEQ ID NO:139), Figure 51 (SEQ ID NO:141), Figure 53 (SEQ ID NO:143), Figure 55 (SEQ ID NO:145), Figure 57 (SEQ ID NO:147), Figure 59 (SEQ ID NO:149), Figure 61 (SEQ ID NO:151), Figure 63 (SEQ ID NO:156), Figure 65 (SEQ ID NO:158), Figure 67 (SEQ ID NO:160), Figure 69 (SEQ ID NO:162), Figure 71 (SEQ ID NO:167), Figure 73 (SEQ ID NO:169), Figure 75 (SEQ ID NO:177), Figure 77 (SEQ ID NO:179), Figure 79 (SEQ ID NO:184), Figure 81 (SEQ ID NO:186), Figure 83 (SEQ ID NO:188), Figure 85 (SEQ ID NO:190), Figure 87 (SEQ ID NO:192), Figure 89 (SEQ ID NO:228), Figure 91 (SEQ ID NO:230), Figure 93 (SEQ ID NO:232), Figure 95 (SEQ ID NO:240), Figure 97 (SEQ ID NO:248), Figure 99 (SEQ ID NO:250), Figure 101 (SEQ ID NO:255), Figure 103 (SEQ ID NO:257), Figure 105 (SEQ ID NO:266), Figure 107 (SEQ ID NO:268), Figure 109 (SEQ ID NO:270), Figure 111 (SEQ ID NO:272), Figure 113 (SEQ ID NO:274), Figure 115 (SEQ ID NO:276), Figure 117 (SEQ ID NO:278), Figure 119 (SEQ ID NO:280), Figure 121 (SEQ ID NO:285), Figure 123 (SEQ ID NO:292), Figure 125 (SEQ ID NO:294) or Figure 127 (SEQ ID NO:296).

40

WO 00/53758

PCT/US00/05841

ID NO:35), Figure 17 (SEQ ID NO:40), Figure 19 (SEQ ID NO:45), Figure 21 (SEQ ID NO:50), Figure 23 (SEQ ID NO:56), Figure 25 (SEQ ID NO:61), Figure 27 (SEQ ID NO:66), Figure 29 (SEQ ID NO:71), Figure 31 (SEQ ID NO:79), Figure 33 (SEQ ID NO:86), Figure 35 (SEQ ID NO:91), Figure 37 (SEQ ID NO:101), Figure 39 (SEQ ID NO:106), Figure 41 (SEQ ID NO:111), Figure 43 (SEQ ID NO:116), Figure 45 (SEQ ID NO:123), Figure 47 (SEQ ID NO:133), Figure 49 (SEQ ID NO:139), Figure 51 (SEQ ID NO:141), Figure 53 (SEQ ID NO:143), Figure 55 (SEQ ID NO:145), Figure 57 (SEQ ID NO:147), Figure 59 (SEQ ID NO:149), Figure 61 (SEQ ID NO:151), Figure 63 (SEQ ID NO:156), Figure 65 (SEQ ID NO:158), Figure 67 (SEQ ID NO:160), Figure 69 (SEQ ID NO:162), Figure 71 (SEQ ID NO:167), Figure 73 (SEQ ID NO:169), Figure 75 (SEQ ID NO:177), Figure 77 (SEQ ID NO:179), Figure 79 (SEQ ID NO:184), Figure 81 (SEQ ID NO:186), Figure 83 (SEQ ID NO:188), Figure 85 (SEQ ID NO:190), Figure 87 (SEQ ID NO:192), Figure 89 (SEQ ID NO:228), Figure 91 (SEQ ID NO:230), Figure 93 (SEQ ID NO:232), Figure 95 (SEQ ID NO:240), Figure 97 (SEQ ID NO:248), Figure 99 (SEQ ID NO:250), Figure 101 (SEQ ID NO:255), Figure 103 (SEQ ID NO:257), Figure 105 (SEQ ID NO:266), Figure 107 (SEQ ID NO:268), Figure 109 (SEQ ID NO:270), Figure 111 (SEQ ID NO:272), Figure 113 (SEQ ID NO:274), Figure 115 (SEQ ID NO:276), Figure 117 (SEQ ID NO:278), Figure 119 (SEQ ID NO:280), Figure 121 (SEQ ID NO:285), Figure 123 (SEQ ID NO:292), Figure 125 (SEQ ID NO:294) or Figure 127 (SEQ ID NO:296).

25. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to the full-length coding sequence of the DNA deposited under ATCC accession number 209653, 209380, 209254, 209381, 209376, 209260, 209374, 209265, 209419, 209424, 209388, 209433, 209704, 209720, 209621, 209620, 209616, 209436, 209422, 209702, 209480, 209859, 209774, 209801, 209802, 209849, 209905, 209950, 209962, 209866, 203128, 209986, 203173, 203132, 203093, 203457, 203244, 203094, 203282, 203276, 203160, 203277, 203573, 203553, -----, 209456, 209397, 209492, -----, 209808, 209802, 209750, 209858, 203583, 209989, 203092, 203131, 203269, 203267, 203657, 203818, 203834, 23-PTA, 203906.

26. A vector comprising the nucleic acid of any one of Claims 22 to 25.

27. The vector of Claim 26 operably linked to control sequences recognized by a host cell transformed with the vector.

28. A host cell comprising the vector of Claim 26.

29. The host cell of Claim 28, wherein said cell is a CHO cell.

30. The host cell of Claim 28, wherein said cell is an *E. coli*.

31. The host cell of Claim 28, wherein said cell is a yeast cell.

32. A process for producing a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363,

WO 00/53758

PCT/US00/05841

PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727 polypeptide comprising culturing the host cell of Claim 28 under conditions suitable for expression of said polypeptide and recovering said polypeptide from the cell culture.

33. An isolated polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:12), Figure 6 (SEQ ID NO:14), Figure 8 (SEQ ID NO:19), Figure 10 (SEQ ID NO:21), Figure 12 (SEQ ID NO:26), Figure 14 (SEQ ID NO:31), Figure 16 (SEQ ID NO:36), Figure 18 (SEQ ID NO:41), Figure 20 (SEQ ID NO:46), Figure 22 (SEQ ID NO:51), Figure 24 (SEQ ID NO:57), Figure 26 (SEQ ID NO:62), Figure 28 (SEQ ID NO:67), Figure 30 (SEQ ID NO:72), Figure 32 (SEQ ID NO:80), Figure 34 (SEQ ID NO:87), Figure 36 (SEQ ID NO:92), Figure 38 (SEQ ID NO:102), Figure 40 (SEQ ID NO:107), Figure 42 (SEQ ID NO:112), Figure 44 (SEQ ID NO:117), Figure 46 (SEQ ID NO:124), Figure 48 (SEQ ID NO:134), Figure 50 (SEQ ID NO:140), Figure 52 (SEQ ID NO:142), Figure 54 (SEQ ID NO:144), Figure 56 (SEQ ID NO:146), Figure 58 (SEQ ID NO:148), Figure 60 (SEQ ID NO:150), Figure 62 (SEQ ID NO:152), Figure 64 (SEQ ID NO:157), Figure 66 (SEQ ID NO:159), Figure 68 (SEQ ID NO:161), Figure 70 (SEQ ID NO:163), Figure 72 (SEQ ID NO:168), Figure 74 (SEQ ID NO:170), Figure 76 (SEQ ID NO:178), Figure 78 (SEQ ID NO:180), Figure 80 (SEQ ID NO:185), Figure 82 (SEQ ID NO:187), Figure 84 (SEQ ID NO:189), Figure 86 (SEQ ID NO:191), Figure 88 (SEQ ID NO:193), Figure 90 (SEQ ID NO:229), Figure 92 (SEQ ID NO:231), Figure 94 (SEQ ID NO:233), Figure 96 (SEQ ID NO:241), Figure 98 (SEQ ID NO:249), Figure 100 (SEQ ID NO:251), Figure 102 (SEQ ID NO:256), Figure 104 (SEQ ID NO:258), Figure 106 (SEQ ID NO:267), Figure 108 (SEQ ID NO:269), Figure 110 (SEQ ID NO:271), Figure 112 (SEQ ID NO:273), Figure 114 (SEQ ID NO:275), Figure 116 (SEQ ID NO:277), Figure 118 (SEQ ID NO:279), Figure 120 (SEQ ID NO:281), Figure 122 (SEQ ID NO:286), Figure 124 (SEQ ID NO:293), Figure 126 (SEQ ID NO:295) or Figure 128 (SEQ ID NO:297).

34. An isolated polypeptide scoring at least 80% positives when compared to an amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:12), Figure 6 (SEQ ID NO:14), Figure 8 (SEQ ID NO:19), Figure 10 (SEQ ID NO:21), Figure 12 (SEQ ID NO:26), Figure 14 (SEQ ID NO:31), Figure 16 (SEQ ID NO:36), Figure 18 (SEQ ID NO:41), Figure 20 (SEQ ID NO:46), Figure 22 (SEQ ID NO:51), Figure 24 (SEQ ID NO:57), Figure 26 (SEQ ID NO:62), Figure 28 (SEQ ID NO:67), Figure 30 (SEQ ID NO:72), Figure 32 (SEQ ID NO:80), Figure 34 (SEQ ID NO:87), Figure 36 (SEQ ID NO:92), Figure 38 (SEQ ID NO:102), Figure 40 (SEQ ID NO:107), Figure 42 (SEQ ID NO:112), Figure 44 (SEQ ID NO:117), Figure 46 (SEQ ID NO:124), Figure 48 (SEQ ID NO:134), Figure 50 (SEQ ID NO:140), Figure 52 (SEQ ID NO:142), Figure 54 (SEQ ID NO:144), Figure 56 (SEQ ID NO:146), Figure 58 (SEQ ID NO:148), Figure 60 (SEQ ID NO:150), Figure 62 (SEQ ID NO:152), Figure 64 (SEQ ID NO:157), Figure 66 (SEQ ID NO:159), Figure 68 (SEQ ID NO:161), Figure 70 (SEQ ID

WO 00/53758

PCT/US00/05841

- NO:163), Figure 72 (SEQ ID NO:168), Figure 74 (SEQ ID NO:170), Figure 76 (SEQ ID NO:178), Figure 78 (SEQ ID NO:180), Figure 80 (SEQ ID NO:185), Figure 82 (SEQ ID NO:187), Figure 84 (SEQ ID NO:189), Figure 86 (SEQ ID NO:191), Figure 88 (SEQ ID NO:193), Figure 90 (SEQ ID NO:229), Figure 92 (SEQ ID NO:231), Figure 94 (SEQ ID NO:233), Figure 96 (SEQ ID NO:241), Figure 98 (SEQ ID NO:249), Figure 100 (SEQ ID NO:251), Figure 102 (SEQ ID NO:256), Figure 104 (SEQ ID NO:258), Figure 106 (SEQ ID NO:267), Figure 108 (SEQ ID NO:269), Figure 110 (SEQ ID NO:271), Figure 112 (SEQ ID NO:273), Figure 114 (SEQ ID NO:275), Figure 116 (SEQ ID NO:277), Figure 118 (SEQ ID NO:279), Figure 120 (SEQ ID NO:281), Figure 122 (SEQ ID NO:286), Figure 124 (SEQ ID NO:293), Figure 126 (SEQ ID NO:295) or Figure 128 (SEQ ID NO:297).
35. An isolated polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the DNA deposited under ATCC accession number 209653, 209380, 209254, 209381, 209376, 209260, 209374, 209265, 209419, 209424, 209388, 209433, 209704, 209720, 209621, 209620, 209616, 209436, 209422, 209702, 209480, 209859, 209774, 209801, 209802, 209849, 209905, 209950, 209962, 209866, 203128, 209986, 203173, 203132, 203093, 203457, 203244, 203094, 203282, 203276, 203160, 203277, 203573, 203553, -----, 209456, 209397, 209492, -----, 209808, 209802, 209750, 209858, 203583, 209989, 203092, 203131, 203269, 203267, 203657, 203818, 203834, 23-PTA, 203906.
36. A chimeric molecule comprising a polypeptide according to any one of Claims 33 to 35 fused to a heterologous amino acid sequence.
37. The chimeric molecule of Claim 36, wherein said heterologous amino acid sequence is an epitope tag sequence.
38. The chimeric molecule of Claim 36, wherein said heterologous amino acid sequence is a Fc region of an immunoglobulin.
39. An antibody which specifically binds to a polypeptide according to any one of Claims 33 to 35.
40. The antibody of Claim 39, wherein said antibody is a monoclonal antibody, a humanized antibody or a single-chain antibody.
41. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to:
- (a) a nucleotide sequence encoding the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:12), Figure 6 (SEQ ID NO:14), Figure 8 (SEQ ID NO:19), Figure 10 (SEQ ID NO:21), Figure 12 (SEQ ID NO:26), Figure 14 (SEQ ID NO:31), Figure 16 (SEQ ID NO:36), Figure 18 (SEQ ID NO:41), Figure 20 (SEQ ID NO:46), Figure 22 (SEQ ID NO:51), Figure 24 (SEQ ID NO:57), Figure 26 (SEQ ID NO:62), Figure 28 (SEQ ID NO:67), Figure 30 (SEQ ID NO:72), Figure 32 (SEQ ID NO:80), Figure 34 (SEQ ID

WO 00/53758

PCT/US00/05841

- NO:87), Figure 36 (SEQ ID NO:92), Figure 38 (SEQ ID NO:102), Figure 40 (SEQ ID NO:107), Figure 42 (SEQ ID NO:112), Figure 44 (SEQ ID NO:117), Figure 46 (SEQ ID NO:124), Figure 48 (SEQ ID NO:134), Figure 50 (SEQ ID NO:140), Figure 52 (SEQ ID NO:142), Figure 54 (SEQ ID NO:144), Figure 56 (SEQ ID NO:146), Figure 58 (SEQ ID NO:148), Figure 60 (SEQ ID NO:150), Figure 62 (SEQ ID NO:152), Figure 64 (SEQ ID NO:157), Figure 66 (SEQ ID NO:159), Figure 68 (SEQ ID NO:161), Figure 70 (SEQ ID NO:163), Figure 72 (SEQ ID NO:168), Figure 74 (SEQ ID NO:170), Figure 76 (SEQ ID NO:178), Figure 78 (SEQ ID NO:180), Figure 80 (SEQ ID NO:185), Figure 82 (SEQ ID NO:187), Figure 84 (SEQ ID NO:189), Figure 86 (SEQ ID NO:191), Figure 88 (SEQ ID NO:193), Figure 90 (SEQ ID NO:229), Figure 92 (SEQ ID NO:231), Figure 94 (SEQ ID NO:233), Figure 96 (SEQ ID NO:241), Figure 98 (SEQ ID NO:249), Figure 100 (SEQ ID NO:251), Figure 102 (SEQ ID NO:256), Figure 104 (SEQ ID NO:258), Figure 106 (SEQ ID NO:267), Figure 108 (SEQ ID NO:269), Figure 110 (SEQ ID NO:271), Figure 112 (SEQ ID NO:273), Figure 114 (SEQ ID NO:275), Figure 116 (SEQ ID NO:277), Figure 118 (SEQ ID NO:279), Figure 120 (SEQ ID NO:281), Figure 122 (SEQ ID NO:286), Figure 124 (SEQ ID NO:293), Figure 126 (SEQ ID NO:295) or Figure 128 (SEQ ID NO:297) lacking its associated signal peptide;
- 15 (b) a nucleotide sequence encoding an extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:12), Figure 6 (SEQ ID NO:14), Figure 8 (SEQ ID NO:19), Figure 10 (SEQ ID NO:21), Figure 12 (SEQ ID NO:26), Figure 14 (SEQ ID NO:31), Figure 16 (SEQ ID NO:36), Figure 18 (SEQ ID NO:41), Figure 20 (SEQ ID NO:46), Figure 22 (SEQ ID NO:51), Figure 24 (SEQ ID NO:57), Figure 26 (SEQ ID NO:62), Figure 28 (SEQ ID NO:67), Figure 30 (SEQ ID NO:72), Figure 32 (SEQ ID NO:80), Figure 34 (SEQ ID NO:87), Figure 36 (SEQ ID NO:92), Figure 38 (SEQ ID NO:102), Figure 40 (SEQ ID NO:107), Figure 42 (SEQ ID NO:112), Figure 44 (SEQ ID NO:117), Figure 46 (SEQ ID NO:124), Figure 48 (SEQ ID NO:134), Figure 50 (SEQ ID NO:140), Figure 52 (SEQ ID NO:142), Figure 54 (SEQ ID NO:144), Figure 56 (SEQ ID NO:146), Figure 58 (SEQ ID NO:148), Figure 60 (SEQ ID NO:150), Figure 62 (SEQ ID NO:152), Figure 64 (SEQ ID NO:157), Figure 66 (SEQ ID NO:159), Figure 68 (SEQ ID NO:161), Figure 70 (SEQ ID NO:163), Figure 72 (SEQ ID NO:168), Figure 74 (SEQ ID NO:170), Figure 76 (SEQ ID NO:178), Figure 78 (SEQ ID NO:180), Figure 80 (SEQ ID NO:185), Figure 82 (SEQ ID NO:187), Figure 84 (SEQ ID NO:189), Figure 86 (SEQ ID NO:191), Figure 88 (SEQ ID NO:193), Figure 90 (SEQ ID NO:229), Figure 92 (SEQ ID NO:231), Figure 94 (SEQ ID NO:233), Figure 96 (SEQ ID NO:241), Figure 98 (SEQ ID NO:249), Figure 100 (SEQ ID NO:251), Figure 102 (SEQ ID NO:256), Figure 104 (SEQ ID NO:258), Figure 106 (SEQ ID NO:267), Figure 108 (SEQ ID NO:269), Figure 110 (SEQ ID NO:271), Figure 112 (SEQ ID NO:273), Figure 114 (SEQ ID NO:275), Figure 116 (SEQ ID NO:277), Figure 118 (SEQ ID NO:279), Figure 120 (SEQ ID NO:281), Figure 122 (SEQ ID NO:286), Figure 124 (SEQ ID NO:293), Figure 126 (SEQ ID NO:295) or Figure 128 (SEQ ID NO:297) with its associated signal peptide; or
- 20 (c) a nucleotide sequence encoding an extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:12), Figure 6 (SEQ ID NO:14), Figure 8 (SEQ ID NO:19), Figure 10 (SEQ ID NO:21), Figure 12 (SEQ ID NO:26), Figure 14 (SEQ ID NO:31), Figure 16 (SEQ ID NO:36), Figure 18 (SEQ ID NO:41), Figure 20 (SEQ ID NO:46), Figure 22 (SEQ ID NO:51), Figure 24 (SEQ ID NO:57), Figure 26 (SEQ ID NO:62), Figure 28 (SEQ ID NO:67), Figure 30 (SEQ ID NO:72), Figure 32 (SEQ ID NO:80), Figure 34 (SEQ ID NO:87), Figure 36 (SEQ ID NO:92), Figure 38 (SEQ ID NO:102), Figure 40 (SEQ ID NO:107), Figure 42 (SEQ ID NO:112), Figure 44 (SEQ ID NO:117), Figure 46 (SEQ ID NO:124),
- 25
- 30
- 35
- 40

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 48 (SEQ ID NO:134), Figure 50 (SEQ ID NO:140), Figure 52 (SEQ ID NO:142), Figure 54 (SEQ ID NO:144), Figure 56 (SEQ ID NO:146), Figure 58 (SEQ ID NO:148), Figure 60 (SEQ ID NO:150), Figure 62 (SEQ ID NO:152), Figure 64 (SEQ ID NO:157), Figure 66 (SEQ ID NO:159), Figure 68 (SEQ ID NO:161), Figure 70 (SEQ ID NO:163), Figure 72 (SEQ ID NO:168), Figure 74 (SEQ ID NO:170), Figure 76 (SEQ ID NO:178), Figure 78 (SEQ ID NO:180), Figure 80 (SEQ ID NO:185), Figure 82 (SEQ ID NO:187), Figure 84 (SEQ ID NO:189), Figure 86 (SEQ ID NO:191), Figure 88 (SEQ ID NO:193), Figure 90 (SEQ ID NO:229), Figure 92 (SEQ ID NO:231), Figure 94 (SEQ ID NO:233), Figure 96 (SEQ ID NO:241), Figure 98 (SEQ ID NO:249), Figure 100 (SEQ ID NO:251), Figure 102 (SEQ ID NO:256), Figure 104 (SEQ ID NO:258), Figure 106 (SEQ ID NO:267), Figure 108 (SEQ ID NO:269), Figure 110 (SEQ ID NO:271), Figure 112 (SEQ ID NO:273), Figure 114 (SEQ ID NO:275), Figure 116 (SEQ ID NO:277), Figure 118 (SEQ ID NO:279), Figure 120 (SEQ ID NO:281), Figure 122 (SEQ ID NO:286), Figure 124 (SEQ ID NO:293), Figure 126 (SEQ ID NO:295) or Figure 128 (SEQ ID NO:297) lacking its associated signal peptide.

42. An isolated polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to:

- (a) the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:12), Figure 6 (SEQ ID NO:14), Figure 8 (SEQ ID NO:19), Figure 10 (SEQ ID NO:21), Figure 12 (SEQ ID NO:26), Figure 14 (SEQ ID NO:31), Figure 16 (SEQ ID NO:36), Figure 18 (SEQ ID NO:41), Figure 20 (SEQ ID NO:46), Figure 22 (SEQ ID NO:51), Figure 24 (SEQ ID NO:57), Figure 26 (SEQ ID NO:62), Figure 28 (SEQ ID NO:67), Figure 30 (SEQ ID NO:72), Figure 32 (SEQ ID NO:80), Figure 34 (SEQ ID NO:87), Figure 36 (SEQ ID NO:92), Figure 38 (SEQ ID NO:102), Figure 40 (SEQ ID NO:107), Figure 42 (SEQ ID NO:112), Figure 44 (SEQ ID NO:117), Figure 46 (SEQ ID NO:124), Figure 48 (SEQ ID NO:134), Figure 50 (SEQ ID NO:140), Figure 52 (SEQ ID NO:142), Figure 54 (SEQ ID NO:144), Figure 56 (SEQ ID NO:146), Figure 58 (SEQ ID NO:148), Figure 60 (SEQ ID NO:150), Figure 62 (SEQ ID NO:152), Figure 64 (SEQ ID NO:157), Figure 66 (SEQ ID NO:159), Figure 68 (SEQ ID NO:161), Figure 70 (SEQ ID NO:163), Figure 72 (SEQ ID NO:168), Figure 74 (SEQ ID NO:170), Figure 76 (SEQ ID NO:178), Figure 78 (SEQ ID NO:180), Figure 80 (SEQ ID NO:185), Figure 82 (SEQ ID NO:187), Figure 84 (SEQ ID NO:189), Figure 86 (SEQ ID NO:191), Figure 88 (SEQ ID NO:193), Figure 90 (SEQ ID NO:229), Figure 92 (SEQ ID NO:231), Figure 94 (SEQ ID NO:233), Figure 96 (SEQ ID NO:241), Figure 98 (SEQ ID NO:249), Figure 100 (SEQ ID NO:251), Figure 102 (SEQ ID NO:256), Figure 104 (SEQ ID NO:258), Figure 106 (SEQ ID NO:267), Figure 108 (SEQ ID NO:269), Figure 110 (SEQ ID NO:271), Figure 112 (SEQ ID NO:273), Figure 114 (SEQ ID NO:275), Figure 116 (SEQ ID NO:277), Figure 118 (SEQ ID NO:279), Figure 120 (SEQ ID NO:281), Figure 122 (SEQ ID NO:286), Figure 124 (SEQ ID NO:293), Figure 126 (SEQ ID NO:295) or Figure 128 (SEQ ID NO:297), lacking its associated signal peptide;
- (b) an extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:12), Figure 6 (SEQ ID NO:14), Figure 8 (SEQ ID NO:19), Figure 10 (SEQ ID NO:21), Figure 12 (SEQ ID NO:26), Figure 14 (SEQ ID NO:31), Figure 16 (SEQ ID NO:36), Figure 18 (SEQ ID NO:41), Figure 20 (SEQ ID NO:46), Figure 22 (SEQ ID NO:51), Figure 24 (SEQ ID NO:57), Figure 26 (SEQ ID NO:62), Figure 28 (SEQ ID NO:67), Figure 30 (SEQ ID NO:72), Figure 32 (SEQ ID NO:80), Figure 34 (SEQ ID NO:87), Figure 36 (SEQ ID NO:92), Figure 38 (SEQ ID NO:102), Figure 40 (SEQ ID NO:107), Figure 42 (SEQ ID NO:112), Figure 44 (SEQ ID NO:117), Figure 46 (SEQ ID NO:124), Figure 48 (SEQ ID NO:134), Figure 50



WO 00/53758

PCT/US00/05841

(SEQ ID NO:140), Figure 52 (SEQ ID NO:142), Figure 54 (SEQ ID NO:144), Figure 56 (SEQ ID NO:146), Figure 58 (SEQ ID NO:148), Figure 60 (SEQ ID NO:150), Figure 62 (SEQ ID NO:152), Figure 64 (SEQ ID NO:157), Figure 66 (SEQ ID NO:159), Figure 68 (SEQ ID NO:161), Figure 70 (SEQ ID NO:163), Figure 72 (SEQ ID NO:168), Figure 74 (SEQ ID NO:170), Figure 76 (SEQ ID NO:178), Figure 78 (SEQ ID NO:180), Figure 80 (SEQ ID NO:185), Figure 82 (SEQ ID NO:187), Figure 84 (SEQ ID NO:189), Figure 86 (SEQ ID NO:191), Figure 88 (SEQ ID NO:193), Figure 90 (SEQ ID NO:229), Figure 92 (SEQ ID NO:231), Figure 94 (SEQ ID NO:233), Figure 96 (SEQ ID NO:241), Figure 98 (SEQ ID NO:249), Figure 100 (SEQ ID NO:251), Figure 102 (SEQ ID NO:256), Figure 104 (SEQ ID NO:258), Figure 106 (SEQ ID NO:267), Figure 108 (SEQ ID NO:269), Figure 110 (SEQ ID NO:271), Figure 112 (SEQ ID NO:273), Figure 114 (SEQ ID NO:275), Figure 116 (SEQ ID NO:277), Figure 118 (SEQ ID NO:279), Figure 120 (SEQ ID NO:281), Figure 122 (SEQ ID NO:286), Figure 124 (SEQ ID NO:293), Figure 126 (SEQ ID NO:295) or Figure 128 (SEQ ID NO:297), with its associated signal peptide; or

(c) an extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:12), Figure 6 (SEQ ID NO:14), Figure 8 (SEQ ID NO:19), Figure 10 (SEQ ID NO:21), Figure 12 (SEQ ID NO:26), Figure 14 (SEQ ID NO:31), Figure 16 (SEQ ID NO:36), Figure 18 (SEQ ID NO:41), Figure 20 (SEQ ID NO:46), Figure 22 (SEQ ID NO:51), Figure 24 (SEQ ID NO:57), Figure 26 (SEQ ID NO:62), Figure 28 (SEQ ID NO:67), Figure 30 (SEQ ID NO:72), Figure 32 (SEQ ID NO:80), Figure 34 (SEQ ID NO:87), Figure 36 (SEQ ID NO:92), Figure 38 (SEQ ID NO:102), Figure 40 (SEQ ID NO:107), Figure 42 (SEQ ID NO:112), Figure 44 (SEQ ID NO:117), Figure 46 (SEQ ID NO:124), Figure 48 (SEQ ID NO:134), Figure 50 (SEQ ID NO:140), Figure 52 (SEQ ID NO:142), Figure 54 (SEQ ID NO:144), Figure 56 (SEQ ID NO:146), Figure 58 (SEQ ID NO:148), Figure 60 (SEQ ID NO:150), Figure 62 (SEQ ID NO:152), Figure 64 (SEQ ID NO:157), Figure 66 (SEQ ID NO:159), Figure 68 (SEQ ID NO:161), Figure 70 (SEQ ID NO:163), Figure 72 (SEQ ID NO:168), Figure 74 (SEQ ID NO:170), Figure 76 (SEQ ID NO:178), Figure 78 (SEQ ID NO:180), Figure 80 (SEQ ID NO:185), Figure 82 (SEQ ID NO:187), Figure 84 (SEQ ID NO:189), Figure 86 (SEQ ID NO:191), Figure 88 (SEQ ID NO:193), Figure 90 (SEQ ID NO:229), Figure 92 (SEQ ID NO:231), Figure 94 (SEQ ID NO:233), Figure 96 (SEQ ID NO:241), Figure 98 (SEQ ID NO:249), Figure 100 (SEQ ID NO:251), Figure 102 (SEQ ID NO:256), Figure 104 (SEQ ID NO:258), Figure 106 (SEQ ID NO:267), Figure 108 (SEQ ID NO:269), Figure 110 (SEQ ID NO:271), Figure 112 (SEQ ID NO:273), Figure 114 (SEQ ID NO:275), Figure 116 (SEQ ID NO:277), Figure 118 (SEQ ID NO:279), Figure 120 (SEQ ID NO:281), Figure 122 (SEQ ID NO:286), Figure 124 (SEQ ID NO:293), Figure 126 (SEQ ID NO:295) or Figure 128 (SEQ ID NO:297), lacking its associated signal peptide.

43. A method of affecting the proliferation of T-cells comprising contacting PBMC cells with an effective amount of a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727 polypeptide and measuring the change in proliferation from control levels.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

44. A method of affecting vascular permeability comprising injecting a test animal with an effective amount of a PRO200, PRO204, PRO212, PRO216, PRO226, PRO240, PRO235, PRO245, PRO172, PRO273, PRO272, PRO332, PRO526, PRO701, PRO361, PRO362, PRO363, PRO364, PRO356, PRO531, PRO533, PRO1083, PRO865, PRO770, PRO769, PRO788, PRO1114, PRO1007, PRO1184, PRO1031, PRO1346, PRO1155, PRO1250, PRO1312, PRO1192, PRO1246, PRO1283, PRO1195, PRO1343, PRO1418, PRO1387, PRO1410, PRO1917, PRO1868, PRO205, PRO21, PRO269, PRO344, PRO333, PRO381, PRO720, PRO866, PRO840, PRO982, PRO836, PRO1159, PRO1358, PRO1325, PRO1338, PRO1434, PRO4333, PRO4302, PRO4430 or PRO5727 polypeptide, and measuring the resulting extent of vascular permeability.

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 1

CGGACGGCTGGGCGGACGGCTGGGCGGACGGCTGGGCGGACGGCTGGCTGGCTTCAGGTC  
CRGGTTTGGCTTTCATCCCTTTTCAAAAACCTGGAGACACAGAGAGGGCTCTAGGAAAAAG  
TTTTGGATGGGATTATGTGGAACTACCTGCGATTCTCTGCTGCCAGAGCAGGCTCGGC  
GCTTCCACCCCGAGTGGCAGGCTTCCCTGGCGGTGGTGAAGAGACTCGGAGTCTGCTGCT  
TCCAAAGTCCCGCGGTGAGTCTCACCCTCAGTCAACAA  
ATGAGGCTCTCTGGGCTTCTCTCTGCTGACATCTGCCCTGGCGGCGGACAGGAGGACT  
CRGGCGGAATCCAACTCGATAGTAAATTCAGTTCCTCAGCAACAAGGAACAGAACGGA  
GTACAGATCTCTCAGCATGAGAGAAATTAATCTGTGTCTACTAATGGAGTATTCACAGC  
CCAGGTTTCTCTATCTTATCCAAAGAAATACGGTCTTGGTATGGAGATTAGTAGCAGTA  
GAGGAAAAATGTATGGATACAACTTACGTTTGTATGAAGATTTGGGCTTGAAGACCCAGAA  
GATGACATATGCAAGTATGATTTTGTAGAAGTTGAGGAACCCAGTATGGAACATATATTA  
GGGCGCTGGTGGTCTTGGTACTGTACAGGAAAAACAGATTTCTAAAGGAAATCAAAAT  
AGGATAAGATTGGTATCTGATGAATATTTCTCTGAAACAGGGTTCTGCACTCCATAC  
AACATTGTCTATGCCACAATTCACAGAGCTGTGAGTCTCTCAGTCTACCCCTCTCAGCT  
TTGCCACTGGACCTGTCTTAATGAATGCTATACTGCTCTTAGTACCTTGAAGACCTTATT  
CGATATCTTGAACAGAGAGATGGCAGTTGGAATTAGAAGATCTATATAGGCCAACTTGG  
CACTCTTGGCAAGGCTTTTGTCTTGGAAAGAAATCCAGAGTGGTGGATCTGAACCTT  
CTAACAGAGGAGGTAGATTATACAGCTGCACACCTCGTAACCTCTCAGTGTCTCAATAGG  
GAAGAACTAAAGAGAACCGATACCAATTTCTGGCCAGGTGTCTCTGGTTAAACGCTGT  
GGTGGGAACCTGCTCTGTCTCTCAATTTGCAATGAATGTCAATGTCTCCAAAGCAAA  
GTTACTAAAAAATACCAGAGGCTCTCAGTTGAGACCAAGACCGGTGTGAGGGGATTG  
CACAAATCACTCACCAGCTGGGCTTGGAGCACCATGAGGAGTGTGACTGTGTGTGACAGA  
GGGAGCACAGGAGGATAGCCGCATCACACAGCAGCTCTTGGCCAGAGCTGTGAGTGC  
AGTGGCTGATTCTATTAGAGAACGTATGCGTTATCTCCATCCTTAATCTCAGTTGTGTTC  
TTCAAGGACCTTTCATCTTCAGGATTTACAGTGCAATCTGAAGAGGAGACATCAAAAG  
AATTAGGAGTTGTGCAACAGCTCTTTTGAAGAGGAGGCTTAAAGGACAGGAGAAAGGCT  
TCAATCTGGAAAGAAATTAATATTTGATTAATAGATCACAGCTAGTTTCAGAGTT  
ACCATGTACGTATTCACATAGCTGGGTTCTGTATTTTCAGTTCTTT  
CGATACGGCTTAGGGTATGTGAGTACAGGAAAAAATCTGGCAAGTGAGCACCTGATTC  
CGTTGCCCTTGCCTTAATCTCAAGCTCCATGTCTGGGCTCAAAATCGTATAAAATCTGGA  
TTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTCATATTCACATATGTAACCCAGAACATTCTAIGTACTACA  
AACCTGGTTTTTAAAAAGGAATATGTTCTATGAATTAACCTTGTGTATGCTGATAGG  
ACGACCTGGATTTTCAATTTCTTATATAAAATTTCTGCCATTTAGAGAAAGGAACTAC  
ATTCTGGTTTGAAGAGATATAACCTGAAAGAGAGTGGCTTATCTTCACTTATCGA  
TAAGTCAGTTTATTTGTTCTTATGTGACATTTTATATTTCTCCTTTTGAATATATACT  
GTGGCTTTTCAATCTTGTAAATATATCTATTTTACCAAGGATTTAATATTTCTTT  
TTATGACAACTTAGATCAACTATTTTATGCTTGGTAAATTTTCTAAACAAATTTGTTA  
TAGCCAGAGGAACAAAGATGATATAAAATATTTGCTCTGACAAAAATACATGATTTTC  
ATTCTGATAGGTGCTAGAGTATAGATTAATCTGCATTTTAAAAAATGAATTTGAATAGA  
ATTGGTAAGTTGCAAGACTTTTGAAGAAATTAATTAATATCATATCTTCCATTCCTGTT  
ATTGAGATGAAAAAATAAAGCACTTATGAAGTAGACATTGAGTCCAGCCATTACTA  
ACCTATTCTTTTTTGGGGAATCTGAGCTAGCTCAGAAAAACATAAGCACCTTGAAA  
AAGACTTGGCAGCTTCTGATAAGCGTGTGTGTGTGAGTAGGAACACATCTTATTT  
ATTGTGATGTTGTGTTTTTATTATCTTAACTCTGTTCCATACACTTGTATAAATACATG  
GATATTTTATGTACAGAGTATGCTCTTAAACAGTTCACATTATTGTACTCTGGCAATG  
TAAAGAAAAATCAGTAAAAATTTTGTCTGTAAGTCTTAAATATNGTGCCTAGGTTATG  
TGGTACTATTGAATCAAAAATGTATTGAATCATCAATAAAAAGATGTGGCTATTTTG  
GGGAGAAAAATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGTTTAGGGATACAGGGTAATGCGGCC

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 2

MSLFGLLLLSALAGQRQGTQAESNLSSKFQFSSNKEQNGVQDPQHERIITVSTNGSIHS  
PRFPHTYPRNTVLVWRLVAEENVWQLTFDERFGLEDPEDDICKYDFVEVEEFSGDTIL  
GRWCGSGTVPGKQISKGNQIRIFVSEYFPSEPGFCIHYNIVMPQFTEAVSPSVLPSPA  
LPLDLLNNAITAFSTLEDLIRYLEPERWQLDLEDLYRPTWQLGKAFVFGKSRVVDLNL  
LTEEVRLYSCTPRNFSVSIREELKRTDTIFWPGCLLVKRCGGNCACCLHNCNEQCQVPSK  
VTKKYHEVLQLRPKTGVRLHKS LTDVALEHHEECDVCRCGSTGG

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 3

TGCCGGGCTGCGGGGGGCTTGAAGTCTCCCTCCACCCCTGCCTCCTCGGGCTCCACTCGTC  
TGCCCTTGGAAGTCCCGTCTCCTCTGTCTCCCTCGGGCTCCAGAGCTCCCTCCTTATGGCA  
GCAGCTTCCCGGTCTCGGGCGAGCTTCTCAGCGGACGACCTCTCGCTCGGGGGTGA  
GCCAGTCCCTGGATGTTGCTGAAAGTCTCAGAGATCATGCGCGGTGTTGGCTGCTGCTTC  
CCCGCGGGTGCCACTGCCACCGCGCGGCTCTGCTGCGCGGTCCCGGGGATGCTCAG  
TAGCCGCTGCGCGGGCGGATCCTGTCTCCTCGGAAGCGTTTGTCTGCTGCAGAG  
TTGCACGAAGTATGTC  
ATGGTGTCTGTGGAGTCCCGGGGCGAGTGCACAGCTGGACACTTTGCGAGGGCTTTTGC  
TGGCTGTCTGTCTGCGCGGTCTGCTACTCATCTAGTCCCGGGTGAAGTCTGCTGCT  
TTCCCTACCTCTTAAAGTGAAGTCCAAACGCCCCACCGGCTGGAATGCTCTGTTATGAT  
GACAGAGAAATGATCTCTTCTCTGTGACACCAACCTGTAAATTTGATGGGAAATGT  
TTAGAGATTGGAGACTGTGACTTGGCTGTGTCAGTTCAAGTGCACCAATGACTATGTG  
CCTGTGTGTGGCTCCAAATGGGGAGAGCTACAGAAATGATGTTACCTGCGACAGGCTGCA  
TGCACACGCGAGCTGAGATCTTGTGTGTGAGAGGATCATGTGCCACAGATGACAGA  
TCAGGATCTGAGATGGAGTCCATGAAGCTCTGAGAGAACTAGTCAAAGGAGACATCC  
ACCTGTGATATTGCGCAGTTTGGTGACAAATGTGACGAAGATGCCGAGATGCTCTGCTGT  
GTGTGATATTGCTGTCTTCAAACCAACTTCAATCCCCTCTGCGCTTCTGATGGGAAA  
TCTTATGATATGCTGCAAAATCAAAGAGCATCTGTGACAGAAACAGAGAAATGAA  
GTCTATGCTTTGGGTGATGTCAGAGAAACACACTCAACTACTAGTCTGAAGATGGG  
CATTATGCAAGACAGATTATGACAGAGATGCTAACAAATGAGAGAAAGTCCAGAGAA  
CACCACATACCTTGTCCGGAACATTACAGTGGCTTCTGCTATGCTGGAAGTGTGAGCAT  
TCTATCAATATGCGAGGACCATCTTGCAGGTGTGATGCTGCTTATCTGACAAACACTGT  
GAAAAAAGGACTACAGTGTCTATACGTTGTTCGCGTCTGTACGATTTTCAATATGCT  
TTAATCGCAGCTGTGATTGGAACAAATTCAGATTGCTGTCTGTGCTGTGTTGG  
TCCTCTGATCACAAGGAAATGCCCGAGCAACAGAAATTCACAGACAGAGCAAAATA  
CAGGGCCTACAGTTTCAGACAATACAGAGAGCGTCCAGAGTTAATCTAAAGGGAGC  
ATGTTTACAGTGGCTGAGTACCGAGAGCTTGGACTACACAATACAGTATTTATAGACAA  
AAGAATAAGACAGAGATCTACACATGTTGCTTGCATTTTGGTAATCTACACCAATGA  
AAACATGTACTACAGCTATATTGATTATGATGGATATTTGAAATAGTATACATTTGT  
CTTGATGTTTTTCTGTATGTAAATAAATATTTATATACACAAATAGTTTTTCTT  
TCCCATGTATTTGTTATATATAAAATACTCAGTATGAG

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 4

MVLWESPRQCSWTLCBGPFWLLLLLPVMLLIVARPVKLAAPPTSLSDCQIPTGWNCSGY  
DDRENDLFLCDTNTCKFDGCELRIGDTVTVCQOPKNNDYVFCGNGESYQNECYLRQ  
AACKQOSEILVVSBSGCATDAGSGSGDGVHGGSETSQKETSTCDICQFGARCEDEAED  
VMCVNIDCSQTNFNPLCASDGKSYDNACQIKASQKQEKIEVMSLGRCDNTTTTK  
SEDGHVARTDYAENANKLESAREHHIPCFEYNGFCMHGKCEHSINWQEPSCRCDAGY  
TGOHCEKKDYSVLYVVEGVPVPQYVLIAAVIGTIQIAVICVVVLCITRKCPRSNRIHQ  
KQNTGHYSSDNTTRASTRLI

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 5

TCCGCAAGCGGACCGGGGCAAGGAGGTGGCATGTCGGTCAGGCACAGCAGGGTCCTGT  
GTCCGCGCTGAGCCGCGCTCTCCCTGCTCCAGCAAGGACC  
ATGAGGGCGCTGGAGGGGCAAGGCTGTGGCTGCTGTGGCTGGTGTGGCGCTGCGTGGC  
CTGCTGCGGCTGCGGCTGTAGCGGAGTGGCAGAAACACCTACCTACCCCTGGCGGGAC  
GCAGAGCAGGGAGCGGCTGTGTGGCGCCAGTGGCCCCAGGCACTTTGTGAGCGG  
CGTGGCGCGGAGACAGCCCCACAGCTGTGGCGCTGTCCACCGGCACTACAGGAG  
TTCTGGAACCTCTGAGCGCTGCGCTACTGCAACCTCTCTGCGGAGCGCTGAGGAG  
GAGGACCGGCTTGCAAGCCACCCACAACGCTGCGCTGCGCTGCGCACCGGCTTTTC  
GCGCACGCTGGTTCTGCTTGGAGCAGCATCGTGTCCACCTGGTGGCGCGTATTGCC  
CGGGGACCCCCAGCAGAACACGAGTGCCAGCGCTGCCCCCAGGCACTTTCTAGCC  
AGCAGCTCCAGCTCAGAGCAGTCCAGCCCCACCGCAACTGCACGGCCCTGGGCTGGCC  
CTCAATGTGCCAGGCTCTTCTCCATGACACCTGTGACACAGCTGCACTGGCTTCCCC  
CTCAGCACCAAGGTACCAAGAGCTGAGGAGTGTGAGCGTCCGCTCATCGACTTTGTGGCT  
TTCCAGGACATCTCCATCAGAGGCTGCAGCGGCTGTGAGGCGCTCGAGGCCCGGAG  
GGCTGGGCTCCGACCAAGGGCGGGCGCGGCGCTTGCACTGAAAGCTGCGTCCGCGG  
CTCACGGAGCTCTGGGGCGCAGGACGGGGCGCTGTGTGCGGCTGTGAGGCGCTG  
CGCGTGGCAGGATGCCCGGCTGGAGCGGAGCGTCCGTGAGCGCTTCTCCCTGTGCAC  
TGATCCTGGCCCCCTTTATTTATTCTACATCCTTGGCACCCCACTTGCACTGAAAGAGG  
CTTTTTTTAAATAGAGAAATGAGGTTCTTAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 6

MRALGEGFLSLLCLVLALPALLPVPVAVRGVAETPTYFWRDAETGERLVCAQCFFPGTFVQ  
RPCRRDSPTTCGFCPPPHYTQFWNYLERCRYCNVLCGEREEARACHATHNRACRCRTG  
FFAHAGFCLEHASCFFGAGVIAFGTPSONTQCQCPFFGTFSSASSSSSQCPHRNCTAL  
GLALNVGSSSHDTLCTSTGFFLSTRVPGAEECERAVIDFVAFQDISIKRLQRLQAL  
EAPFGWGPTFRAGRAALQLKRRRLTELLGAQDQALLVRLQALRVARMFGLERSVREK  
FLFVH



WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 7

CACAAGCATCTTAATTGGAATCCACAAGTTTCATGTAATGAAAAGAAATACATRAATTT  
AATTCAACCCGAGTGTTCACAGAGAGATTGTATTGCTTAAATTGCTACAGTAATTCAA  
GAGACAGCCCTGTCTGGACACAGAGTTACTGTGGATTTTAAAGAGACTCAGTTAAAGAAT  
TTAGGAATTTCTGATTCAATTTAAAGGATTTACAAATTCATCAACCCCTGAAAACATAAAGC  
AAATTGAACAGGAAAAAAGAGAG  
ATGGGTTTTTAAAGTCCAAATATATGTTATTTTCTCTTTTTTGGAGTCAAAGTACATTGC  
CAATATGAAACTTATCAGTGGGATGAAGACTATGACCAAGAGCCAGATGATGATTACCAA  
ACAGGATTCCCATTTCTGTCAAAATGTAGACTACGGAGTTCTTTTCAATCAGTATATCTTTA  
GGCTGTGTGAGTGAATGTTCTGTCCAACTAACTTCCATCATCAATGTACTGTGATAAT  
CGCAACTCAAGACTATCCCAATATTCCGATGACATTCAGCAACTTACCTTCAGTTC  
AATGAATTTGAGGCTGTGACTGCAATTCATTGATCAATGCAACTCATCTTAAAGAAATT  
AAGCTCAGCCACAACAAATTAATCTCAAGAGATTGATTATGGTGTCTTGTCTAAGCTT  
CMAATCTACTACACTTCTATAGAGCATATAATTAGAGAATTTCCATTTCCCTCTT  
CCTAAATCTCTGGAAAGACTCTCTTGGTTACAATGAAATCTCCAACTGCAGACAAAT  
GCTATGGATGGGCTAGTAACTGACCATGCTTGATCTCTGTATAATTTCTTCTCATGAT  
TCTCTGTATAAAGACAAATCTTGCCAAATGGAAAACTAATGCAGCTCAACCTCTGC  
AGTAACAGATTAGAAATCAATGCCTCTGGTTTGCCTTCTTCACTTATGTATCTGTCTTTA  
GAAATTAATTCAATTTCTCTATACCGAAAAATACTCGACAACTTCCAAAACCTCAT  
ACTCTAAGAAATGTACACAACTACAGACATCCCATATAATTTTAACTCTCCC  
AACATTGTAGAACTCAGTGTGGACACAACTAAGAGCAAGCATTTCTATATCCAAAG  
AATTTGGAAACCTTATCCTACAAAATATGAATAGAAAAGATGAATCTTACAGTGAAG  
TGTCTTCTATTGACCCACTACATTACCACTTTAAACATACATTGCTGTGACCAAAAT  
AACTAAAAGAACCAATAGCTCATACATCTTCTTCTGCTTCCCTCATATACACACTATT  
TATTATGGTGAACAGAGCACTAATGGTCAACAAATACAACTAAAGACAAAGTTTC  
AGGAGATTTCCAGATGATGATGAAGTGAAGATCAAGATGATCTGACAAATGCTCAT  
GAGAGCCCAAGACAGAGAGGAGCAGAGGGCACTTTGACCTTCATTATT  
ATGAAATCAAGAAATAGCAAGAACTATATAGGTATACACTTACGACTTCACAAAACCTA  
TACTTAATATAGTAATCTAAGTAAACATGTATTACTCAAAGTAATATATTAGAAATTAT  
GTATTAGTATAAGATCAGAAATGAATTTAAGTTGTTGGTGAACATCTGCATCATTTCATAG  
GATTAGAACTTACTCAAAATATGTAAATCTTTAAAAATATAAATTAGAAATGACAAAGTGG  
GAATCATAAATTAACGTTAATGTTTCTTATGCTCTTTTAAATATAGAAATATCATGT  
TAAAGAAAAAAGAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 8

MGFLSPIYVIFFFFGVKVHCQYETYQWDEDVDQBPDDDYQTGFPPFRQNVYGVPPRQYTL  
GCVSECTCPTNFPSSMYCDNRKLTIPNIPMHIQQLYLQFNSIEAVTANSFINATHLKEI  
NLSHNKIKSKIDYGVFAKLPNLLQLHLEHNNLEFPFPLPKSLERLLLGYNBISKLTQ  
AMDGLVNLTMLDLCYNLHDSLLKDKIFAKMERLMQLNLCNRLDSMPGLPSSLMYLSL  
ENNSISSIPEKYFDKLPKLTLMRSHNKLQDIPYNI FNLPNIVELSVGHNKLKQAFYIPR  
NLEHLVLQNNIEKMNLTVMCPSIDPLHYHHTYIRVDQNKLEPISSYIFFCFPHINTI  
YYGEQRSTNGQTIQLKTQVFRFRFPDDDDSSDHDOPDNAHESPEQEGAEHFDLHYENQ  
E

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 9

CCCAAGCCAGCCGAGCCGCCAGAGCCCGGGCCGCGGGGGTGTGCGGGGCCAACCCAG  
G  
ATGCTCCCTCGCCCTCTCTACCCGGTCTCTACTGCTCTGGGCGCTGCTACTGTTG  
CTTTGGGATCAGCTTCTCCTCAGGATTTCTGAAGAGCCCGACAGCTACACGGAATGCACA  
GATGGCTATGATGGGACCCAGAGCCAGCACTGCGGGATGTCAACGAGTGTCTGACC  
ATCCCTGAGCCTGCAAGGGGGAATGAAAGTTCATTCAACCACTACGGGGGCTACTGTGC  
CTGCCCGCTCCCGCTCCCGTCATCAACGACCTACATGCGGAGGAGCCCGCCACCACTG  
CCTCCGCTCAACACCCCAACCCCTGCCACCAAGGCTATGAGCCGACGATCAGGACAGC  
TGTGTGGATGTGACGAGTGTGCCAGGCGCTGCAAGACTGTGCGCCCGAGCCAGGACTGC  
CATACTTGGCTGGCTCCTATCAGTGACCTGCGCTGATGTTACCGCAAGATCGGGCCC  
GAGTGTGTGACATAGACGAGTCCGCTACCGCTACTGCGACGACCGCTGCTGAACCTG  
CCTGGCTCCTTCCGCTGCGAGTGCAGCCGGGCTTCCAGCTGGGGCTAACACCGCTCC  
TGTGTTGATGTGAACGAGTGTGACATGGGGGCCCTCATGCGAGCAGCGCTGCTCAACTCC  
TATGGGACCTTCTGTGTGCTGCCACCAAGGCTATGAGCTGCATCGGGATGGCTTCTCC  
TGCACTGATATTGATGAGTGTAGCTACTCAGCTACTCTGTGATGAGCTGCTGCTCAAC  
GAGCCAGGCGCTTTCTCCTGCCACTGCCACAGGGTTACGAGCTGTGGCCACACGCTC  
TGCCAAAGCATTGATGAGTGTGAGTCTGGTGGCACCAGTGTCTCGAGGCCAAACCTGT  
GTCAACTTCCATGGGGGCTACCGCTGCGTGGACACCAACCGCTGCGTGAGGCCCTACATC  
CAGGTCTCTGAAGACGCTGTCTCTGCCCGGCTCCAAACCTCTATGTGAGAGCAGCCT  
TCATCCATTGTGACACGCTACATGACCATCACCTCGAGCGGAGCGTGGCCGCTGACGTG  
TTCCAGATCCAGGCGACCTCCGTCTACCCCGGTGCTACAAATGCCCTTCAGATCGGTGT  
GGAAACTCGCAGGGGGACTTTTACATTAGGCAATCAACAACGTGAGCGCCATGCTGGT  
CTGCGCCGCGCGGTGACGGGCCCGCGGGAGTACGTGCTGGAACCTGGAGTGGTCAACATG  
AATTCCTCATGAGCTACCGGGCCAGCTCTGTACTGAGGCTCACCGTCTTTGTAGGGGCC  
TACACCTTCTGAGGAGCAGGAGGGAGCCACCTCCCTGCACTACCTAGCTGAGGAGCC  
TGTTGTGAGGGGCAGAAATGAGAAAGGCAATAAAGGGAGAAAGAAAGTCTGCTGCTGAG  
GTGGGGGGTCAACTGCAGGAAGCCTCAGG  
CTGGGGCAGGTGGCACTTGGGGGGCAGGCCAAGTTACCTAAATGGGGGTCTCTATAT  
GTTCAAGCCAGGGGCCCCATTGACAGGAGCTGGGAGCTTGCAACACGAGCTTCAGT  
ACCCGAGAGGAGAGGAGGTAAACGAGGAGGGCGGACTCCAGGCCCGGCCAGAGATTG  
GACTTGGCTGGCTTGAGGGGCTCTAAGAACTCCACTCTGGACAGCGCCAGGAGGCCCT  
GGGTTCATTCTTAACCTTGCCTCAAACTGTACATTTGGATAAGCCCTAGTAGTTCCTG  
GGCTGTTTTCTATAAAACGAGGCAACTGGAAGAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 10

MLPCASCLPGSLLWALLLLLLLGSASPQDSSEPDSTECTDGYEWDPSOHCRDNECLT  
IPEACKGEMKINHYGGYLCIFRSAVINDLHGEGPPPPVPPAQHPNCPGPGYEDDQDS  
CVDVDECAQALHDCRPSQDCHNLPSSYQCTCPDGYRAIGFECVDIDECRIYICQHRVNL  
FGSFRQCEFGQLGPNRSCVDVNECDKAPCEQRCFNSYGTFLCRCHQSYELHRDGS  
CSDIDBCSYSSYLQYRCVNEPGRSCHCPQGIQLLATRLCODIDECESGAHQCEAQT  
VMFRGGRKVDVNRCEPTIQVSENRLCPASNPLCRBQPSIVHRYMTITSERVPAIV  
FOIQATSVYFGAYNAFQIRAGNSQGDFFIRQINNVSAMVLARPVTCGREYVLDLEMVTM  
NSLMSYRASSVLRLLTVFVGAYTF

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 11

GGGAACGGAAA  
ATGCGCGCTCACGGCCCGGGTAGTCTTACGACCCCTGGTGCCTGGGCTGCCGCCCTGCTC  
CTCGCTCTGGGCGTGGAAAAGGGCTCTGGCGCTACCCGAGATATGCACCCATGTCCAGGG  
AGCGTGCAAAATTTGTCAAAAGTGGCCTTTTATTGTAAAAAGACACGAGAGCTAATGCTG  
CATGCCCGTTGCTGCTGAATCAGAAGGGCACCATCTTGGGGCTGGATCTCCAGAACTGT  
TCTCTGGAGGACCTGGTCCAAACTTTCATCAGGCACATACCACTGTCTATAGACCTG  
CAAGCAAAACCCCTCAAGGTGACTTGGCCACACCTTCCGTGGCTTTACTCAGCTCCAG  
ACTCTGATACTGCCACAACATGTCAACTGTCTGGAGGAATTAATGCTGGAACTATC  
ACCTCTTATATAGACACCAAAATCTGTCAAGGCAAAAGAACCTTTGCAATAACACTGGG  
GACCCAGAAATGTCTCTGAGAATGGATCTTGTGTACCTGATGGTCCAGGTCTTTTGCAG  
TGTGTTTGTGCTGATGGTTTCCATGGATACAAGTGTATGCGCCAGGGCTCGTTCTCACTG  
CTTATGTCTCTCGGGATTCTGGGAGCCACCACTCTATCCGTCTCCATTCTGCTTTGGGCG  
ACCCAGCGCCGAAAAGCCAAAGACTTCA~~TGA~~ACTACATAGGTCTTACCATTGACCTAAGAT  
CAATCTGAACATCTTAGCCCAAGTCAGGGAGCTCTGCTTCCTAGAAAGGCATCTTTGCGC  
AGTGAATTGCGCTCAAGGTTGAGGCGGCCATTGGAGATGAAAAATTGCACTCCCTTGGT  
GTAGACAAATACCACTTCCCATTTGGTGTGTTGCCTATAATAACACTTTTTCTTTTIN  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 12

MAPHGPGSLTTLVPWAAALLALGVERALALPEICTQCPGSVQNLKVAFYCKTTREML  
HARCCLNQKGTILGLDLQNCSEDPGPNFHAHTTVIIDLQANPLKGDLANTRGFTQLQ  
TLILPQHVNCPPGINAWNTTTSYIDNQCQGGKNCNNTGDPMECPENGSCVPDGPGLLQ  
CVCADGFHGYKCMRQGSFSLMFFGILGATTLVSILLWATQRRKAKTS

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 13

CGAGGGCTTTTCGGCTCCGGAATGGCACATGTGGGAATCCAGTCTTGTGGGTACAAAC  
ATTTTCCCTTTCCCTAACAGTTCTAACAGCTGTTCTAACAGCTAGTGATCAGGGGTTCT  
TCTTGTGGAGAAAGAGGGCTGAGGGCAGAGCAGGGCACTCTCACTCAGGGTGACCAGC  
TCTTGTCTCTCTGTGGATACAGAGCATGAGAAAGTGAGAGATGACAGGGAGTGAGGT  
GATGGAAAGTCTAAAAATAGGAAGGAATTTTGTGTCAATATCAGACTCTGGGAGCAGTTGA  
CTTGGAGAGCTTGGGGGAGGGGCTTCCCTAACAGCTTTCAAAAAACAGGAGCGACTTCCA  
CTGGGCTGGGATAAGACGTGCCGTAGGATAGGGAGAGCTGGGTTTAGTCTTAATATCAA  
ATTGACTGGCTGGGTGAACCTTCAACAGCTTTTAACCTCTCTGGGAGATGAAAACGATGG  
CTTAAGGGGGCCGAAATAGAGATGCTTTGTAAAAATAAATTTTAAAAAAGCAAGTATTT  
TATAGCATTAAGGCTAGAGACCAAAATAGATAACAGGATTCCCTGAACTTCTTAAGAGG  
GAGAAAGTATGTAAAAATAGAAAAACCAAAATGCAGAAGGAGAGACTCACAGAGCTAA  
ACCAAG  
ATGGGGACCTGGGTGAGGCCAGCTCTTGTCTCTCCCGAAATTTTGTGTCTGAC  
CCTCTGCTTGTGTTTTCAGAAATCATGTGAGGGCCAAACCGGGAGGTGGAGCAGATG  
AGCACACACAGGAGCGTCTCTCAACCGCGCCCTCTCAGCATGGAACAGAGGAGCGCC  
TGGCCCGGGSCCTGGAGGTGGACAGCGCTCTGTGTCTCTGCTCTCAGTGTCTGGGTG  
CTGTGGCCCCCAGCAGCGGCACTGCTCAGTTCAGCACTTCCACTCTGAGAATCGT  
GACTGGACCTTCAACCACTTGACCGTCCCAAGGGACGGGGCGCTCTATGTGGGGCC  
ATCAACGGGTCTAATAGCTGACAGGCAACCTGACCTCCAGTGGCTCATAGACAGGG  
CCGAGAGAGGACACAAAGTCTCGTTACCGCCCTCATCGTCAGCGCTGACGCAAGTG  
CTCACTCTCACCAATGTCAACAGCTGCTCATCTGACTACTCTGAGAACCGGCTG  
CTGGCTGTGGGAGCTCTACAGGGGCTGTGCAAGCTGTGCGGCTGGATGACCTCTTC  
ATCTGTGTGGGACCTCCCAAGAGGAGCACTACCTGTCAGTCTCAACAGAGCGGGC  
ACCATGTACGGGTGATTGTGCGCTCTGAGGGTGAGGATGCGAAGCTCTTCACTGGCAG  
GCTGTGATGGGAGCAGGATTACTTCCCGACCTGTCCAGCGGAGCTGCCCCGAGAC  
CCTGAGTCTCTCAGCATGCTCGACTATGAGCTACACAGCGATTTGTCTCTCTCTCATC  
AAGATCCCTCAGACACCTGGCCCTGGTCTCCCACTTTGACATCTTCTACATCTACGGC  
TTTGTAGTGGGGCTTTGTCTACTTTCTCACTGTCCAGCCCGAGACCCCTGAGGGTGTG  
GCCATCAACTCCGTGGAGCTCTTTACACCTCAGCATCGTGGCTCTGCAAGGAT  
GACCCCAAGTCCACTCATAGTGTCCCTGCGCTTGGCTGACCCGGGCGGGGTGGAA  
TACCGCTCTCTCAGGCTGCTTACCTGGCAGGCTGGGGCTCACTGGGCCAGGCTTTC  
AATATCACAGCAGGACGATGTACTCTTTGCCATCTTCTCAAGGGGCAAGAGCAGTAT  
CACCACCGCCCGGAGCTCTGCCCTGTGTGCTTCCCTATCCGGGCCATCAACTTGCAG  
ATCAAGGAGCGCTGCACTCTGTCTACAGGGCGAGGGCACTGGAGCTCAACTGGCTG  
CTGGGAGGAGCGTCCAGTGACGAGGGCGCTGTCCCATCGATGATAACTTCTGTGGA  
CTGGACATCAACAGCCCTGGGAGGCTCAACTCCAGTGGAGGGCTGACCTGTACACC  
ACCAGAGGGACCGCATGACCTCTGTGGCTCTCTACGTTTACAACGGCTACAGCGTGGTT  
TTTGTGGGACTAAGAGTGGCAAGCTGAAAAAGGTAAGAGTCTATGAGTTTCAAGTCTCC  
AATGCCATTCACTCTCAGCAAGAGTCCCTCTTGGAGGTAGCTATTGGTGA  
GATTTAATATAGCACTTATTTCTTGGGGAACAAAGGTTGAATGGGAGGTAAAGAA  
GGGTTAATTTTGTGACTTAGCTTCTAGCTACTTCTCCAGCCCTCAGTATTGGGTATG  
TAGGAATGCAGCGTATTTCATATTTTCCAACTTTAAGAAAAACTTTAAGAGGTA  
CATCTGCRAAGCAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 14

MTLQASLFAPPNGYFWSDEHSLCFAESCCEGQPGKVEQMSTHRSRLTAPLSMEQROP  
WFRALVDSDRSVLLSVWWLLAPPAAGMPOFSTFHSENRDWTFNHLTVHQGTGAVYVGA  
INRYKLTGNLTICVAHKTGPEDNKSRVPLIVQPCSEVLTLNNWNKLLIIDYSENRL  
LACGSLYQGVCKLLRLDDLFLVFPFHKKEHYLSVNNKTGTMYGVIVRSEGEDGKLFICT  
AVDCKQDYFFTLSSRKLPRDPSSAMLDVELHSDFVSSLIKIPSDTLALVSHFDIFYIYG  
PASGGFVYFLTVOPEFTEGVAINSGDLFYTSRIVRLCKDDPKFHSYVSLFPGCTRAGVE  
YRLQAAYLAKPGDSLQAQFNITSQDDVLFAPSKGQKQYHHPDDSDALCAFFIRAINLQ  
IKERLQSCYQGEKNLELNWLLGKDVQCTKAPVPIDDNFCGLDINQPLGGSTPVEGLTLVT  
TSRDRMTSVASYVYNGYSVVFVOTKSGKLKKVRVVEFRCSNAIHLLSKESLLEGSYWWRF  
NYRQLVFLGEQR



TCCAGAGGTTCTCAAGGCGCCCGGGCTCTCGCTGCTCTGCGCCGGGAACCTTCGACCTCTCT  
 CAGAGCAGCGCGCTCGCGCCCGGGAAG  
**ATG**CGCAGGAGGAGGCGCCGACCGCTCTCTCTGCTGCTGCTCGCTCATCTGGTGTGTGCGC  
 CTGGGCTATCTAATGGCCCTATGGGTTTCTCGTCCCAAAAGACCAAGATGTGTCACAGCA  
 GTAGATGTACCAACGAGGCTATTTAGCTCTGCAAAACCCAAAGAGACTGTTCTCCCGACA  
 TAGAGTGTGAGAAATCTGGGTCTGCGAGTGTCTCTTTGTCTATCTACATCAACAGACTCTCAA  
 GGTATTTTAAAAATCGAGCTGAGATGTAGATTTCATATCCGGATCAAAATGTGACAC  
 AGAAGTGATGCGGGGAAATCTGTGTGAAGATGGTGGCCCATCTGAGCAAGCGCAACCA  
 CTGAGAGGAGGATACAGCTACATCTGGAGTAATGTAGTGGCTCCAGAGCTCCATCATCTGTGA  
 TACCTCTTCTCTGCTGTAGTGTGAATCTGTGGTAGAGTGCATGTGTACAGACAAGAAGAGG  
 AATCTCGGCTCTGATATACATAGTTTAAAGATGATGATCGTTTGTGAGAAATCCCGACA  
 CTGCGCTCCAAAGACCAACAGCTCATACACAGATGCATACAAATCCGGAACTCTGCAT  
 TTATATATCTTCTCAAATCGGACATCGGAATATCTCTCTGTAAGCCCGCAATCTTGT  
 GATATCTCGAGTGTCTCTGGGAAGTGGAGTCAAGTAGATAGTCTACACATAGATGGTCACT  
 ATATCTGAGAGTGTAGTGTCTGGCTTTAGTGAATTTCTGGTTTGGGCTCTGGTGTATGCTAT  
 CTCTCGAGAGTGGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGCTGCA  
 AGAGTAAATCTTCTATCTAAGCCGACCAATGAGTGAATTTCTGAGTGGCTCAGCGCT  
 GTATCCCGACCATCTTGAAGACCGCCGCGCGCGGATCAGCGTTCAGAGTGTCTTAGCC  
 AGTCTGAGCCCAATATGTGAAACCCCATCTCTAAATGAACAAAAATAGTCTGCGCTGATG  
 TGGATGTGCTCTGCAATCTCGAGCTGCTCTGGGAGACAGAGAAATCATGGAACCCGAGAG  
 CGAGATGTGAGCTGAGCTGAGCTGAGTACAGCCCATCTGAGTCCCTGGGTATCAGACAGAA  
 TTCCATCTCAAAAATAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATCTGCTTTTACTCTGTAGAATT  
 TACTAATAATAATAGCTGATATTC

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 16

MARRSRHRLLLLLRYLVVALGYHKAYGFSAPKDQQVVTAVEYQEAJLACKTPKKTVSSR  
LEWKKLGRSVSFVYYQQLQGDFKNRAEMIDFNIRIKNVTRSDAGKYRCEVSAPSEGGQN  
LEEDTVTLEVLVAPAVPSCEVPSSALSGTVVELRCQDKEGNPAPEYTWKDGIRLLENPR  
LGSQSTNSSYTMNTKTGTLQFNTVSKLDTGEYSCEARNSVGYYRRCPGKRMQVDDLNISGI  
IAAVVVVALVISVCGLGVCYAQRKGYFSKETSFQKSNSSSKATTMSENVQWLTVPVIALW  
KAAAGGSRGQEF

PCT/US00/05841

Figure 17

CTGGGCGGCGCCCGAGCTCCGCGCTGAGCGAGAGCAACATGCGCACTGGCTGGCGGTGCTG  
 CTGGCGGGTGTCTTGCGCTCTTGCTGTGTGAGCTTGGAAGTCTT  
 CGGGTGTGTGCAACTGAAGCTCGCAGAGGTCTGTCCAAACAGAAAGGAGGCTCTGGGGAAACCCG  
 AATTBCTGTCCGCGGGGGCGCGGGCCACCGCGTGGCTGCTCGGCTCTTCTTCGGGTGT  
 TGCTCTCAAGCACTACAGCAGCGCACTGCTTCCCGAGCGCGCTCTCACTAGCGACGAGTCC  
 TGACCCCGCTGTGGGGCTGAGCTCTTCACTGTGCCGACGGCGGGGGCGCGACCTCG  
 GCGTTCGACCAACCCATCTGCTCTCCCTTCGSGTCTCACTGGCGGGGCACTCTCTCTCTGT  
 ATTATTGAAGCTCTTCACACAGATTCTCTGTAGACTCTGCGACAAACAAAGGCAAGAAAG  
 CATTATCGACGCGCTGGCAACCGAGGAGCACTGACGGTGGGCGAGGATGTGTGTCGACGAG  
 CTGACAGCAGCGGACGACAGCACTAGTACTCTTACCGCTGTGTGTGACGAACAC  
 TACTACAGGAGGGGTCTGCTTGTTTTCGCGCTCCCGGAGACGATGCTCTCGGCACCTTC  
 CTTCTGGGAGGCTGGGGAGAAAGTGTGCAACCTGGTGAAAGAGGCACTATGCAAC  
 GAGCCGACTCTGCTCGTGATGTGTAGTAGCAGACATGGAATTTGTGATACCAAGGGGAA  
 TGCAAGTGCAGAGTGGGTGCGAGGGCGGATATGTGACGATATTCCTGCGATCAAGG  
 TGTTCTGTGACGCACTCGTCGACGAGCTCGGACGTCAACTGTCCAGGAAGGCTGGGGGGGG  
 CTTTCTGTCAACAGGACCTGACTGATCTGACACACCAATAGCCGCTCGAAGATGGAGCG  
 ACCTGCAACCAACAGCGCGAGGGGATCACTTCTGCTCTGGCGGCTGGGTACAGAGGT  
 GCGCACTGCGAGCTGGGGATGTGACGAGTGTGACCGAGCGCTTTGAGAAAGCAGGGAGGG  
 TGACCGAGTCTGGAAGACGACTGCTCTGTGACTGCCACCCGGCTCTTACGCAAAATCT  
 TGTGAATTTGAGTGCTGACTGACCTGACGAGCGCGCTCTGCTTTAGAGGGGGTGTGTGTG  
 GACAGCACTGATGTGAGGGGTACAGCTCGCTCGCGCGGTGGGCTACCGGCTTACGATGT  
 GACAGCACTATGTGCTGTGAGTGTGCTGCTGTGAGCTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAG  
 CGGGTGTGAGTGTGCTGTGCTGTGCGACGGCGGCTGGGGGGGCTGTGACGCT  
 AACGCTGTCTCTGCACTCTCCGCGCTGSGTCAACGCGACAGCACTGCACTGCCCGCT  
 CGCGAGGTGCGAGCACCGGCTCGCAACATGAGGGCCACTGTCCAGAGAGGGGCGACCG  
 TATGTGTGCAAGTGTGCCCGAGGCTACCGGGGCTCCAACTGAGCTTCTGCTCCCGAG  
 CTGCGCCGGGCGCGCGAGCTGGTGAGCTCTCACTGAGAAGCTAGAGGGCGAGGGGCGGCCA  
 TCTCCCTGGTGTGGCGGTGTGCGCGGCTGACCGGCTATCTCTGTCTCATCTGCTGGGCTGT  
 GCGCTGTGTGTGTGTCTGCTCGGCTGAGGCTGAGGCTGCGAAGACCGCGCCCCAGCGACCC  
 TCGCGGGGGAGACGGAGACATGAACAACTGGCCACATCTGCAAGCTGAGGAAGAGACAT  
 TCAGTTCAGCATCTCTCGGGCGCAGCAGTCAAGAACCAACCAAGAGGCGGAACTCCAC  
 GGGACAGCAGCAGCGCCGACAGAATGGCTTCAAGGCCCGCTACCAGCGAGCTGATTAAC  
 CTCTGTGACGACCTCAAGGTTGACACACCGGCTGACGGGCGCGACACCAAGCTGTG  
 ACCAAGTGCAGCCCGCAGGGGTCTTCAGGGAGGAGAGAGAGGCGCCAGCACCACTAG  
 GTGGTGAAGAGCATTTGAAGAAAGAGCGGAAGCTGGGCTGTTCATCTCAAAGACACCG  
 AGTATCAAGCTCGGTGTGACTGCTATCTCGAGGAGAGGATGAGTGCTGCACTGAGCTGAG  
 GTGTAATAAGTGAAGTGAAGTGTGCGAAGCTCGGTTCTTCTTAAATAAGTAAATTTCCAA  
 GGATATGTGATGCCCAACGATGATGCTCGTAGAGGAGGGAGG  
 CTCGTGGAGCTCTGCTGTGAAACACGAGTTTCAGGCGCGAGGCTTCTCTCTCTGAGGCTC  
 TGACGCTGCTCGACGACGCTCTCGCGGGCGCGCGCTCGCGCACTCTCTCTCGGTGAGCT  
 CGCTCTGCTGAGGAGGCTGCTGAGTGTGCAAGGAGGATATATTTATTTAGGAGAGTGAAG  
 CGCTGATGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 TCTCTGATATGAGAAACCAACACGCTCTTATTGTCTCTTTGATAGGAAGATGTGCTT  
 TTTCTAGATGGAAGAAGATGTGTGATTTTGTGATTTGAAATTTGAAATAATTTTCTCATGAT  
 CTGAAAGCTTGAGATTTGTGTATTTGTGTTTCTTTATATTTAAATTTTGTGAAATAATG  
 TACAAGAGCACTTCGGGTCTGATGTACATATTTTCTTTGATATATAAGTATTTATGGAAG  
 TGTGTGCAAAATGTTTATGAGTTTCTTTACTGTTTGTGTAATGAAGAATTTCTTTTAAA  
 AATATTTTTCAAAATATATTTTATGTATGACAAAATTTAAAAATTTAAAAATTTAAAA  
 AAAAAATTTAAAAATTTAAAAATTTAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 18

MSSRCALALAVLSALLQVWSSGVFELKIQEFVNKKGLLGNRNCCRGAGPPPCACRTF  
FRVCLKHYYQASVSPEPCTYGSVTPVLQVDSFSLPDGGGADSAFSPNIRFPFGFTWPG  
TFSLIIEALHTDSDDLATENPERLISRLATORHLTVGEWSQDLHSSGRTDLKYSYRF  
VDEHYHGECCSVFCRPRDDAPGHFTCGERGERVCNPGNKGYPCTEPICLPCCDEQHG  
CDKPSBCKCRVQWQGRYCDCEIRYFGCLHGTCCQFWQCNCQEGWGLFCNQDLNYCTHH  
KPCXGATCTNTGQGSYTCSCRPGYTATCELGIDECDSPPCKNGGSCDLENSYSCTC  
PPGFYGIKICELSAMTCADGPCFNGGRCSDSFDGGYSCRCFVGYSGFNCEKKIDYCSSP  
CSNGAKCVDLGDAYLCRCQAGFSGRHCDNVDDCASSPCANGGTCRDGVNDFSCTCPPG  
YTGRCNCSAPVSRCEHAPCHNGATCHERGHRYVCECARGYGGPNCQFLLELPFGPAVVD  
LTEKLEGQGGPFPWVAVCAGVILVLMLLGCAAVVVCVRLRLQKHPADPCRGSETETM  
NNLANCQREKDISVSIIGATOIKNTNKKADFGHDSADKNGFKARYPAVDYNLVODLKG  
DDTAVRDAHSKRDTKCQFQSSGEEKGTPPTLRGGEASERKRPDSGCSTSKDTKYQSVY  
VISEEKDECVIATEV

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 19

GCGGAGACAAGCGCAGAGCGCAGCGCACGGCCACAGACAGCCCTGGGCATCCACCGACGG  
CGCAGCCGCGAGCCAGCAGAGCCGGAAGCGCGCCCCGGGCAGAGAAAGCCGAGCAGAGCT  
GGGTGGCGTCTCCGGGCGCGCGCTCCGACGGGCGCAGCGCCCTCCCC  
**ATGTCCCTGCTCCACGCGCGCGCCCTCCGGTCAGCATGAGGCTCCTGGCGGCGCGCTG**  
**CTCTGCTGCTGCTGGCGCTGTACACGCGCGTGTGGAAGGTC****CAATGCAAGTGCTCC**  
**CGGAAGGGACCCAGATCCGCTACAGCGACGTGAAGAAGCTGGAAATGAAGCCAAAGTAC**  
**CGCACTGCGAGGAGAGATGGTTATCATCACCACCAAGCGGTCCAGGTACCGAGGT**  
**CAGGAGCACTGCCTGCACCCCAAGCTGCAGAGCAACCAAGCGTTTCATCAGTGGTACAA**  
**GCCTGGAACGAGAAGCGCAGGCTCTACGAGAGATAGGCTGAAAACTCAGAGGGA**  
**CTCCAAACAGTTGGGAGACTTGTGCAAGGACTTTGCAATTAAAAA**  
**AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCCTTTCTTCACAGGCATAGACACAAAT**  
**ATATATTGTTATGAAGCACTTTTACCAACGGTCAGTTTTACATTTATAGCTGCGTGC**  
**GAAAGGCTTCAGATGGGAGACCATCTCTCTTGCTCCAGAC**  
**TTTCATCAGGCTGCTTTTTATCAAAAAGGGGAAACTCATGCTTTTCCTTTTAAAAA**  
**TGCTTTTTTGTATTGTCCATACGTCACTATACATCTGAGCTTTATAAGCGCCCGGAGG**  
**AACAATGAGCTTGGTGGACACATTTATTGCAAGTGTGCTCCATTCTAGCTTGGGAAGC**  
**TTCCGCTTAGAGGCTCTGGCGCTCCGGCAGCTGCCACGGGCTCTCTGGGCTTATGGC**  
**CGGTCAAGCCTCAGTGTGACTCCACAGTGGCCCTGTAGCCGGGCAAGCAGGAGCAGGT**  
**CTCTCTGCATCTGTTCTCTGAGGAACCTCAAGTTTGGTTGCCAGAAAAATGTCCTTCAITC**  
**CCCCCTGGTTAATTTTACACACCTTAGGAACATTTCCAGATCCTGTGATGGCGAGAC**  
**AAATGATCCTTAAAGAGGGTGTGGGGCTTTCCCAACCTGAGGATTTCTGAAGGTTTAC**  
**AGGTTCAATATTTAATGCTTCAGAGCATGTGAGGTTCCCAACATGTGACAAAAACCT**  
**TAGGAGAAAACTTAAAAATATATGAATACATGCGCAATACACAGCTACAGACACATTC**  
**TGTTGACAGGGGAAACCTTCAAGCATGTTCTTTCCCTCACCACACGACATGCA**  
**TACTAAAGCAATATTTGTGATTCCCATGTAACTTCTCATGTTTAAACAGTGCAGTCC**  
**TCTTCGAAGCTTAGATGAGCATGCCGCTTTCTCTGTAGATATACCTTAAGACGC**  
**CCCTCCAGCACTGCCCGCATATATGCCGATTTGATCTGCTGTATATGCTATGT**  
**ACATGTCAAGAACCATAGCATTGCATGCAGGTTTATATTCTTTCAAGATGGAAGTA**  
**ATAAATATATTTGAATGTAAAAA**

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 20

MSLLPRAPPVSMRLAAALLLLLLLALYTARVDGSKCKCSRKGPKIRYSDVKKLEMKPKY  
PHCEEKMIITTKSVSRYRGQEHCLHPKLQSTKRFFIKWYNWNEKRRVYEE

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 21

GGAGAGCGGAGCGAAGCTGGATAACAGGSGACCG  
**ATG**ATGTGGCGACCATCAGTTCTGCTGCTTCTGTTGCTACTGAGGCACGGGGCCAGGGG  
AAGCCATCCCCAGACGCAGGCCCTCATGGCCAGGGGAGGGTGCACCAAGCGGCCCTCTG  
AGCGACGCTCTCCCATGATGACGCCACGGGAACCTCCAGTACGACCATGAGGCTTTCTCTG  
GGACGGGAAGTGGCCAAAGGAATTCGACCAACTCAGCCAGAGGAAAGCCAGGCTCTCTG  
GGCGGGATCGTGGACCGCATGGACCGCGGGGGACGGCGAGGCTGGGTGTCTGCTGCGC  
GAGCTTCGCGCTGGATCGCGCACAGCGACAGCGGCACATACGGGACTCGTGAAGCGCG  
GCCTGGGACACGTACGACAGGACCGCGACGGGCTGTGGTTGGGAGGAGCTCGCAAC  
GCCACCTATGGCCACTACGCGCCCGTGAAGAATTCATGACCTGGAGGATGCAGAGACC  
TACAAAGATGCTGCTCGGACGAGCGCGTTTCGGGTGGCCGACCAAGATGGGGAC  
TCGATGGCCACTCGAGAGGAGCTGACAGCCTTCCTGCACCCCGAGGAGTTCCCTCACATG  
CGGACATCTGTATTGCTGAACCTCGGAGGACCTGGACAGAAACAAAGATGGCTATGTC  
CAGGTGAGGAGTACATCGCGATCTGTACTCAGCCGAGCTGGGAGGAGGAGCGCGCG  
TGGGTGCAGACGGAGAGGCGAGCAGTTCCGGGACTTCGGGATCTGAACAAGATGGGCAC  
CTGGATGGGAGTGAAGTGGCCACTGGGTGCTGCCCCCTGCCAGACCAAGCCCTGCTG  
GAAGCCAAACACCTGCTGCACGAGAGCGACACGACCAAGGATGGCGGCTGAGCAAGCG  
GAAATCCTGGGTAATTGGAACATGTTTGTGGGCGAGTCAGGCCACCACTATGGCGAGGAC  
CTGACCCGGCACACGATGAGCTGTGAGCACCGCGCACCTGCCACAGCCTCAGAGGCCCG  
CACATGACCGAGGAGGGGCGCTGTGGTCTGGCCCCCTCCTGTCCAGGCCCGCGCAGG  
AGGCAGATGCGAGTCCAGGCATCTCTGCCCCCTGGGCTCTCAGGAGCCCTGGGTGG  
CTTCTGTCCCTGTCAACCCCCAACCCAGGGAGGGGCTGTCAAGTCCAGAGGATAAG  
CAATACCTATTTCTGACTGAGTCTCCAGCCAGACCCAGGGACCTTGGCCCCAAGCTC  
AGCTCTAAGAACCGCCCCAACCCCTCCAGCTCCAAATCTGAGCCTCCACACATAGACTG  
AACTCCCCCTGGCCCCAGCCCTCTCTGCTGGCTGGCTGGGACACCTCCTCTCTGCC  
AGGAGGCAATAAAGCCAGCGCGGGACCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 22

MMWRFSVLLLLLLRHGAQGGKPSDAGPHGQGRVHQAPLSDAFHDDAHGNFYDHEAPL  
GREVAKEFDQLTPESQARLGRIVDRMDRAGDGDGWSLAEIRAWIAHTQQRHIRDSVSA  
ANDTYDTRDGRVGEELRNATYGHYAPGEEFHDVEDASTYKMLARDERRFRVADQDGD  
SMATREELTAPLHPPEFPHMRDIVIAETLSDLDRNKDGYVQVEEYIADLYSAEPGEEEPF  
WVQTERQQFRDPRDLNKDGHLDGSEVGHVLPFAQDQPLVEANHLHESDTDKDGRLSKA  
EILGNWNMFVGSQATNYGEDLTRHDEL



PCT/US00/05841

CAAATCTCTGCTGCGGAGAGCCCGACGTGTGACCTTGAATGGAAGAGAGCCGCGG  
 CAGGCGACGTAGACCTGGGAGAGCTGCTGCGGCTGTGGAGGCGCGCTCGACGCGGGGG  
 CGACCGAGGAAGAGGAGAGCTGTGCTGTGCTCCCTCTCTCCATGAGCGACCTGTTGTGAACC  
 GGGAGAGCGCTGGTGGTGGTCCCTTCCCTATCCCTCTCTTATAGAAACACTTCACACT  
 AGAGAGCGGCGCGCGAGCGCGAGGCGCTCATGTGGGAGCAAGGAGCGCGGCTGATCTGAG  
**ATG**AGAGCGCGAGAGCGAGCAAAAGCTGCTGTGTGCTGATCAGCCCTCGCCGAGCGAGCA  
 TCTGATCTCGACACCCCTCGACGACCAATGTCGACAGGCTGAGCGGTGCTGCTGCTGCTG  
 CTGCTGCGTGCAGCTGACCTGACCTGAGCTACCTGTGCTGTGCGAGGCGCGAGGATTGCG  
 CGAATGCGGCGCCACAGCTGAGCGCTGAGCGCCGAGAGAGAAAGATTTCGGAGAGAGAGCGAG  
 CTGTGACTGAGCGCTGAGAGGCGCGGCGCTGTGCACGCGAGCGCTGAGCTGAGTCCCGAGAG  
 GTGCTGCTGTCTGAGAGAGGCGCTGTGACCTGTGCGGATTAATGACCTGAGTGTGCTCCG  
 GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  
 ACCCTGTGATCTCTCCGCGTACGCGCTGGAGACAGTGAACTCTAAACAAAGCTCGC  
 TGACTCTCCGAGGCTCCGAGCAAGAGGCGTTGGAGACTGTGACACACTCAATTAACTCGC  
 TAACTAACTAAACAGCTGACCTTGACGCCCGCTCTCTCGCAAGCGCTGTGATCACTG  
 AGACTATCTGTGCGCAACTATCTCACAAGACTTATGGGCTGACCTTTGGCCACAGCGAGCT  
 TACCTGAGGCTGTGTGATCTGACCAAGCAAAAGCTGCGACGCGCGCGGCTCGCGGAGCAAC  
 AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  
 TCCCGCAAGCACTGCGCGCTGTGATACAGCTGCGATCTCAAGACAGCTCAAGCTCGAGAG  
 AGATCTCCCGCGGGGCTCTCAGCGAGCTGAGCAGCTGTGCGAGACTTACCTGTGAGAAC  
 AACTACTGTGACTGTGCGAGGCGCTGGAACAAGAGACTCTGTGAAGAGCTCTCAGCGCTGAG  
 TACTGTGATCTGTGACCAACAACACTCTGTGGGTCGCGAGCTGGGCTCGCGAGCGCTG  
 GTCTGCTGCACTTGGGAGAGAGAGCGCATCGAGAGCGTGGAGCGGAGATGTGTGTCGCCCC  
 ATGTCGCGCTGAGAGTACTGCTGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  
 GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  
 GAGAGCGCTGCCCATGCGCGAGCTCGCGCGCTGGCAGCACTCATGATCTGTGACACACAG  
 ATCAGCAAGATTTGGCGCGGAGAGCTTGGCCACAACCTTCTCGAGGAGAGCTCAAACTCT  
 GCTCAACAGCACTCGACACGAGCAAGGTGACGACCGGAGAGCTTCGGAAGAGTGCCTGCT  
 CTGTGCTGTGCGACTGTGGGCAAGCTGTGGGCAACCGGCTGACAGCTGCACTGGGCTGTGCG  
 AATGTCTATGTTGTGAAGGTCAAGCGCAATGAGCTGGGCTGCTTGTGAGAGGCGGAGT  
 CGCGGCGCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  
 GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  
 CAGCTCAAGAGTCTGGGCTGGGCTGCTGAGCTATCGACCTCTGAGACTCGCGGAGT  
 CAGCTCAAGAGATCCCGAGGAGGCTCCCGAGACTCATGAGTAACTGTACTGTGCAAGAC  
 AACAGAGATGTGGCGGTGCGCGGAGTCTGCTGAGCTACAGGCCAACTCAAGAGGAGTAT  
 TCTTCAGGTTTAAACAGCTGGCTTGGGCTGAGTGTGAGACAGTGCTTCCGAGAGAGTGT  
 TGGAGCTCGAGGCTTGTGACATTAAGGCAAGCTAGAGTTGTGTGACATTCAAAGGAC  
 CTGTGGGCTTGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  
 GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  
 TGGTAAAGTCTGTGGCGCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  
 CAGAGATCAGCATGACAGCTCGCGCTGTGCTGTGCACTGTGCTGCTGTCTGTCTGGAG  
 GAAGACAGCAAGGATATCATGCTGTGTGGCGAGTGTGCTGCCACTCTTGGAACTCAACA  
 AAGCTGTGCTTTATCTGCTCCACTATATGAGAGAGAGAGAGCTCAGAGCTGTGGCTCT  
 GCGTGTGGCCCAACCTGCTCTCGAGTGTGGGAGCTGAGCTGTGCTGAGAGTCTGCTCTCT  
 GCGCGCGCTGTGGAGAGACAGGCACTTTTCCATAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  
 GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  
 CAGAGATCGCGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  
 CTGTGSSGAGATCCCGGTTGGTTTATTTTATCTCTTCAAGAGAAAGATAATGAA  
 AANNTCTCAAGTCTGATTTCTGTTCTGTATAGAAAACATAATATAAAGCATATTCCTATTC  
 CTCGAGAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 24

MEGEAEKOPAMFHOPNRPGASDSAPPAGTMAQSRVLLLLLLPPQLHLGFLAVRAPGFG  
RSGGHSLSPEENEFABEEFVLVLSPEEPGPGPAVSCPRDCACSOEGVVDCCGIDIREFP  
GDLPEHTNHLSLQNNLEKIYPEELSRHLRLETLNLQNNRLTSRGLPEKAFELTNLNYL  
YLANNKLTAPRFLPNALISVDFAANYLTKIYGLTFQQKPNLRSVYLHNNKLADAGLPDN  
MFMGSSNVEVLILSSNPLRHVFKHLPALYKHLKONKLEKIPPGAFSELSLRELVLQN  
NYLTDEGLDNETFWKLSLEYLDLSSNNLSRVFAGLERSVLHLHLEKNAIRSVVANVLT  
IRSEYLLHSNQLREQGIHPLAFQGLKRLHTVHLYMNALEVRVPSGLPRRVRTLMILHNQ  
ITGIGREDFATTYFLEELNLSYNRITSQVHRDAFRKLRLRLSLDLSGNRLHTLPPGLPR  
NVHVIKVKRNEAALARGALAGMAQLRELVLTSNRLRSRALGPRAWVDLAHLQLLDIAGN  
QLTEIPGGLPESLEYLYLQNNKISAVPANAFDSTPNLKGIFLRFNKLAVGSVVDASFRRL  
KHLQVLDIENLEFGDISKDRGLGKEKEEEEEEEEEBETR

PCT/US00/05841

Figure 25

GAGCGGCTGACACCGAGGCTGACGGCTCTCTGCGGCCGCGGCTGCGCGCGCCGCGCGC  
 CGCGCGCCGACACCGCCAACTGGCGCGCGCGCGCTAGCCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
 CGCGCGCCGCGCGCGAGTGAAGCTCGCGCGCTGCGCGCGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
 CGCGCGCGCGCGCGCGGAGGAAACCGCGCGGATCTCTCGCGCTCAAAACACTGATGCT  
 CATAAACACTTATCTCTCCGCGCGCGCGCTGCGAGCGCGCGCGCGCGATCGCGCGCGCG  
 CGCGCGCTCGCGCTGTGCGCGCTCGCGCGCGCTGCGACACCGCGCGCGACCGACCGCGCGCG  
 CGCGCGCGGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCTGCTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCT  
 CGCGCGCGCTGTGATGCGGACCGCGCGCGGGGAGACGGCGCGCGCGCGCGCGGAAAGCACT  
 TCGATCCCGCGCGCGCGCCGCCAACCCCTACG  
 AATGAGAGAGCGCTCGCTGTGGAGGAGACCGGCTGCTGCGATGGTGCTGTGCGTCGAGCGC  
 TCGAGGTGGCGAGCGCCATCGCCAGGTGCTCGGTGATGTCATATGAGCGCAAGGTGAGCG  
 ACAAGCTGCCCCAGCGCGCTGAGAGGTGTGCGGTGCGAGCACTCTCGCTGACGACGAG  
 CGCATCTTCTGTCAGCGGACGATCGCTGCGATGTGCGACGTGCGACGTTTGTGCGCTCG  
 CGCAACTCACCATCTGCGGTGCACTGGAATGTGGTGGCCGGAATGTGCGCGGTGCGT  
 TTCACTGCGGTGCGGCTCTTCTGGAGACGCTGGACCTCACGAGCAATGACGCGCTCGGTCT  
 GTGAGCACTGTGCGACATCTCACGCGCTGGGCGCGCTCACAGCGTGTGACGCTGAGCGCGT  
 GCGCTCGGAGAGCTGGGCGCGGCGGTGTTCTGGCGGCTGGCTGCGCTCGGATCTCTGAC  
 GCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
 ACACACTCTTCTTCACGCGCACGACGAGCTCCAGCGCTCGCGCGCGCGCGCGCGCTCGCGT  
 TCGACACGCTCGACAGCTCTCTCATCTGACACGAGACCGCTGGCGCATGTGACACCCGAT  
 GCTCTCGTGAAGCTGTGGCGCGCTCATGACACTCTAICTGTGTGCGCAACATCTATCGAGC  
 CTGCGCATCTGTGAGCGCTGGCGCGCTGTGCGCGCTCGAGTACTGAGGCTCAACGACGAGC  
 CCGTGGGTGTGAGCTGCTGCGCGGACGCCACTCTGSGCTGTGCTGACGAGTTGTGCGGCG  
 TCTCTCTCGTGAAGCGCTGCTCGAGCTCTGCGACGACCGCTGCGCTGGCGCTGACCTCAACGCG  
 CTAGCTCGCATGACTGACTCGAGGCGTGGCTGTGGCACCGGCGCTTACCTCATCTGCG  
 AGCGGACGAGCGCACCGTAGAGGAGCGCTGGGGCTTCCCAAGTGTGCGCCAGCGAGTGTG  
 ACTGACAGAGCTCTGAGTGTGAGGACGTGAGAACACGAGCTTCGCGAGCAAGTGTGCGTGAAG  
 GGAAGCTGCTGCGCGGTGACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGGCCGACGCGCACTCAAT  
 GACTCACCTCTTGGAGCTCTGCTCGTGGCTGTGTCAGCGCCCGCTCATCGAGTGTGGCGCC  
 GAGGCGCTCGAGCGCACGAGGTTCCGCACTCGGGCGCTGCGCGGAGCGCGAGGCTGTGCA  
 CGCAAGAAACCGCACCGCGACGCGCTCGGCTGTGGCGCTGGAGCGAGCGAGGAGTGGCGG  
 ACTGTGCGCTCTGAGAGGCTGAGGTCCTGACAGGCTCATCTGAGCTCTGAGCTCTGAGT  
 GCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
 GGTGCTGACGACGAGTGTGTGTATCAATGAGGGTCTCTCTTCACGCGCGCACGACGACGAG  
 CGCGCGCGCGACCGGTGCGCGCGCGAGCGAGCGAGCTCTCTCGATGAGCGACTGTGCGCGCC  
 GCACCGGCTCTCCACCGACCTCATGTGTACAGGTTGTGGCGCGAGCGTTGTGCTGCGAAC  
 CGCGCGCTCCACCCAGCATCGGCTATATAGAGATATGCAATTTATTATTCTGTGTAA  
 AATATTGCGAGCGAGTGGGAATAAGAGCTCTTTCTTAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 26

MKRASAGGSRLANVLMQAWQVAAFCFGACVCYNEPKVTTSCFQQGLQAVPVGIFPAAS  
QRIFLHGNRI SHVPAASFRACRNLTILWLHSNVLARIDAAFTGLALLEQLDLSDNAQL  
RSVDPATFHGLRLATLHLDRCGLQELGPGFLFRGLAALQYLYLQDNALQALPDDTFRDL  
GNLTHLFLHGNRISSVPERAFRGLHSLDRLLHQNRAHVHHPAFRDLGRLMTLYLFAN  
NLSALPTALAPLALQYLLNDNPNWVDCRARPLMAMLQKFRGSSSEVPKSLFQRLAG  
RDLKRLAANDLQGCATGFPYHPITWGRATDEEPLGLPKCCQFDAQKASVLEFGRPAS  
AGNALKGRVPPGDSPPGNGSGFRHINDSPFGILPGSAEFPILTAVRPEGSEPPGFFTSGP  
RRRPGCSRKNRTRSHCRLGQAGSGGGGTGDSGSGALPSLTCSLTFLGLALVLTWTLGP  
C

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 27

GCCCCAGGACTGCTATGGCTTCCTTTGTTGTTACCCCGGTCTGCGTC  
**ATGTTAAACTCCAAATGTCTCTCTGTGGTTAACTGCTCTTGCCATCAAGTTCACCCCTCATT**  
 GACAGCCAGGCACAGTATCCAGTTGTCAACACAAATTATGGCAAAATCCGGGGCCTAAGA  
 ACACCGTTACCCAATGAGATCTTGGGTCCAGTGGAGCAGTACTTAGGGGTCCCTATGGC  
 TCACCCCTCCTGGAGAGAGGGGTTTTCAGCCCCCAGAACCCCTCTCTCTGGACTGGC  
 ATCCGAAATCTACTCAGTTTGTGCTGTGTGCCCCCAGCACCTGGATGAGAGATCCTTA  
 CTGCATGACATGCTGCCCATCTGGTTTACCGCCAAATTTGGATACTTTGATGACCTATGTT  
 CAAGATCAAAATGAAAGCTGCTTTTACTTAAACATCTACGTGCCACGGAAGATGGAGCC  
 AACACAAAGAAAGACAGATGATATAACAGTAATGACCTGTGTGAAGACCAAGATATT  
 CATGATCAGAACTTAAGAGCCCTCATGCTCTATATCCATGGGGATCTTACATGGAG  
 GGCACCGGACACATGATTGACGGCAGCATTTTGGCAAGCTACGGAAACGTCTACTGATC  
 ACCATTAACTACCTCTGGGAATACTAGGGTTTTTAAGTACCGGTGACCAAGCAGCAAAA  
 GGCACATATGGGCTCTGGATCAGATTCAAGCATGCGGTGGATTGAGAGATGTGGGA  
 GCCTTTGGCGGGGACCCCAAGAGAGTGACCATCTTTGGCTCGGGGCTGGGGCTCCTGT  
 GTGAGCTGTTGACCTCTCCCACTACTCAGAAAGGTCTCTTCCAGAGGCCATCATTGAG  
 AGCGGCACCGCCCTGTCCAGCTGGGCACTGAACTACCGCCGGCCAACTACCTCGGATA  
 TTGGCAGACAGGTGCGGTGCAACATGCTGACACCCAGGACATGGTAGAATGCTGCGG  
 AACAAAGAACTAACAGGAGCTCATCCAGCAGACCATCACCCGGCCACCTACCATAGGCC  
 TTCGGGCGGTGATCGACGGCGAGCTCATCCAGACGACCCCGAGATCTGATGGAGCAA  
 GCGAGTTCTCTCAACTACGACATCATGCTGGGCGTCAACCAAGGGGAAGGCTGAAGTTC  
 GTGGACGGCATCGTGGATAACAGGAGCGGTGTGACGCCCAACGACTTTGACTTCTCCGTG  
 TCCAATCTCGTGGACAACTTTACGGCTACCCCTGAAGGGAAAGACACTTTGCGGGAGACT  
 ATCAAGTTTATGATACACAGACTGGGCGGATAAGGAAACCCGGAGACGCGCGGAAACCC  
 CTGTGTGCTCTCTTTACTGACCAACAGTGGGTGGCCCCCGCGTGGCCCGGACCTGAC  
 GCGAGTACGGCTCCCCCACTACTTCTATGCTCTCTATCATCTGCCAAAGCGAAATG  
 AAGCCAGCTGGGCGAGATTGGGCCATGGTGTGAGGTCCCTATGTCTTCGGCATCCCC  
 ATGATCGGTCCCAAGCTCTCTCAGTTGTAACTTTTCCAAAGAACGCTCATGCTCAGC  
 GCGTGGTATGACCTACTGGACGAATTCGCCAAACTGGTGATCCAAATCAACAGTT  
 CCTCAGGATACCAAGTTCTATTACAAACCAACCCGCTTTGAAGAGTGGCTGGTCC  
 AAGTATATCCCAAGAACAGCTCTATCTGCATATTGGCTTGAACCCAGAGTGAGAGAT  
 CACTACCGGGCAACGAAAGTGGCTTTCTGGTTGGAACTGTTCTCTATTGCAAACTTG  
 AACAGATATTCCAGTATGTTTCAACAACCAAAAGGTTCTCCACCAAGATGACATCA  
 TTTCCCTATGGCACCGGCGATCTCCCGCCAGATATGGCCACCCACCAACGCCCGGCA  
 ATCACTCTGCAACAACTCCAAACACTCTAAGGACCTCACAAAACAGGGCTGAGGAC  
 ACAACTGCTCTCATTGAACCAAAAGAGATTATCCACCGAATTAAAGTGTCACTATTGCC  
 GTGGGGGCTGCTCTCTCTCTCAACATCTTAGCTTTTGGGGCGCTGTACTCAAAAAG  
 GACAAAGAGCGCCATGAGACTCACAGGGGCCCCAGTCCCCAGAGAAACACCACAATGAT  
 ATGCTCAGATCCAGAACGAGAGATCATGTCTCTGAGATGAAAGCTGGAACAGGAT  
 CACAGTGTGAGTCTCTCAGGCAACGACACTGAGGCTCACTCTCCGCGCAGACTAC  
 ACCCTCAGCTTGGCCGCTGCGAGATGACATCCACTTATGAGCCCAACACCATCAACC  
 ATGATTCCAAACACACTGACGGGATGCAAGCTTTGCACACTTTTAAACCTTCACTGGA  
 GGCACAAACAGTACAAATTTACCCACCGACATTCACCACTAGAGTATAGCTTTGCCCT  
 ATTTCCCTTCTATCCCTCTGCTCCCTACCGCTCAGCAACATGAAGAGGGAAGAAAGAG  
 AGAAGAAAGAGAGAGAGAAAGAAAGTCTCCAGACCAAGATGTTTTTGTCCCACTGACT  
 TAAGACAAAAATGCAAAAGGAGTCACTCCATCCCGCAGACCTTATCGTTGGTGT  
 TCCAGTATACAGATCAACTCTGACCTGTGAAATGTGAAGATACACATTTCTGTGTTA  
 AAATAACTGCTTTAAGATCTCTACCACTCCCAATCAATGTGTAGTGTGATAGGACATCAAC  
 ATTTCAAGGCCCGGGTGTCTTCAACGTCTGGAAGCAGCTGACACTTCTGAACTCAGC  
 CAAGGACACTTGATATTTTAAATTACAATGGAAGTTTAAACATTTCTTTCTGTGCCACA  
 CAATGGATGGCTCTCTTAAGTGAAGAAAGAGTCAATGAGATTTTCCCGCAGCACAGGAGC  
 TGTAAATCCAGAGAGAAAGGAAACGTAGAAATTTATTATTAAGAAATGAGCTGTGACGGA  
 AATCTGTACGGTCTGTGCAAAAGAGTGTTTTGGCAGCTGAACTATATTAAAGAGCTT  
 TGT

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 28

MLNSNVLLWLTALAIKFTLIDSQAQYFVVNTNYGKINGRLTPLPNEILGPVEQYLGVPYA  
SPPTGERRFQPPPEPPSSWTGIRNTTQFAAVCFQHLDERSLHMLPIWFTANLDTLMTYV  
QDQNEDECYLNIYVPTEDGANTKKNADDITSNDRGEDEDIHDQNSKKFVMVYIHGGSYME  
GTGNMIDGSLASYGNVIVITINYRLGILGFLSTGDAQAAGNIGLLDQIQALRWIEBNVG  
AFGGDPKRVITIFGSGAGASCVSLLTLSHYSBGLFQKAI IQSGIALSSWAVNYQPAKYTRI  
LADKVGCCNMLDTTDMVECLRNKNYKELIQQTITPATYHIAFGFVLDSDVI PDDOPQILMEQ  
GEFLNYDMLGVNQGEGLKFVDGIVDNEDSVTPANDFESVSNFVZNLGYFPGKOTLRET  
IKFMYTWDADKENPETRRKTLVALFTDHQWAPAVAADLHAQVGSPTTYFYAFYHHCQSEM  
KFSWADSANGDEVVYVFCIPMIGPTELPSCNFSKNDVMSAVVMTYVNTNFAKTGDPNOV  
PQCTKFIHTKPNRFEVANSKYNEKDQLYLHIGLKPVRDHYRATKVAFWLELVPHLHNL  
NEIFQYVSTTTKVPPPMWTSFPYGTTRSPAKIWPTTKRPAITPANNPKHSDPKHTGPD  
TTVLIETKRDYSTELSVTIAGASLLFLANILAFALYKKDKRRHETHRRSPQRNTTND  
IAHIQNEEIMSLQMKQLEHDHCESLQAHDTLRLTCPDPYTLTLRRSPDDIPLMTPTNTIT  
MIPNTLTGMQLHTFNTFSGGQNSTNLPHGHSTTRV

WO 00/53758

PCT/US90/05841

Figure 29

GGGAGCATCCGCTGCGGTCTCGCCGAGACCCCGGGGGATTGGCCGGTCTTCCCGC  
GGCGCGCAGCAGCTCTCTCGCACTGGATGGCAGCAGGGGCGCCGGGGTCTCTCGAC  
CCGAGAGGAATCTCATCATCTGTGCGGCTTCTTAAAGCAACTAGACCCAGGGGAG  
GATTATCTTGAACCTTGAAGACCAAACTAACTGAATTTAAA  
ATGTTCTTGGGGGAGAGGGAGCTTGACTTACACTTTGGTAATAATTTGCTTCTGACA  
CTAGGCTGTCTGTAGTACAGAAATGCCTCAAAAAGAGTCTAGAAGATGTTGCTATTGAC  
ATCCAGTCATCTCTTTCTAAGGGAATCAGAGGCAATGAGCCCGTATATCTCACTCAA  
GAAGACTGCAATTAATTTCTGTGTTCAACAAAAACATATCAGGGGACAAAGCATGTAACT  
TTGATGATCTTGCACACTCGAAAAACAGCTAGACACCCAACTGCTACCTATTTTCTGT  
CCCAACGAGGAGGCTGTCCATTGAAACAGCAAAAGGACTTATGAGTTACAGGATAATT  
ACAGATTTTCCATCTTTGACCAAAATTTGCCAAGCAGAGTTACCCAGGAGATTCT  
CTCTTACATGGCAATTTTCAAGCAGTCACTCCCTAGCCCATCATCACAGATTAT  
TCAAGCCCAACCGATATCTCAGGAGAGACACATTTCTCAGAGTTTGGATCTCAGAT  
CACTGGAGAACTATTTAAGATGGATGAAGCAAGTGCCAGCTCCTTGCTTATAAGGAA  
AAAGGCCATTCTCAGAGTTCAAAATTTCTCTGATCAAGAAATAGCTCATCTGCTGCT  
GAAAATGTGAGTGGCTCCAGCTACGGTGGCAGTTGCTTCCACATACCACTCGGCT  
ACTCCAAAGCCCGCCACCTTCTACCCCAATGCTTCAGTGACACCTCTGGGACTTCC  
CAGCCACAGCTGGCCACCAAGTCCACCTGTAACTCACTTCTCAGCCTCCCAAG  
ACCTCATTTCTACAGTTTTCACCGGGCTGGGCTACACTCCCAAGCAATGGCTACACA  
GCAGTTCTGACTACCACTTTCAAGCACCTACGGACTCGAAAGGAGCTTAGAAACATA  
CCGTTTACAGAAATCTCCAATTAATTTGAACACAGGGGATGTGTAAACCTACTGCA  
CTTTCTATGTCAANTGGAGTCTTCACTATGAATAAACTGCTTCTGGGAAGGTAGG  
GAGGCCAGTCCAGGAGTTCTCCAGGGGAGTGTCCAGAAATCAGTACGGCTTCCA  
TTTGAAAAATGGCTTCTTATCGGGTCCCTGCTCTTTGGTGTCTGTTCTCTGGTATAGG  
CTGCTCTCTGGGTAGATCTTTCGGAATCACTCGCAGGAAACGTTA  
CTCAAGACTGGATTATTTGATCAATGGGATCTATGTGGACATCTAAGGATGGAACCTGGT  
GTCTCTTAATTCATTTAGTAACCAAGAGCCCAATGCAATGAGTTTCTGCTGACTTGCTA  
GTCTTAGCAGGAGTTGTATTTTGAAGACAGGAAATGCCCCCTTCTGCTTCTCTTTT  
TTTTGGAGACAGAGTCTTGTCTGTGTCAGGGCTGGAGTGCAGTACGACGATCTCGGC  
TCTACCGCAACCTCCGCTCTCTGGGTCAGGCTGATTCTCTGCTCAGCCTCTTAAGTA  
TCTGGGATTACAGGCAATGTGACCAACCTCTGGTGAATTTTGTATTTTAGTAGAGACG  
GGCTTTCACCATGTGTGTCAGGCTGTCTCAACTCTGACTAGTATCCACCTCTC  
GGCTTCCCAAGTCTGGGATTACAGGCAAGGACCAACAGCTGGCCCTTCTGTTT  
ATCTTTGGTTTTTGAAGAGAAATGAAGTGGGAACCAATTAGTAATTTGGGTAATCTG  
TCTTAAATATTAGCTAAACCAAGCTCTATGTAAAGTAATAAGTAAATTTGCCATA  
TAAATTTCAAATTTCACTGGCTTTATGCAAGAAACAGGTTAGGACATCTAGGTTCCA  
ATTCAATTCACATTTCTGGTTCCAGATAAATCAACTGTTTATATCAATTTCTAATGGATT  
TGCTTTTCTTTTATATGGATTCTTTAAATCTTATCCAGATGTAGTTCTTCCAATTA  
AATATTTGAATAAATCTTTTGTACTCAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

ATTTTCGTGTAAGGAACCAACTGATCTCCCCACCCCTTGGATTAGAGTTCCTGCTCTACC  
TTACCCACAGATAACACATGTGTGTTTCTACTTGTAATGTAAAGTCTTTAAATTAACCTA  
TTACAGATAAAAAA



WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 30

MPFGGEGSLTYTLVILCFLTLRLSASQNCCLKSLEDVVIDIQSSLSKGIRGNEPVYTSTQ  
EDCINSCCSTKNISGDKACNLMIFDTRKTARQPNLYFFCPNEEACPLKPAKGLMSYRII  
TDFFSLTRNLPSELPOEDSLHGFQFQAVTFLAHHTDYKPTDISKRDTLKQKFGSSD  
HLEKLFKMDASAQQLLAYKEKHSQSSQFSSDQIAHLLPENVSALPATVAVASPHTTSA  
TPKPAITLLPTNASVTPSGTSQPOLATTAPPVTVTSQPPTTLISTVFTRAAATLQAMATT  
AVLITTTQAPTDSKGSLETIPFTEISNLTNTGNVNPATLSMSNVESSTMNKTASWEGR  
EASPGSSSQGSVPENQYGLPFEKWLIGSLLFGVLFVIGLVLLGRILSES LRKRYSRL  
DYLINGIYVDI

PCT/US00/05841

CCAGAGCTTCGCCGCTCGSCTCCGCCACAGGGTCCAGCCCGACCGTCCGCGGCCACACAGAG  
TTGAGGCTCTTCTTCTGCTACAGAGGGCTGGAAGAGGACAGAGTAGCTCTTCTGCTGTG  
TTGCGGGATCTTACTTGGCGCTGCTACTCTCTGGGCGACCTACAGAGGACACTTATGCGGCT  
CCATCTCTGGAGATGCGCAGAGATGTTAAACAGAGCTCTGGAAAGGGGATGTGAATCTTCCC  
TGCACTCTTGACACCCCTCGAGGCTCAGAGCTACCAACCAAGTCTTGTTGAAGTGGCTGGTCAACAGT  
GGCTCAGACCTCTGTCCACATCTTTCTTACGTACCTCTTGGGAGACATATCAGAGCGAGCA  
AGTCAACGAGGCGCGCTCTCATGTGAGGCCACAAGGTGTCAGAGATGATCTCTCCCTCAAT  
AGACCTCTGGAGATGGTATGACCGGAGGACATACAGCTGTGAAGTCACTCTCGGACGACTCT  
ATTGAGCAACCAAGTGTGGTGGAGATTAAGATCTTACAGGCTCGGTGTCAGAAAGATCTCTGTG  
TCCAAGCCACAGAGTGCAACTCTGAGCGGGTATTGGTCTCACGCTGCGACCGGAATGAGG  
ATTAGCTCTCAATGTCAGGCTCGGGTGTCTCTCCATCACTATTATTGGTATAGGACAA  
GACCAATAATACAGAGGACCATCAAGTAGACAACTAGTATGACTTCTACTTCAAGCTCG  
CGGGTATAGCCGACTAGCTCTCAATCTTCAAGCTGCAAGCGCGAGTGGTCTCTTGAG  
CAGCACAGCAGATCTTGTGAATTTGTGTGCAAGACTCTCAAGGCTATCAAGACAGCA  
ACTGAGGACACTCAACACTGACATACCCCTGGAAGCAACATCTACAGTAGAAGCTCT  
TGGAGTGTGACCACTGACATGTAGTGGTCACTTGGAGAGACAGTGTGGGCGAGGAAG  
AGCTCGCTGTCTTGGCATATCTCATCATCTCTCTTGTTGTGTATGTGGTGGTTTAC  
ATGGCTCTATCATGCTCTCTCTGGAGAACCATCCCAACAGGCTATCTCTCAAGACGACG  
AGGTGAAGAAGTCTCTCTCTTCCATTTTTCCGACCGGCTCGTCCCTCAATTTGTGATC  
TGCGAAGAAAGTTGGAGAGAGGGGGTTGGCACAGGACCAATCTCAAGCGCGAGAGCT  
TCAGGTCAGGACATAGCTGCTCTCTCTCTCTCAAGGACACTCTGAGGTTGTTTGGCGCT  
TCTGAACACAAAGGATATTTAGATCATCTGCTCTCTCTCTCAGAAATCTCTGGGCTGGT  
AGGATCTGTAATTTTGGCAGGAATTTGAGGCAAGGCTGGGGAAGCCAGGACAGCAACAG  
CCGAGCTCTGTAATTTGAGTGTGGGGCTCTGGGCAATGAGGCACTGCGAGMAGGG  
CTGCTCTCTGAGGAGGAGGCTCTGCAATCTGCAATCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG  
CGCAACTCCGACATTTGGSCAACACTACTTGTATGAGCTCTCTAGGACAGGCTGCT  
CAGATCTGCGGAGATCAATGSCACTCGCCGCGCTCTGGACAGTCTCTTGTGAT  
TTATGAGTTCTCGGCCACTGAGGCGAAAGTCTCTGTAAGAAATGCCCATATGCGCGAC  
ATCTGTCAGATATATGCTGATGCTGCTTGGCTCTCTGATGCTCTCTCTCTCTGCT  
CTCTCTCTCTGATAGCCAAATGCTCCGCGCTACCAACTGGAGCGCTGGGATCACT  
GGCTCTCTCTGGAAATTTGSCAGATGACTCAAGTAGGCGCTCTGGATTTGGCTCT  
GGGCGCTCTTAGTATCTCTCGCGGGGGGCTCTGTGTACTCTCTCTTAATATCAGAGGGA  
TGATCGCTATGACTAGACTTGGTCTCATGCTCAACAGACATATCACTTTGGCATCT  
TTGCCACAGAAAGCCGAGGAGGAGGCTCGAGCTGTCGACTCTCAGAGGACAGCTATATCT  
AGGATCACTTTCTCTTTCTTCTGAGGCGCAGAGCTTTTAAATGAAATTTGATTTCAAGG  
CAGAGGTCAGGTTCTGCTCTCCACTATAGTCTAATGTTCTGACTCTCTCTGCTGCTC  
ATAATAATCTAATCAATACAGC

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 32

WGILLGILLGHLTVDTYGRPILEVPESVTGPNKGDVNLPCYDPLQCYTOVLVKMLVOR  
GSDPVTLFLRDSGDIQQAQYQRLHVSHKVPQDVSLQLSTLEMDRSHYTCEVTWQTF  
DCNQVVRDKITELRVQKLSVSKFTVTTGSGVQPTVPQGMRLSLQCCQARGSPFISYIWKQ  
QTNNQEPKIVATLSLLFKPAVIADSGSYFCTAKGQVGSSEHSDIVKFFVKDSSKLLKTK  
TEAPTTMTYPLKATSTVKQSWDNTTMDGYLETSAGPGKSLFVFALLIISLCCMVVFT  
MAYIMLCRXTSQEHVYEAAR

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 33

GCSCGGGAGCCCATCTGCCCCAGGGGACGGGGCGGGGGCCGCTCCGCGCCGGCAC  
ATGGCTGCAGCCACCTCGGGGCGCACCCGAGGGCGCCGGCCCACTCGCCCGAGGTCCGT  
CGAGGGCGCCCGCCCGCCCGGAGCCAGCAGCAACTGAGCGGGGAGCGCCCGCGTCCG  
GGGATCGGG  
ATGTCCTCCTCCTCTCTCTCTGTAGTTTCTACTATGTTGGAACTTGGGGACTCAC  
ACTGAGATCAAGAGAGTGGCAGAGGAAAGGTCACTTTGCCCTGCCACATCAACTGGGG  
CTTCAGAAAAGACACTCTGGATATTGAATGGCTGCTCAACGATAATGAAGGGAAACAA  
AAAGTGGTGATCACTTACTCCAGTCGTATGCTTACAATAACTTGACTGAGGAACAGAA  
GGCCGAGTGGCCTTTGCTTCCAATTTCTGGCAGGAGATGCTTGGCAGATTGAACCT  
CTGAAGCCCACTGATGAGGGCCGGTACACCTGTAAGGTTAAGAAATTCAGGGCGCTACGT  
TGGAGCCATGTCTATCTTAAAGTCTTAGTGAGACCTCAAGCCCAAGTGTGAGTTGGAA  
GGAGAGCTGACAGAGGAAAGTGAACCTTTGCAAGTGTGAGTCACTCTGGCACAGAG  
CCCATTTGTATTACTGGCAGCGAATCCGAGAGAAAGGGAGAGGATGAACGTCTGCT  
CCCAATCTAGGATTGACTACAACCACTGGACGAGTTCTGCTGCAGAACTTTACCATG  
TCTACTCTGGACTGTACAGTGTACAGCAGGCAACGAAAGTGGGAGGAAAGCTGTGTG  
GTGCGAGTAACTGTACAGTATGTACAAAGCATCGGCATGTTGAGGAGCAGTGCACAGG  
ATAGTGGCTGGAGCCCTGCTGATTTTCTCTTGGTGTGGCTGCTAATCCGAGGAAAGAC  
AAAGAAAGATATGAGGAGAGAGAGAGACCTAATGAATTCGAGAGATGCTGAAGTCCA  
AAAGCCCGTCTTGTGAACCCAGCTCCTCTCTCAGGCTCTGGAGCTCAGCTCTGGT  
TCTTCTCCACTCGCTCCACAGCAATAGTGCTTCAAGCAGCCAGCGGACCTGTCAACT  
GACGAGCAGCCAGCCAGGGGTGGCCACCCAGGCATACAGCTAGTGGGGCCAGAGGTG  
AGAGGTTCTGAACCAAGAAAGTCCACCATGCTAATCTGACCAAGCAGAAACCAACCC  
AGCATGATCCCGAGCCAGAGCAGAGCCTTCCAAACGCTTGAATTAACATGGACTTGACT  
CCCACGCTTCTAGGAGTCAGGGTCTTTGAGCTCTTCTGCTATTGGAGCTCAAGTCA  
CAGCCACACACAGATGAGAGGTCATCTAAGTAGCAGTGAGCATTGCAGGAAACAGATT  
CAGATGAGCATTTCCTTATACAATACCAACAGCAAGAAAGGATGAAGTGAATTCATCT  
GTAAAAAGGCATCTTATTGTGCCTTTAGACAGAGTAAGGGAAAGCAGGAGTCCAAATCT  
ATTTGTTGACCCAGGACCTGTGGTGAGAGGTTGGGAAAGGTGAGGTGAATATACCTAAA  
ACTTTTAATGTGGGATATTGTTGATCAGTGTCTTGAATTCACAAATTTCAAGAGGAAATGG  
GATGCTGTTGTAAATTTTCTATGCAATTTCTGCAAACTTATTGGATTATTAGTTAATCAG  
ACAGTCAAGCAGACCCACAGCCTTATTACACTGTCTACACCACTGACTGAGCTAACCA  
CTTCTAAGAACTCCAAAAAGGAAAGATGTTCTTCTATTCTGAGCTTAATCTTATTGT  
CATAGGTTTGGATATTAAATTTCAAGGGAGTTGAATAGTGGGAGATGGAGAGAGTGA  
ATAGTTTCTCCCACTCTATACATACTCACTATTGTTATGAGCCCAAAATTAATATGA  
AGGAGACAAAAATTTGTGACAAAGGATTTGAGAGCTTTTCATCTTCATGATGTTATG  
AGGATTGTGACAAACATTAGAAATATATATGAGCAATTTGGGATTTCCTCTCAATC  
AGATGCTCTAAGGACTTCTCTGCTAGATATTCTGGAAGGAGAAATACAACATGTCTAT  
TTATCAACCTCTTAGAAGAAATCTCTAGAGAAAGGGATCTAGGAATGCTGAAAGA  
TTACCCACATACCATTAATAGTCTCTTCTTCTGAGAAATGTGAAACCAAGATTGCAAG  
ACTGGGTGGATGAAAGGGAGATTAGATCAGTTTCTCTTAATATGTCAGGAGAGGTAG  
CGGGCATGGTCCAGGCACCTGTAGGAAATCCAGCAGGTGGAGGTTGCAGTGAAGCCGA  
GATTATGCCATTGCACTCCAGCTGGGTGACAGAGCGGACTCCGCTCTC

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 34

MSLLLLLLVSYYVGTGTHTEIKRVAEEKVTLPCHHQLGLPEKDTLDIEWLLTDNEGNO  
KVVITYSSRHVYNLTEBQKGRVAFASNFLAGDASLQIEPLKPSDEGRYTCKVKNSGRYV  
WSHVILKVLVRPSKPKCELEGELTEGSDLTLCQESSSGTEPIVYYWQRIKEGEDERLP  
PKSRIDYNHPGRVLLQNLMSYSGLYQCTAGNEAGKESCVRVTQYVQSIGMVAGAVTG  
IVAGALLIFLLVWLLIRRKDKERYEEEEERPNEIREDAEAPKARLVKPSSSSSGSRSSRG  
SSSTRSTANSASRSQRTLSTDAAPQPLATQAYSLVGPEVRGSEPKKVHHANLTKAETTP  
SMIPSQSRAFTV

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 35

CACGCACCTTCACCTGGGTGGGATTCCTCAGGTATCAACGGTCCAGCCACCTCCGGGCA  
GGGCGGGTGAGGACGGGACGGGGCGTGTCCAACTGGCTGTGGGCTCTTGAAACCCGAGC  
**ATGG**CAAGCACGGGGCGATGGGCGGTTTCGGGCCCTGTGCGGCTGGCGCTGCTGTGC  
GCCTCAGCCTGGGTACGCGCCACCGGGGTCCGGGTGCGGCCCTGGGCGCTCTCTG  
CTTGGGACGGAAACGACCGCGCTGCTGCCGGGTTCAACGACGCGCTGCTCCGCGAT  
TACCGGGCGAGGAGTGTCTGTTCCGAGTGGGACTGCATGTGTGTCAGGCTGAATTCCAC  
TGCGGAGACCTTGTGACAGACCTGCCGGCACCCCTGTGTCGCCAGGCGAGGGGTA  
CAGTCCCGGGGAAATTCAGTTTGGCTTCCAGTGTATCGACTGTGCTCGGGGACCTTC  
TCCGGGGCCACGAAGGCCACTGCMAACCTGGACAGACTGCACCCAGTTCCGGTTTCTC  
ACTGTGTTCCCTGGGAACAAGACCCACAACGCTGTGTGCTCCAGGGTCCCGCGCGCA  
GAGCGCTTGGGTGGCTGACCGCTGCTCCTGCGGTGGCGCGCTGCTCCTCCTCTG  
ACCTCGGCCAGCTTGGACTGCACATCTGGCAGCTGAGGAGTCAGTGCATGTGGCCCCGA  
GAGACCCAGCTGCTGAGAGGTGCCCGCTCGACCGAAGACGCGAGAGCTGCCAGTTT  
CCCGAGGAAGAGCGGGCGGAGATCGGCAGAGGAGAGGGGCGGCTGGGAGACCTGTGG  
GTGT**GA**CCCTGGCCGCTCCTCCGGGGCCACCGACCGAGCCCTCCCGAGGAGCTCC  
CCAGGCCCGAGGGGCTCTGCGTTCTGCTCTGGGCCGGGCCCTGCTCCCTGGCAGCAGAA  
GTGGGTGCAGGAAGGTGGCAGTGACAGCGCCCTGGACCATGCAGTTC

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 36

MAQHGMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGGPGRLLLTGTGDARCCRVHTTRCCRD  
YPGECCSBWDCMCVQPFPHCGDPCCTTCRHHPCPPGGGVQSQGKFSFGFCIDCASGTF  
SGGHEGHCKPWTDCIQFGFLTVFPGNKTHNAVCPGSPPAEPLGWLTVVLLAVACVLLL  
TSAQLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLEVPSTEDARSCQFPPEERGERSAEEKGLGDLW  
V

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 37

GAAAGCTATAGGCTACCCATTGAGTCCCTGTGAGAGACTCAAGCTTTGAGAAAGGCTA  
GCAAGAGCAAGGAAAGAGAGAAACAAAGTTGCGAGGCCCTCAGAGTGAAAGCGTA  
AGGTTGAGTCAGCCTGCTGAGCTTTGAGAGCTCAGCTGGGCATCTCAGACTCCCTG  
AAGGAAGAGCCTTCTCACCACCAACCAAAAG  
**ATG**CTGAAAAAGCTCTCTCAGCTGTGACCTGGCTCTGCACTTTTCATCGTGGCCTTTGTC  
AGCCACCCAGCGTGGCTGAGAGGCTCTCTAAGCACAGACACCAGCACAGCCACAGCTC  
AAAGCGGCCAAGCTGCTGTGAGAGGCTGAAGGAGCTCAAGGCCAAGTTGCCAACCTTAGC  
AGCCTGCTGAGTGAAGTGAACAGAGAGCAGGAGAGGGGACTGGGTGAGCGTGGTCTATGAG  
GTATGGAGCTGGAGGCAACAGCAAGCGCATGGAGTCGCGCTCACAGATGCTGAGAGC  
AAGTACTCCGAGATGACACCAATTTGACATCATGCAAGCTGCAGGAGCACAGACGGTC  
ACTCAGACCTCCGAGATGCCATCTACGACTGCTCTCCCTCTACAGAGAACTACCGC  
ATCTCTGAGTGTATAAGCTTCTCTGATGACTTCTGCGCAGCCCTGAACTGGAGGTG  
TTCTGTGAGTGTGAGACTTCAGGCGGAGGCTGGACCATCATCCAGAGACGAAAGTGGC  
CTTGTCTCTTACCGGAGCTGAAAGCAGTACAGCAGGCTTTGGCAGCATCCGCTGGG  
GACTTCTGGTGGGAAACACATCCACGGCTCTCCAGACAGCCACCCGCTGGCT  
GTAGAGATGGAGACTGGGAGGSCAACCTGCGCTACGCTAGTATAGCCACTTTGTTTTG  
GGCAATGAAGTCAACAGCTATGCGCTCTCTGGGAACTACACTGGCAATGGGGAAC  
ACGCCCTCCAGTATCATAAACACAGAGCTTACGACCAAGGACAAGGACAATGACACT  
GCTTGGACAGTGTGACAGCTCCGCAAGGTGGCTACTGCTGACAACTGCTGACAGACT  
CCAACTCAATGGAGTGTACTACCGCTGGGTGAGCAATAGCACTGGATGGCATCA  
CCTGGTATGGCTGGCATCTTACCTACTCTCCCTCAACCGGTGGAGATGAAATCCGCC  
CAGAGAGACTTCAAGCCTTAAAGGAGGCTGCCGTGGAGCAAGGATACAGAACTGAGACA  
CGTGGAGACTGGATGAGGCGAGATGAGGACAGGAGAGAGTGTAGAA  
AGGGTAGGACTGAGAAACAGCCTATAATCTCAAAGAAAGATAAGTCTCAAAGGAGCAC  
AAAAAATCATATGTAACAGGATGTTACAGTAAACAGGATGAATATTTAAACCACTG  
GGCTCTGCCATCTCTCAAGGTGGTAGACTGAGTGGGGTCTCTCTGCCCAAGATCCC  
TGACATAGCAGTAGCTTGTCTTTCCACATGATTGTCTGTGAAAGAAAAATATTTGAG  
ATCTTTTATCTATTTTCTCTACGGCTTAGGCTATGTGAGGSCAAAAACACAAATCCCTTT  
GCTAAAAAGAACCATATTTATTTGATTTCAAGGATAGGCTTTGAGTGTAGAGAAAG  
GAGTGAAGGAGGAGCTGGGAAATGGTATTTCTATTTTAAATCCAGTGAATATCTTG  
AGCTACACATTTATTTAAACACAAAAATTTGTCGGCTGGAACAGCCAGGCTGGAC  
TTGCGGGGAGGAACTCCAGGCACTGCATCTGGCGATCAGACTCTGAGCACTGCCCTG  
CTCGCTTGGTATGTACAGCACTGAAAGGAATGAAGCACCAGCAGGAGGTGGACAGAGT  
CTCTCATGGATGCCGGCACAAACTGCCCTTAAATATTCATAGTTAATAAGGTGCTAAATAAG  
ATTTTATTTATCTTTGTAAGAAACAAGCTCAAGGAGCTTCTTTTAAATTTGTCTGTAG  
GAAATGGTTGAAACTGAAGGTAGATGGTGTATAGTTAATAAATGCTGTAATAAG  
CATCTCACTTTGTAATAAATAAATATTTGTTTAAACATTCACGTTTCTTTT  
CCTTCTACATAAACACTTCAAAATGTG



WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 38

MLKKPLSAVTWLCIFIVAFVSHPAWLQKLSKHKTPAQFQLKAAACCCEVKELKAQVANLS  
SLLSELNKKQERDWSVVMQVMELENSKRMESRLTDAESKIEMNNQIDIMQLQAAQTV  
TQTSADAIYDCSSLYQKMYRISGVYKLPDDFLGSPLELVFCMBETSGGGWIIQRRKSG  
LVSPYRDWKQYKQGFGRGDFWLGWBIHRLSRQPTLRVEMEDWEGWLRIAEYSHFVL  
GNELNSYRLFLGNVTGNVGNDAQYHNTAFSTKOKNDNCLDKCAQLRKGGYWYNCCTD  
SNLNGVYYRLGSHNKHLDGIIWYGWHGSTYSLKRVMKIRPEDFKP

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 39

GAATTCACGACACGGGGGCTTTGGATGTCMAAGGAGGAGGACGGCTGGGTCTCTTGGAGAGGACT  
 CACTACCTGGCATATTCTGAGGATATCTGTAGATATACCAAGCCTCAGATATCTGGGAGCT  
 TACAGCTTCCAGGAGAGCGCTCTCTCCGAGGAAGCTGAATCCAGCAAGAACA  
**ATGAGGCGCCAGGGAGAGCTATTCCGACAAAGGAGCAAGCTCTTTCTCTTCTCTCT**  
 TTGGGCTATCTCTGGCGGGCGGGCGGAGCACTAGAGCTATCTTGGTGGGAGGAACCT  
 GGGGGGAGGAGCTCTCTTCTACCAATTTAGCAAGGACCTGGGTCTGGAGCAGGGAGATT  
 TCCAGGCGGGGGGGTGGGTTGTTTCCGAGAGGAGCAACAACTACATTTCGACGCTCAATCAG  
 GAGACGCGGAGATTGTTGTCTAAATAGAGGATTGGAACGCTGAGGATATCTCGGCTGACAG  
 GAGCTCTGTGTCTACGTTTTCGAAGTGTCTCTAGAGAGTCCCTTCGAGTGTTTTTCGAAG  
 GAGCTCGAAGTATAGACATAAAGCGTACCTCTACGATTATTTCTGGACAAATATATGTTG  
 TGTAGATTTTACAGAGAGAGCTCTCTCGGACATGCTTTCTCTCGAAGATCGCGGAGAC  
 TTGATGTTAGGCGCAAAACAATATTAGAGATATAATACAGCCCAACTCTTAATTTTGG  
 GTCTCCACCCGCAACGAGTATGTCGAGGAATAACCGAGAGCTGGTGTGGAACAAGCG  
 CTGGACGCGAGGAGAGAGAGCTGAGCTCGAGTTAACTACATCAGACATCGATGGTGGCTCT  
 CCGCGCAGATCTGGCATCTCTCAGTTCTACATCGAAGTCTGAGATGTCAAGATATATGCC  
 CTGTAATTTGAGCAGCTTTCTATAGATGGAGATCTGTAGGACAGTCCGATGGCTCT  
 CTGGTTTGAAGTCTCTCCGACGAGATTGACACAGGATCAACGAGAGATTTTCTAT  
 TCACTTTTCAAGCTTCTGAGAGAGATTGGCAAAACCTTTAGATCATCTCTTACGAGAA  
 GAAATTTAGACTAAAAAAACAATCATGATTTGSAAAAACCTCAGCTCTATGAAGTCAATAT  
 GAGGCAGAGATGCTGGAAACCTTTCTGGAAATGACACGCTTTCTGATTAAGTAGATAGT  
 GTGAACGAGATGCCCCGAGAGTTTACATGTTCTGCAATTTACCAGGCCAATATCTGGAAC  
 GGCGCTGAACCTGTGGTGCATTTTTCAGTTTTCAGATCTTGATTAGAGAGAAATATGGG  
 AAAATATTAGTTGCTCCATTCCAGGAGATCTACCTCTCTCTGAAATCCGCGGAAACTT  
 TACACCTCTATCAAGCGAGAGACATCATAGACAGAAAGCAGCGGAATACAACTACAT  
 ATCATCTGATCTACATGTTTGGGACAGCTTATGCTGATACAAACAGCTCATATGAGCTGTGTC  
 ATTCGGCATGTCAATGACAAACGCTCTCCGCTCTTACCCAAACCTCTACACCTGTCTCTC  
 CTGGAGAGAACACGAGCCCGCCTCTGACATCTCGGAGCTCAGCGCTCAGACAGAGACATCA  
 GGCACAAACGCGAGGTACAGCTCTGCTCTGCTCCGCCGACGACCGGACATCTCCCTCT  
 ACATCTCTGGTCTCTCATAGCGGAGTACAGACACAGGCGACCTGTTCCGCTCAGGTTCTGGAC  
 TCGAGGCGCTCGAGGGGTTCCGATTTCCGCTGGGCGCTCTCAGAACACGGCTCTCCGCGG  
 CTGAGCAGAGAGGCTCTGTGCGCGCTGGTGGTCTGTCGAGACCGAAGCAACTCCGCTCT  
 GTGCTGTACCGGCTCAGAAAGCGGCTCGCGCCTCTGAGCAGCTGGTGCGGCGGGCGGCG  
 GGGCGGGGCTACCTGTGTGACCAAGGCTGGTGGCGGTGAGCTGCGCATCTGGGCGCAAGCGCC  
 TGGCTTCTGTCACAGTCTCTCAAGGCGAGGAGCTCGGTCTGTTTGGCCTGTGGGCGCTG  
 AATGGCGAGGTGTGAGCGCCGAGGCTCTGAGCGAGGCGACAGCGGGCGAAGCAGAGCTG  
 GTGGTCTGTGTCAGGACAATGGCGAGCCTCCGGCTCTGGCACAACCGCCAGCTGCACGT  
 CTCTGGTGTGAGCGGCTTTCTCCAGCCTCTACCTGCTCTTCCGGAGAGCGGGCGGCGACCA  
 GCCAGCGCGCATCTGCTCACGCTTACTGGTGTGGTGGTGTGGGCTCGGTGTCTTCTGCTC  
 TTCTCTTTTCTGGGTGCTCTGTTGTGGCGGCTCGCGCTGTGTGAGGAGAGAGGGCGGCT  
 TGGTGGTGGCTGCTGGTGGTGGCGAGGCGGCTCTCTCAGGAGCATTTGTGACATGAGC  
 GGCCACGAGGACCTATCCGAGAGTACASTAGTGGAGTTGTCTGGAGAGGCTCAGGG  
 ACCAATGATCTCAAGTCTCTGAAGCGGATATCCCAACTCTCTCTCCAGCTGCGCTGGG  
 AAGAAATATCAAGAGAAATTTCACTCTTCCCAATATTTGGGTTCAAATATTCAGTGACAT  
 TAGTTGACTCTTACGATTCATAGATTTTATTTTGGGCAATTTCTACGCAACATTTTAT  
 TTCCCCCAATTTGGTGTGATGATGATTTGTCACGGTTATTCTTGATTTTCTCATGTTC  
 TTCTCCCTTTGTTTAAAGTGAACTACTTACTTTTCTCTGTTCTTT

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 40

MEASGKLYCRORQVLFSPILLGLSLAGAAPREYSVVVEETEGSSSFVTNLAKDLGLEQREF  
SRGVRVVRGNKHLQLONOETADLLNEKLLREDLOGHTEPCVLRFOVLLSEFFEFFQA  
ELOVIDINDHSFVELDKQMLVKVSESSPPGTTPLAKNAEDLDVGGQNNISNYIIISFMSYFR  
VLTRKRSDDRKYPELVLDKALDREERELRLTLTALDGGSPPPSGTAQVITIEVLVDNDNA  
PEPEQPFYRQISEDSFVGFVVKVSATDVDTGVNGEISYSLFQASEEIGKTFKINPLTG  
EIELKKOLFDFEKLQSYEVNIEARDAGTFSGKCTVLIQVIDVNDRAPEVTMSAFTSPFEN  
APETVVALFSVSDLDSENGKISCSIQEDLPFLKGAENFYTLTERPLDRESRAEYNTIT  
ITVTLGTPLMLITQLNMTVLIADVNDNAPAFOTSTSYTLFVRENNSPALHRSVSATDRDS  
GTNAQVTSLLPPQDPHPLTLTSLVSINADNGHLFALRSLDYEALOGPOFRVGSADHSGSPA  
LSSEALVRVVULDANDNSPFVLYFLONGSAPCTELVPRAAEPGYLVTKVAVDGDGSGQNA  
WLSYQLLKATELGLPGVWAHNGEVRTARLLSERDAKHLVVLVKDNGEPPRSATATLHV  
LLVDGFSQPYLPLPEAAFTQAQADLLTVYLVVALASVSSLFVSVLLFVAVRLCRSRRAA  
SVGRCLVPEGLFGLHVDMSGTRTLQSYQYEVCLAGGSGTNEFKFLKPIIPNFPQCPC  
KEIQGNSTFPNNPFGFNIQ

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 41

GGTCCAGCCAAAGAACCTCGGGCCGCTGCGCGTGGGGAGGAGTTCCCGAAACCCGGC  
 CGCTAAGCGAGGCTCTCTCCCGCAGATCCGAACGGCTGGGGGGGTCAACCCGGCT  
 GGGACAAGAGCCCGCCCTCTCTCCCGGCGCGGGAGGGGGTGGGGTGGGGCCGG  
 AGGGCGGGGTGTGAGTGGGTGTGTGCGGGGGGGGAGGCTTGATGCAATCCCGATAAGAAA  
 TGCTCGGGTGTCTTGGGCACCTACCCGTGGGGCCCGTAAGGCGCTACTATATAAGGCTGC  
 CGGCCCGAGCGCGCGCGCTCAGAGCAGGAGCGCTGCGTCCAGGATCTAGGGCCACGA  
 CCATCCCAACCCGCACTCAAGCCCGCAGGCGATCCCGTCCGCGCCAGCCTCCGC  
 ACCCCCATCGCCGAGTGTGCGCCGAGAGCCCGAGGGAGGTGCC  
 ATGCGAGCGGGTGTGTGGTCCACGATATGGATCTTGGCCGGCTCTGGCTGGCCGTG  
 GCGGGCGCCCTCTGCTCTCGGACCGGGGGCCCGAGTGCATACGGCTGGGGCGAC  
 CCGATCCGCTCGCGCACCTGTACACCTCCGGCCCGCAGGCTCTCCAGCTGCTTCTGTG  
 CGCATCCGTCCGACCGCGCTCGTGACTGCGCGGGGGCCAGAGCGCGCACAGTTTGTGTG  
 GAGATCAAGGCGTCCCTCTCGGACCGTGGCCATCAAGGGCGTGCAACGCTGCGGTAC  
 CTCTGATGGGCGCGGACCGCAAGATGCGGGCTGCTTCACTACTCGGAGGAAGACTGT  
 GCTTTGAGGAGGAGATCCGCCAGATGGCTACATGTGTACCGATCCGAGGAAGACCGC  
 CTCCCGCTCTCCCTGAGCAGTGCCAAACAGCGCGAGCTGTACAGAACAGAGGCTTCTT  
 CCACTCTCTCATTTCCTGCCATGCTGCCATGCTCCCGAGGAGCTTGAGGACTTCAGG  
 GCGCACTTGAATTCGACATGTTCTCTTCCCGCTGGAGACCGACAGCATGACCCATT  
 GGGCTTGTACCGGACTGGAGGCGTGAGGAGTGCCAGCTTTGAGAGTAACCTGAGACCA  
 TGCCCGGCTCTTCACTGCTGCCAGGGCTGTGGTACCTGACGCTGCGGAGCTGCTT  
 CTACAAGACAGTCTTGAATCCAGTTCTGTTTGTAGTTTAGGAAGAAACATCTAGAAGTT  
 GTACATATTAGAGTTTCCATGGCAGTGCCAGTTTCTAGCCAATGACTTGTCTGATC  
 ATAACATTGTAAGCT  
 GTAGCTTSCCAGCTGCTGCTGGGCCCCATTCTGCTCCCTCGAGGTTGCTGGACAAGC  
 TGCTGCACTGTCTCAGTTCTGCTTGAATACCTCATOGATGGGGAACCTCACTTCTTTGG  
 AAAAATTCTTATGTCAAGCTGAATTTCTAATTTTTCTCATCACTTCCCGAGGAGCAG  
 CCAGAAGACAGGAGTATTTTAAATTCAGGAACAGGTGATCCACTCTGTAAACAGCAG  
 GTAAATTTCACTCAACCCCATGTGGGAATTGATCTATCTCTCACTTCCAGGGACCATTT  
 GCGCTTCCCAATCCCTCCAGGCCAGAACTGACTGGAGCAGGATGCGCCACCGAGCTTC  
 AGGAGTAGGGGAAGCCTGGAGGCCCACTCCAGCCCTGGGACAACTGAGAATTCCTCCCTG  
 AGGCCAGTTCTGTGATGATGCTGCTGAGAAATACTTGTGCTCCCGGTGTCACTGCT  
 TCCATCTCCAGGCCACCGAGCCCTTGCCTCACTGCTCCCGATGGATTGGGGCC  
 TCCAGGCCCCCAGCTTATGTCAAACCTGCACTTCTGTTCAAAAATCAGGAAAGAA  
 GATTTGAAGACCCCAAGTCTGTCAATACTTGTGTTGGAAGCAGCGGGGAAGACCT  
 AGAACCCCTTCCCGAGCACTTGGTTTCCAAACATGATTTATGAGTAATTTATTTGAT  
 AGTACATCTCTTATTTCTTACATTTATGTCCTCCCAATTTATTTATGATGTAAG  
 TGAGGTTTGTGTATATTAATAATGGAGTTGTTTGT

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 42

MRSGCVVHVWILAGLWLAAGRPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCF  
LRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVLRRTVAIKGVHSVRILCMGADGKMGGLLQYSEE  
DCAFEETIRPDGINVYRSEKHLFVSLSSAKQRQLYXNRGFLPLSHFLPMLPMVPPEEPE  
DLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK

PCT/US00/05841

GTCTGCTGCTGTGTCTGACAGGCTGGAGTGCAGGTGGTGTTGATCTTGGCTCATCTGTAACTCCT  
 CAGCTCCGGGTTCAGATGATGTCTATGCTCCAGTCCAGCTCCCGATAGCTGGGATATACAGGT  
 GTGATCTTCTCAGAGATGATCTCGCTGGAGAGAA  
**ATGAT**CTCCCAAGTCGCTGTCTGACAGACACTGATCTTCCTGTGAGTGTGCTCTCTCTGGTGT  
 CAGGTTGTCCAGCGGACGGGGCTCAGGAGGAGAACTTTCTGCTTCTCGAGGCACAGGACACCG  
 ACACAAGAGAGACGGCTCTCACTACAAACCACACGAGACTTGGCATCTTCATCTGAGGAAG  
 TCGGAGAGAGGGCTCTCAGCATGTACGCTCCCTTTCCCTGAGCGACACCGCTCTCTCCGATCT  
 TCTCTTGACCCAGGAGGCTTCTACACTTTCTGCTCTACTTGGAACCGAGCTGTGGGGAGA  
 TGCATCTTTCTTCTATGCGAAGGTGATCTCTTGCTGAGTGAACAAGCTCTAGCTCTCTCT  
 TGGCTTCAGACACGAGGAGAGAGCTTGGCTCAGGCGGCCCCGCTTTGAGCAACTCTGT  
 ACCTCTGTGGTGAAGAGCTCAGAACTCAGCTCTGCCGACGCTCGCCAGCTTCACTCTCT  
 TTTCCAGACTCTCCCAACAGCGCGCTGCACATGCTCTGGTGGGATCTGTGCAAGCTCAA  
 AGGAGCTCTCAGCTCTCAGCAGCTTTCTTGAAGACTCTCCGAGAGAGCTTCAGGAAGAGGCG  
 TCGCTGTCTCCCGCCGACAGCAGTTTGCAGAGCTTGAGTGCAGAACTGACTCTTGTGA  
 TTCTATGGGGAGACATGGTGTCTTGCAGAGAGACCGGATCAGACGCCACAGTGTGGAAGCT  
 CAGCCCAACAGCAGCGCTCTCAGGACACTGCATCACTCTCCGCGAGGAGGAGAGCAGGAC  
 GAGATCTAGGATGATCTCGGTGCTGCTCTGGAACACTCTTTCAGAGAGCAAGAGGGCGG  
 AGCGGGGAGCTCAGGAAGAGACTCTCTCTGTGTGAGCTTCAGACGCGAAGCTCTGTTCA  
 CAGCAAGATTTCCAGCAGACTCTGGGTGAGAGAGTCTTGGGATTTGGTTCAGACAGCAAC  
 AAGATGACCAACTCTCAGGAGCGCTGGTGTGCTCACTTCTTCAGACAGCTACAGCGAAG  
 AATGTGATCTTGCATATTTGTTTGGGTTGAAGACCCCACTATGAGCAGCCCGGGCAT  
 TGTGAGCATGTGTGGGTGTGAGCCCTCAGGAGAGAGCCCAAACTACTCTGCTTCTCAAC  
 CACTTGACTCTCTTFCAGCTGTATGTGCTCTCTGGTGTGAGCGCCGCTGCAACAG  
 CACTCTGAGCTCTCTCTCTCAGTGGGTGTGTCTGTCTGCTCTGGCTCTGCTCTGTCT  
 ACCATTCCGCGCTCACTCTCTCAGAGGTGCCCTCTCGGCTGTGAGGAGACACTCTCGGAG  
 TACACCACTCAAGGTGCACATGAATCTGTCTGTGTGGTCTTCTCTCAGTGCACAGCACTTC  
 TCTGTCAGGACGGCTGGTGGCCCTCAGACAGCTCTTGAGGCTGTGCGCAGGACGATGCATCT  
 TCTGCTGCTCTCTCTCTCTCACTCTCTCTCTCTCTGATGTGGCTCTGAGGGGTACCACT  
 TACGCTCTGCTGTGTGAGCTTTTGGCACTCTGTGCTCTTGGTCACTCTCAAGTGTGAGC  
 GCACTGTGGCTCTGCTCACTCTCTCTGTGAGCTCTCAGGAGGGCTGTCTCTACCTGTGGAC  
 TCTGCTGGCCCACTCTCTCTCTGATGATGATCTCAGGAGGGCTGTCTCTCTCAGGCTCT  
 ATGTGCTGTGATCCGAGACTCTCTGCTCAGCTATGCTCTGCTGAGGCTCTCTGCTGCTGCT  
 GTGTGTTCTTCTCAGTATGCCATCTCTGACAGCACTGTGTGGCAGATCTGCTGGTGTGGC  
 CCCCACCAAAAGTGTGCACATGTGTGCATCTCTGGGCTCAGCTCTGCTGTGTGGG  
 CTTCTCTGGGCTGTGATCTCTCTCTCTGCTTGGCACTCTGACGCTGTGATCTCTCT  
 TACCTTTTCAGCATCACTCACTCTCTCAGAGCTCTCTCACTCTCTGTGATGTGATCTCT  
 ATCGGCTGTGACGCGCGGGGTGGCCCTCTCTTGAAGAGCACTTCAGACAGCGCCAG  
 TCTTGCATCACTCTCGGACAGCACTCTGTCCAGACGCTATCTAGGCTCTCAGGCCACTCTC  
 CATGTGTGAAGCAGAGATCGGCGCTCTGTGCAGCTCTTGTGCTGTGGCCCTCAGGACGAGC  
 CAGGCCCTCAGGCCCTCAGGCGCAGACTTGTGAAAGCGCAAGCAGATGAGAGATGGCC  
 GTGTCCATGTGTGACGGACTCCGCGCTGTGGCTTTGAAATGTGCTCTTGGGACTCTGTGG  
 TCTCTCACTGACTCCACGGGACTCAGAGGTGCGCGCAGCTATCTGCTCTAGGGAATCTGTCT  
 CCACTCTGTGTTCCACACCGACTCAGGAGCGTGTGCTTCTCTCTACCTGCTCTGGCCACAC  
 CACTCTATGCTGGGACAGGCTAGGCTTGTGATCTTGAGGCTGTGGACACTCTTAATCTGTGCC  
 CTGTCTTGGGACAGAAATGTGGCTCAGTTGTCTGTCTGTCTGTGGTCTCACTTGGAGGCA  
 CTCTGCATCTCTGTCACTTTAGCTCAGTGTGACCCAGGAGGATTTGGGCGCCAGGCGA  
 GACTCTCAGGCGCAGAGCCCTGTGCGAGGAGAGGCGCTTTGGCAGGATCAGACAGCACT  
 TGGCTCACTCTGAGCCTCAGGCGCCCTCTCTCTCTCAGGCGCCCTCAGCTCTCTCTCTCT  
 CTCTCTGGGTTGTCTCTCTCCAGGGGCTCTCTGTGCTCTGTCTGTTACAGCTGGGGGT  
 CCGGATCCCAATGTGTTTGTGGGAGTGGTTTCTCAGGAGCTGCTGGTGTGTCTGTGTA  
 ATATTGTTGTCTACTGCAAGCTCTGGGCTGAGCGCTGAGGCTGGGTGATCGATGTGCT  
 GGAGTGTGAGTGTGCTCTGTCACTCTGTGGGCTTGTGTATGAGCTGATCTGGCCTCTGAT  
 CTTCTGACAGCAGCAGCCTCAGAGGGGGCTCAGCTCTCTCTCTCAGAGCCTCTTGTGGC  
 AGAAGACTGTGCACATGCAGCTGCTGTGGTTTGTCTATCCCACTCCACAGGATGAGTA  
 TGACTCTCTCTGTGTAACCTGCGCTAGGCTGCATCACTCTCAAGGGTTTCTTCCAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

GGCCCCAAATAGCTCCAGGCGCCCTCGGGCGCCCATCATGGTTAATTCTGTCCACAAAC  
ACACACGGGTAGATTGCTGGCCTGTGTAGGTGGTAGGGACACAGATGACCGACCTGGTC  
ACTCCTCCTTSCCAACATTGAGTCTGGTATGTGAGGCGTGCCTGAAGCAAGAACTCCTGGA  
GCTACAGGACAGGGAGCCATCATTCCTGCTGGGAATCCTGGAAGACTTCTGCGAGGAG  
TCAGCGTTCAATCTTGACCTTGAAGATGGGAAGGATGTTCTTTTACGTACCAATTCTTT  
TGTCTTTTCAATCTTAAAGAAAGTACATGTTTATTGTAGAGATTTGGAACTGTAGAAG  
AGATTCAGAGAGAAAAATAAAATCAGCTGTTGTAAATCGCCTAGCAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 44

MTPOSLLQTTLLFLLSLLFLVOGANGRGHREDFRFCQQRNQTHRSSLHYKPTFDLRISIEN  
SREALTVHAPFFAHPASRSFFDPRGLIHFLYWNRRHAGRLHLLIGNRDFTLLSDKASSLL  
CFQRQESSLAQGFLLATSVTSWWSFQNI SLFSAASFTTSEHSPHTAAHNASVDMCELR  
RDLQLLSQFLAHFQKASRRPSAAPASQQLQSLLESKLTISVRFMGDMVSFEEDRINATYWKL  
QPTAGLQDLHHHSRQBEQSEIMBISYLLERTLFPRTIKRSGGAEXKLLLVDFSSQALFQ  
DKNSQVLQKXVLGIWQNTKVANLTPVVLTFQHLQPKNVTLQCVFWVEDFTLSSPGH  
WSAQCETVRRETQTSFCNHLTYFAVLNVSSVEVDVHKHVL SLLSYVGCYVSLACLV  
TIRAYLCSRVLPCRRKPRDVTIKVHMNLLAVFLDTSFLSEPVALTGSEAGCRASAI  
FLHPSILLTCLSWMGLEGYNLVRVVEVFGTYVPGYLLKLSAAGWGPFIPITLVVALVDVD  
NYGPILAVHRTPEGVIYPSMCWIRDSLVSYITNLGLFSLVFLFNMAMLATMVVQILRLR  
PHTQKWSHVLTLLGLSLVLGLFWALIFFSFASGTQFLVVLVLFPSIITSFQGLFIINYS  
MRLQARGGSPKSNSDSARLPISSGSTSSRI



WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 45

GCAGGTTGGCGATCGCTGAGAGGCGAGGCGCGAGGCGCGGCTGGGAGGCGGCGCGGAG  
GTGGGGCGCGCTGGGGCGGCGCGCGCGCGGCTTCATCTGAGGGCGCACGGCCCGGACC  
GAGCGTGGGACTGGGCTCCCAAGCGTGGGGCGACAAAGCTCCCGAGCTGCA  
ATGGGCCGCGGCTGGGGATTCTTGTGGGCTCTGGGCGCGCTGGGCTGCTCAGCTCG  
GGCCACGGAGAGGAGCGGCGCGCGGAGACAGGGCGCACAGAGGTGCTTCTGCCAGGTAGT  
GGTTACTTGGATGATTGTACCTGTGATGTTGAAACCATTTGATAGATTAACTACAGG  
CTTTTCCCAAGACTACAAAACTTCTTGAAGTGACTACTTTAGGTATTACAAGGTRAAC  
CTGAGAGGCGGCTGCTCTTCTGGAATGACATCGCCAGTGTGGAAGAAGGACTGTGCT  
GTGAAGCCATGTCAATCTGATGAAGTCTTCTGATGGAATTAATCTGCGAGCTACAGGTAT  
TCTGAAGAGCCAAATATCTCATTGAAGAATGTGAACAGCTGAACGACTTGGAGCAGTG  
GATGAATCTCTGAGTGAGGAAACAGAGAAGGCTGTTCTTCAGTGGACCAAGCATGATGAT  
TCTTCAGATAACTTCTCTGAAGCTGATGACATTGCTCCCTGAAGCTGAATATGATAGT  
TTGCTCTTAATCTGAGCGCTACACTGGTTACAAGGGCCAGATGCTTGGAAAAATATGG  
AATGTCTCTACGAAGAAACTGTTTAAAGCCACAGACATTAAGAAGCTTTAAATCCT  
TTGGCTCTTGTCTCAAGGACAGTGAAGAAACACTTTTACAGTTGGCTAGAGGCTCTC  
TGTGTAGAAAAAGAGCATTCTACAGACTTATATCTGGGCTACATGCAAGCATTAAAGTG  
CATTTGAGTGCAAGATATCTTTACAGAGACTTGTGTAAGAAAGATGGGACACAAAC  
ATTACAGAATTTCAACAGCGATTGATGGAATTTGACTGAAGGAGAGGTCGAAGAAG  
CTTAAGAACTTGTATTTCTCTACTTAATAGAATTAAGGCTTTATCCAAAGTGTACCA  
TTCTTCGAGCGCCAGATTTTCAACTCTTTAGCTGGAATAAAATTCAGGATGAGGAAAC  
AAAAATGTTACTTCTGGAATACTTCATGAATCAGACTCATTCTTTCATTTGATGAG  
AATTCTATTTTGTCTGGGATAAAAAAGAGCACACAACTAAAGGAGGACTTTGACTG  
CATTTTGAATAATTTCAAGAATTATGGATTGTGTGGTTGTTTAAATGTCGCTCTGG  
GGAAAGCTTCAGACTCAGGCTTGGGCACTGCTCTGAAGATCTTATTTCTGAGAAATG  
ATAGCAATATGCCAGAAAGTGGACCTAGTTATGAATCCATTAACCAAGACAGAAATTA  
GTATCATTTATTCAACGCAATTTGGAAGAATTTCTCAAGTGTGAAGAATTAGAAACTTC  
AGGAACCTGTTACAGAATATTCATTAAAGAAACAGCTGATATGTCCTGTTCTGAGC  
AATGGAGCGGAAGAGTGAATTTCAATCAAGGACATAATAGCAATGACAGTCTTAAGCC  
AAACATTTTATATAAGTGTCTTTTGTAAAGGAGAAATATATTTGTTTAAAGTAAACAT  
TTTTAAAAATTTGTTAAGTCTATGTATAATACTACTGTGAGTAAAGTAAATCTTTAAT  
AATGTGTACAAATTTTAAAGTTTAAATTTGAATAAAGGAGGATTATCAAAATAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 46

MGRGWGFLFGLLGAVWLLSSGHGEEQPPETAQRCPQVSGYLDCTCDVETIDRFNNYR  
LFPRLQKLLSDYFRYYKVNLRKPCFFWNDISQCGRRDCAVKPCQSDVVPDGIKSASYK  
SEANNLIEECBAERLGAVDESLSEETQKAVLQWTKHDDSSDNFCBADDIQSPAEYVD  
LLNPFERYTYGKGPDAWKIWNVIYENCCKFKQTIKRPLNPLASGGGTSEENTFYSWLEGL  
CVERKAPYRLISGLHASINVHLSARYLLQETWLEKKWGHNITEFQQRFDGILTEGEGPRR  
LKNLYFLYLELRALSKVLPFFEREDQLFTGNKIQDEENMMLLEILHRIKSFPLHFDE  
NSFFAGDKKEAHKLKEDFRLHFRNISRIMDCVGCFCRLWGLQTQGLGTALKILFSEKL  
IANMPESGSPSYEFHLTRQETVSLFNAFGRISTSVKELENFRNLLQNIH

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 47

GCCACGTTGTCTTCTTTCTTCACCAACCCAGGAGCTCAGAGATCTAAGCTGCTTTCC  
ATCTTTTCTCCAGCCCCCAGGACACTGACTCTGTACAGG  
ATGGGGCGCGTCTTCTTCCCTTCTCACTCTAATCCCCCTTCTCCAGCTGATCAACCCG  
GGGAGTACTCAGTGTTCCTTAGACTCCGTTATGGATAGAAGATCAAGGATGTTCTCAAC  
AGTCTAGAGTACAGTCCCTCTCCATAGCAAGAGCTCTCGTGTCTAGTCTCAAAAGC  
CAAGSCAGACCGTCTCTCTCCCTGCTGGGATGGCTCTCACTGGCTGTGCTTGTGGCTAT  
GGCTGTGTTCTGGGATGTTCACTGGAAACCACTGCCACTGCCAOTSCAGTGTGTG  
GACTGGACCACTGCCCGCTGTGCCACCTGACCTGACAGGGAGGAGGCTGAGAACTCAGT  
TTTGTGACCATGACAGTAATGAACCAAGGTCCCAACCAAGAAATCTAATCAAACTCC  
CACTTCATTTGTTCCATTCTGATTCTTGGGTAATAAAGACAACTTTGTACCTCAAAA  
AAAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 48

MSFSSCLLLILFLQLINPGSTQCSLDSVMDKKIKDVLNSLEYSPSPISKKLSCASVKS  
QGRPSSCFAGMAVTGACAGYGCGSWDVQLETTCHCCQCSVDWTARCCHLT

PCT/US00/05841

GGCAGCAGGGGGACAGGAGCTAATACCGAGCACTGAGTTGTGTCTGCTAAGCTCTCTGC  
CAGTGAATCCAGCGG  
**ATG**AAGACCTCTTCATTCCTCCCTCTTTCTCTTCTCTCTCTTCCGTGAATCTGCGTGGG  
TCCAGCATGCACTGTGTCCATCAGGAAGCATCGACAGAAGATCAACACAGACATCT  
AATCTCCCTCTTCCAAATGCAATAAAGAGATTGTCTTAATTTCTGGACAGATCTCTCCG  
GCTGTGTCTGTGGGAGCTCGAGGAGCTCAGAGTCTTBAAGCTGCTGCTGTGGCTCT  
GCTGTGTCTGTGGGAGCTCGAGGAGCTCAGAGTCTTBAAGCTGCTGCTGTGGCTCT  
GCTGAGACAGCAGCCCGCTCTGTAAGCTCAGAGTCTCTGTAAGTCTGGGAGATGAG  
CTGTGTTCTCAGACAGCAGCCGCTTCTGTGATCTCCAGAGATTTCTGATGTTCTCCGTGG  
TCTGACAGCACTGCACTGAGCTGCGCAGATCCACAGCAGACAGACATCTTAAAT  
AAACAACAAAGCTGCAAGAAAAAATAAAAAAATAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 50

MKNLGFPLFLFFLVPELLGSSMFLQPIDAIDKKIKQDFNSLFPNAIKNIGLNCWTVS  
SRGKLASCPECTAVLSGCGSACGSDIREKVCCHCQCARIDWTAARCKLOVAS

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 51

CCAGTCTGTGCGCACCTCACTTGGTGTGTGCTGTCCCCGCCAGSCAAGCCTGGGGTGAGA  
GCAACAGAGAGTGGGCGGGACC  
**ATG**CGGSGGAGCGCGCTGGGGCTCCTGGCGCTGCTGCTGGCTGCCTGCGGAGAGCTGGCG  
CCGGCCCTGCGCTGTACTCTGTCCGGAGCCCCACGGAGTGTGGGACTGTGTCAACATC  
GCCACCTGCACACCAACGAACCATGTGCAAGACCCACACTCTACTCCCGGGAGATAGTG  
TACCCCTTCCAGGGGACTCCACGGTGACCAAGTCCCTGTGCGCAGCAAGTGTAAAGCCCTCG  
GATGTGGATGCGATCGGCCAGACCTGCCCCGTGTCTGTGCAACTGAGCTGTGCAAT  
GTAGACGGGGGCCCCGCTCTGAACAGCCTCCACTGCGGGGACCTCAGGCTGCTCCCACTC  
TTGAGCCTCCGACTGT**AG**AGTCCCCGCCACCCCATGGCCCTATGCGGCCAGCCCCGA  
ATGCTTGAGAGAGTCCCCCTGCACAGGAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 52

MRGTRIALLLVLVLAACGELAPALRCYVCPEPTGVSDCVTIATCTTNETMCKITLYSREIV  
YFQSDSTVTKSCASKCKFSDVDGIGQILFVSCCNTELQNVGAPALNSLHOGALITLLPL  
LSLRRL



WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 53

AAAGTTACATTTTCTCTGGAATCTCTAGGCCACTCCCTGCTGATGCAACATCTGGGT  
 TGGGCAGAAAGGAGGGTCTTCCGAGCCCGCCTTCTGAGCTTCTGGGCCGGCTCTAG  
 AACATTCAGGCTTCCCTGCGACTCAGACCTCAGCTCCAACTATGCTTCTGAAGAAAG  
 ATGGCTGAGATGGACAGAAATGCTTATTTTGAAGAAACATGTTCTAGGTCAAACTGA  
 GTCTACCAA  
 ATGCGAGACTTTCACAAATGGTTCTAGAAGAAATCTGGACAAGTCTTTTCATGTGGTTTTTC  
 TAGCGATTGATTCATGTTTGCTCACAGATGAAGTGGCCATTCTGCTGCCCTCAGAAC  
 CTCTCTGTACTCTCAACCAACATGAAGCATCTCTTGATGTGGAGCCAGTGATCGCGCT  
 GGAGAAACAGTGTACTATTCTGTGAATACAGGGGGAGTACGAGAGCCTGTACACGAGC  
 CACATCTGGATCCCCAGCAGCTGGTGTCTCACTCACTGAAGTCTGAGTGTGATGTCACT  
 GATGACATCACGGCCACTGTGCCATACAACTTCTGTCAAGGCCACATGGGCTCACAG  
 ACTCAGCCTGGAGCATCCTGAAGCATCCCTTAAATAGAACTCAACCATCCTTACCCGA  
 CCTGGGATGGAGATCACAAAGATGGCTTCCACCTGGTTATTGAGTGGAGGACCTGGGG  
 CCCCAGTTGAGTTCCTTGTGGCTCTAGGAGGGGAGCTGGTCCGAGGAACATGTC  
 AAAATGTTGAGGAGTGGGGTATTCCAGTGCACCTAGAAACCATGGAGCCAGGGCTGCA  
 TACTGTGTGAAGGCCAGACATTCGTGAAGGCCATTGGGAGGTACAGGCCCTTCAGCCAG  
 ACAGAAATGTGGAGGTGCAAGGAGAGGCCATTCCCTGGTACTGGCCCTGTTTGCCTTT  
 GTTGGCTTCATGCTGATCCTTGTGGTGGTCCACTGTTCTGTCTGAAATGGGCGGCTG  
 CTCAGTACTCCTGTGGCCGCTGGTGGTCTCCAGACACCTTGAAATTAACCAATTCA  
 CCCCAGAAAGTTAATCAGCTGCAGAAAGGAGGAGGTGGATGCTGTGCCACGGCTGTGATG  
 TCTCTGAGGAACCTCTCAGGGCTGGATCTCATAGGTTTGGGAAGGGCCAGGTGAAG  
 CCGAGAACCTGGTCTGCATGACATGGAAC  
 CATGAGGGGACAAAGTTGTGTTTCTGTTTTCCGCCACGGACAGGGATGAGAGAGTAGGA  
 AGAGCCTGTTGTCTACAAGTCTAGAAGCAACCATCAGAGGCGAGGGTGGTTTGTCTAACAG  
 AACACTGACTGAGGCTTAGGGGATGTGACCTTAGACTGGGGGCTGCCACTTGTGGCTG  
 AGCAACCTGAGAAAGTGACTTCATCCCTTGGTCTTAAGTCTTCTCATCTGTAAATGGG  
 GGAATTAACCTACACCTCTCAACACACACAGAGTCTCTCTATATATACACAC  
 GTACACATAAATACACCCAGCTTCCAGGCTAGAGGGAACTGGTGAACCTCTACAGT  
 CTGACTGATTCACTGTTCTTGAGAGCAGGACATAAATGTATGATGAGATGATCAAGGA  
 CTCTACACACTGGGTGGCTTGAGAGCCCACTTTCCCGAATAATCTTGAAGAGAAAGG  
 AATCATGGGAGCAATGGTGTGAGTTCACTTCAAGCCCAATGCCGCTGCAGAGGGGAATG  
 GCTTAGCGAGCTCTACAGTAGGTGACCTGGAGGAAGTCAAGCCACACTGAAATGGGA  
 TGTGCATGAACACGGAGGATCCATGAACACTACTGTAAGTGTGACAGTGTGTGACACTG  
 CAGACAGCAGGTGAAATGTATGTGTCAATGCGACGAGAAATGCAGAGTCACTAACATGT  
 GCATGTTTGTGTGCTCCTTTTTCTGTTGGTAAAGTACAGAAATCAGCAAAATAAAAGG  
 GCCACCTGGCCAAAAGCGGTAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 54

MQFTTWLSEINTSLFWMFFVALIFCLLTDEVAILFAPQNLVSLSTNMKHLMLMNSFVIAP  
GETVYYSVEYQCEVESLYTSHINIPSSWCSLTSGFECVTDITATVPYNLVRATLGSQ  
TSAWSILKHDPNRRNSTILTRPGMEITKDGFLVIEEDLGPPQFELVAYNRREFGAESHV  
KMVRSGGIPVHLETMEPGAAYCVTAQTFVKAIGRISAFSGTECVSVQGBAIPVLALFAF  
VGEMLILVVVPLFVWKMGRLLQYSCCFVVVLPDTLKITNSPKLISCRKEVDACATAVM  
SPEELLRAWIS

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 55

GAGCAGGACCGAGCC  
ATGGACCCCGCCAGGAAAGCAGCTGCCAGGCCATGATCTGGACTGCAGGCTGGCTGCTG  
CTGCTGCTGCTTCCCGGAGGAGCGCAGGCCCTGGAGTSCACAGCTGCTGCAAGCA  
GATGACGGATGCTCCCGAAACAAGATGAAGACACTGAAGTCCGCGCCCGCTGGAGCTC  
TGCACCGAGGCGCTGGGGCGGTGGAGACCATCCACGACAAATTCCTGCTGGCACTCGG  
GGTTGCGGTTCCGGACTCCCGCGCAAGAATGACCGCGGCTGGATCTTCAGGGCTTCTG  
GCGTTTCATCCAGCTGCAGCAATGGCTCAGGATCGCTGCAACGCCAAGCTCAACCTCAGC  
TCGCGGGCGCTCGACCCGCGAGGTAATGAGAGTGCATACCGGCCAACCGCGTGGAGTGC  
TACAGCTGTGTGGCCCTGAGCCGGGAGGCGTGCAGGGTACATCGCCCGCGCTGCTGAGC  
TGCTACAACGCCAGCGATCATGTCTACAAGGCTGCTTCGACGGCAACGCTCACTTGAGC  
GCAGCTAATGTGACTGTGTCTTGCCTGTTCGGGGCTGTGTCAGGATGAATTCTGCAC  
CGGATGGAGTAAACAGGCCCGAGGTTCAAGCTCAGTGGCTCCTGTTCCAGGGGTCCCGC  
TGTACTCTGACCTCCGCAACAAGACCTACTTCTCCCTCGAATCCACCCCTTGTCCCG  
CTGCCCCCTCCAGAGCCCAAGACTGTGGCTCAACCAATCTGTACCACTTCTACCTCG  
GCCCCAGTGAGACCCACATCCACCACCAACCAATGCCAGCGCCACCACTCAGACTCCG  
AGACAGGGAGTAGAACACAGAGGCTCCCGGGATGAGGAGCCAGGTTGACTGGAGGGGCC  
GCTGGCCACAGGACCCAGCAATTCAGGGCAGTATCTGCAAAAGGGGGGCCCCAGCAG  
CCCCATAAAGGCTGTGTGGCTCCACAGCTGGATTGGCAGCCCTTCTGTTGGCCGTG  
GCTGCTGGTCTCTACTGTGAGCTTCTCCACCTGGAAATTCCTCTCACCTACTTCTCT  
GGCCCTGGGTACCCCTCTTCTCATCACTTCTGTTCCACCACTGGACTGGGCTGGCCCA  
GCCCCCTGTTTTCCAAATTCGCCAGTATCCCGAGCTTCTGCTGGCTGGTTTGGCGCTT  
TGGGAAATAAATAACCGTTGTATATATTCTGCCAGGGGTGTTCTAGCTTTTGGAGGACAG  
CTCCTGTATCCTTCTCATCCTTCTCTCCGCTTGTCTCTTGTGATGTTAGGACAGAGT  
GAGAGAAGTCAGCTGTACCGGGGAAGGTGAGAGAGAGGATGCTAAGCTTCTACTCACTT  
TCTCCTAGCCAGCTGGACITTTGGAGCGTGGGGTGGGTGGGACAAATGGCTCCCACTCTA  
AGCACTGCTCCCTACTCCCGCATCTTTGGGGAATCGGTTCCCATATGTTCTTCTTA  
CTAGACTGTGAGCTCTCGAGGGGGGGGCCGATACCAATTCGCCATATGTTGAGTCGTA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 56

MDPARKAGAQAMIWTAGWLLLLLLRGGQAQALECYSCVQKADDGCSFNMKTVKCAPGVDV  
CTEAVGAVETIHGQFSLAVRCCGSGLEPGKNDRLDLHGLLAFIQLQCCAQDRCNKLNLT  
SRALDPAGNESAYPPHNGVECYSCVGLSREACQGTSPFVVCYNASDHVYKGCDFGNVTLT  
AANVTVSLPVRGCVQDEFCTRDGVTGPGFTLSGSCCGSRCSNLDLKNKYFSPRIPLVR  
LPPPEPTTVASITSVTTSTSAFVRPTSTTKPMFAPTSQTPRQGVHEASRDEEPRLTGGA  
AGHQDRSNSGQYPAKGGPQPHNKGCVAFTAGLAALLLAVAAAGVLL

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 57

CGGCCACAGCTGGCATGCTCTGCCGTGATCGCCATCCTGCTGTATGTCTCTCGTCCAGTACC  
TCGTGAACCCCGGGGTGCTCCGCACGGACCCAGATGTCAAGAAT  
ATGAACACCTGGCTGCTGTCTCTCCCTCTTCCCGTGCAGGTGCAGACCCCTGATAGTC  
GTGATCATCGGGATGCTCGTCTCTCTGACTTTCTTGGCTTGGTGCACCTGGGCCAG  
CTGCTCATCTCCACATCTACCTGAGTATGTCCCCACCCCTAAGCCCCGATCCCCCCAA  
GGCTGGGTGTCAGAGCTGCTCATCTTACACCTCTACTTGAGTATGTCCCTAACCCCTGAG  
CCCCCAGGCTGGGGCCAGAGTCTTTGTCCCCGTGTGCGCATGTGTTACAGGTGAGCC  
TCTCCAGAGTGAGATCATGGACAAAAGGGCAAAATCAGGGAAGAAATTAATCCATG  
AGACCCAGCAGGCCAGCAAGAAGCTGAACCTCACGCCGAGCCTGCAGGAGTGTGTCGA  
GGTCTTGAAGTAAACAAGTTTAAATGTTTACAGAGCAATGGAATGGAATCTATTAGGCAG  
GAACAGGACATTATGAATAAGGACAGGTGGACTTCCAAAAACACAAAGTAGAAATCTAA  
CAATGAATATATTACAGGCAGGTCAACCACTAACCAAACTGAAGCGAGAGCTGGT  
GTCTTGTCTGTCTCAGAGTGGCACAGCGGTAGGCGGTCACTCATGTTGCTGAACGAG  
GAGGGTAACTCCCCAGCCCCAAGAAACCTGTGTGGAAAGTAACAACCTCCCTGCT  
CCTGGCACCAGCCGTTTGTGCTGTGTGGCCAGCTGCAAAAGCTCTTCCATTCTCTGGG  
CAGTGTGGCCCCGAGGCTGTGGGCTCTCAGGGGTTTCTGTGGACACGGGAGCAGAGT  
GTGTCCAGGCCAGCCCCAAGAATGCCCTGCTCTGACAGCTTGGCCACCCCTGGTCA  
GGCAGAGGGAGTTGGGTGGGTCAAGGCTCTGGGCTCACTCCATCTCCAGAGCATCCCTG  
CCTGCAGTTGTGGCAGAAACCCCAAGCTCAGAATGAACACACCCCAAGAGCTCCTT  
GTTTATAACACAGGTTACCTTACAAACCACTGTCCCACACAAACCTGGGATGTTTA  
AAACACACACCTCTAACGATATCTTACAGTCACTGTGTTCTTGGCTGAGGTTGAATTT  
TTTTTAATGAAAGTCAATGAAATCACTGGATTAAATCCTACGGACACAGAGCTGAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 58

MNTWLLFELFVQVQTLIVVIIGMLVLLLDPLGLVHLGQLLIFHIYLSMSPTLSRSPQ  
GMVVRAAHLTPLEVVNPEPPTPGARVPVPRVRCGGASPRSEIMDKKGSQEEIKSM  
RTQQAQQSAELTPRPaGVVPGA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 59

AGGCGGSCAGCAGCTGCAGGCTGACCTTGCAGCTTGGCGGA  
ATGGA CTGGCTCAGCAACTGCTGTTCTTCTTACCATTTCCATCTTCTGGGGCTGGGC  
CGCCCAAGAGCCCAAGCAGAGGAAGGGGCAAGGGGCTGGGGCTGGGGCTGGGGCT  
GGCCCTCAGCAGGTGCCACTGGAGCTGGTGTCAAGGATGAAGCCCTATGCCCGCATGGAG  
GAGTATGAGAGGAACATCGAGGAGATGGTGGCCAGCTGAGGAACAGCTCAGAGCTGGCC  
CAGAGAAGTGTGAGGTCACTTGCAGCTGTGGATGTCCACAGAGGAGCCCTGTCTCCC  
TGGGGCTACAGCATCAACAGACCCAGCCGATCCCGTGGACCTGCCGAGGCAAGG  
TGCCCTGTCTGGGCTGTGTGAACCCCTTCACCATGCAGGAGGACCGCAGCATGGTGAGC  
GTGCCGTTGTTCAGCCAGTTCTGTGCGCCGCGCCCTCTGCCCGCACCGCCCGCACA  
GGGCTTGGCGCCAGCGCGCATCATGGAGACCATCGCTGTGGGCTGCACCTGCATCTTC  
TGAATCACCTGGCCCAAGCCAGGCCAGCAGCCGAGACCATCCTCCTTGCACCTTTGT  
GCCAAGAAAGGCTATGAAAAGTAAACACTGACTTTTGAAGCAAG

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 60

MDWPHNLLFLLTISIFLGLGQPRSPKSKRKGQGRPGPLAPGPHQVPLDLVSRMKPYARME  
EYERNIEEMVAQLRNGSELQQRKCEVNLQLWMSNKRSLSEWGYSLNHDFSRIPVDLEAPR  
CLCLGCVNPFMTQEDRSMSVSVFVGQVFVRRRLCPFPPTGTGPRQRAVMETIAGGCTCIF



WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 61

AGATGCTCAACGACCGGTGGAAGACCATGGGCGGCGTGCCTCACTTGAGGACCGGCGC  
 GCGCAAGCCGCGAGCGGCGGAGCTGCGGCTACGTGCTGTGACCGTGTGCTGCGCCCTGG  
 CTGTGCTGTGCTGTAGCTGTACCC  
 GGTGCGGTGCTCTTCTGAACCAAGCCACGCGCGCGGCGACGCGCGCCCCACCTGTGTGTC  
 AGCACTGGGCGTGCAGCGCCAAACAGCGCCCTGGTCACTGTGGAAGGCGGACAGCTCG  
 CACCTCAGCATCCTCATTGACCCGCGCTGCCCGACCTCAGCGACAGCTTCGCAAGCCTG  
 GAGAGCGCCAGGCGCTGCTGCTGCGAGGCGTGCAGAGGACAGGCGCCAGCCACGCGCTG  
 GTGGGCGACAGGAGCAGGAGCTGTGGACACGCTGGCGGACAGCTGCCCGGCTGTG  
 GCCGAGGCTCAGAGCTGCAGAGGAGTGCATGGGCGTGGGAGGAGGCGATGGCAGCTG  
 GGCCAGGCGCTCAGGCGCTGCAGAGTGCAGAGGCGGCGCTCATCCAGCTTCTCTGTGAG  
 AGCCAGGCGCACATGGCTCAGCTGGTGAATCCGTCAGCGACATCTCGATGCCCTGCAG  
 AGGGACCGGGGCTGGGCGGCGCGGCAACAGGCGGACCTTCAGAGAGCGCTGCCGCG  
 GGAACCGGCGCGGCGGCTGGCCACTGGCTCCCGGCGCGGAGCTGTCTGGAGCTCCTC  
 CTAAGCGGACAGCAGGAGCATGGCGCTACTCTGTCTTTCCAGCCACTACCGGCGCGG  
 TTCAGGTGTACTGTGACATGCGCAGGAGCGGCGGCTGGACGCTTTTTCAGCGCGG  
 GAGGACGCTCCGTGAATCTTTCGCGGCTGGGACGCTACCGAGACGCTTTGGCAGG  
 CTCACCGGCGGAGCACTGGCTAGGCTCAAGAGGATCCAGCGCTGACCAACAGGCTGCC  
 TAGAGCTGCGACGTGGACCTGGAGGACTTTGAGGATGGCAGGCTATGCCGCTACGGG  
 AGCTTCGCGCTGGGCTTTCTCCGTGACCTGAGGAGAGCGGCTATCCGCTCAGCGTG  
 GCTGACTATTCCGCGACTGCGAGGCGCTCCCTCTGAGACAGCGGCTAGGCTTACCC  
 ACCAAGGACGCTGACGCGACCATTCAGAGAACTGTGTCCGCTTCTACCGGCTGCC  
 TGGTGTACCGCACTGCCACAGTCCAACTCAATGGGCGGTACCTGCGGCTGGCAGTACTCAAG  
 TTCTCTGAGATGAAGATCCGCGCGGCTCCGGGAGGACCGCTAGACTGGTGCACTTGTCT  
 TGGCCCTGCTGTGCTGTGCGCCATCCCGGACCCACTCACTCTTCTGTGAATGTTT  
 TCCACCCACTGTGCTGGCGGAGCCACTCTCCAGTAGGAGGCGGCGGCGCATCCTGTA  
 CACGAAGCTCCCTGGGCGGAGGAGTCAACATCGCTCTCTCGCGCTCCCGACCCCTCC  
 ATTTGGCAGCTCACTGATCTCTTGGCTCTGCTGATGGGCGCTGGCAACTTGAAGACCC  
 AACTCTGCGCTGCCCGACTGTGACTCGGCTGCTGTTGCGCTCCCTGCGCAGGATGGT  
 GAGTCTGCGCGGCGGCGCTGCTGCTGCGCGGCGCAATACCGGCGATTTATGGGAGAG  
 AGAGCAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG  
 CTCTCTGAGCTCAGGCTGAGGCGGAGTATCTCCAGGCTCCCAATGCCAAGCCCGACCC  
 CGTTCTGCTGCTGCGCGGAGGACCCACTCTCCCGCA  
 GGGCTCAGCTGGCTGTGGGCTGGGTGGCGCCATCTACAGGCGCTGAGGTGAGGATG  
 GGGAGCTGTGCTTTGGGAGCCAGCTCCAGGCTGAGACAGTTCCCTGGAGGCGAC  
 CCACCTGTGCGCGGCGGCGGCTGGGCTGCGAGCTCTTACCTGTGTGCGCCACTGCT  
 TCTGTCTCAATGAGGCGCAACCATCCCGGCGGAGTCCCGGCGCTCTCTTACTCT  
 GGGCGAGCGGCGGCTGCCATCCATTTCTCTGCTCTGGAAGGTGGTGGGCGCTGCA  
 CCGTGGGCTGGACTGCGTAATGGGAGCTCTTGGTTTCTGGGCTGGGCGCTAGGCG  
 GGCTGGGATGAGCTGTGTAACCCCGGCGCAATTTCCAGGAGCTCCAGGCTCTGTA  
 GGCTCCCGGAGGCGCTTGGGCGGATGAGCCCTTCCCTGAGGTGGCTGTCTCATGAG  
 GAGGCCAACCTTGGCATGACCGTGGCACCTGGACCCAGGCGGCGGCGGCGGCGG  
 GTGGTCAAGGAGCAGGAGCACCTCAACCGGCGCAATGGGCTGGGCGGAGTGGGCGACA  
 GACAGGCGACCACTGGACCTTTCTGTGTAATCTCCCAACAGCGAGCAGCTGTAT  
 CCCCACCTCTGTGTGACACATGAGAGGTGAGACCGGAGGCTCCAGGAGCAGCAGC  
 CACAAGGCGAGGCTGGAGCGGCTCTGAGCTGTCTGCTCAGGCGCTGAGCGCGCT  
 GCGTTACGTGAGGCGGAGTGCAGGCGGCTTTTCCAGGCGCTCTGATGGGCGCTCGG  
 AAGGCGTGGAGTCAAGCTTGGGAGCTGCTAGCAGCTCTCTCGGCGGAGGCGGAG  
 GTGGCTTCTCCAAAGGACACCGATGGAGGTGCTAGGCGGTGTGGGTTCCGTTCTC  
 CTTCCCTCCCACTGAAGTTGTGCTAAAAAACAATAATTGACTTGGCAGCACTGG  
 GGGTTGGTGGGAGGCGGTGTGACCTGGCTCTCTGTCCAGTGCACAGGCTATCCAC  
 ATGCGCAG

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 62

MVNDRWKTMGGAAQLEDPRPRDKFQRPSCGYVLCTVLLALAVLLAVAVTGAVLFLNHAHAP  
GIAFPFVYSTGAASANSALVTVERADSSHLILIDPRCPDLTDSFARLESQAQASVLOALT  
EHQAQPRLVGDQDQELLDTLADQLPILLARASELOTECMGLAKGHGTLGQGLSALOSEQG  
RLIQLLESQGHMAHLVNSVSDILDALORDRGLRPRNKADLQAPARGTRPRGCATGSR  
PRDCLDVLLSGQDDGVYSVEPTHYPAGFQVYCDMRTDGGGWTVPORREDGSYNFPRGWD  
AYRDSFGRLTGEHMLGLKRIHALTTQAAYELHVDLEDFENGTAARYGSGFVGLFSVDPE  
EDGVPLTVADYSGTAGDSLKHSQMRFTTKDRSDHSENNCAAFYRGAWWYRNCHTSLN  
GQYLGAHASYADGVESWTGWQYSLKFSEMKIRPVREDR

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 63

AGTGACTGCAGCCTTCTTAGATCCCTCCACTCGGTTTCTCTTTTGACGAGACACCGGC  
AGCACCAAGTGTGTGAGGGGAGCAGGCAGCGGTCTTAGCCAGTTCTTGTATCCTGCCAGAC  
CACCCAGCCCCCGGCACAGAGCTGCTCCACAGGCACC  
ATGAGGATCATGCTGCTATTACAGCCATCCTGGCCTTCAGCCTAGCTCAGAGCTTTGGG  
GCTGTCTGTAGGAGCCACAGGAGGAGGTGGTTCTGGCGGGGGCCGACAGAGAGGGAT  
CCAGATCTCTACGAGCTGCTCCAGAGACTCTTCAAAAGCCACTCATCTCTGGAGGGATTG  
CTCAAGCCCTGAGCCAGGCTAGCACAGATCTTAAGGAATCAACATCTCCGAGGAAAGT  
GACATGCATGACTTCTTTGTGGACTTATGGGCAAGAGGAGCGTCCAGCCAGAGGGAAG  
ACAGGACCTTTCTTACCTTCAGTGAGGGTTCTCGGCCCCCTCATCCCAATCAGCTTGA  
TCCACAGGAAAGTCTTCCCTGGGAACAGAGGAGCAGAGACCTTTATAGACTCTCCTACG  
GATGTGAATCAAGAGAAAGTCCCGAGCTTTGGCATCTCAAGTATCCCGAGAGCAGAA  
TAGGTACTCCACTTCGGACTCCCGACTTGGACTGCAATAGGAAGACCTCTTCCCTGTCCCAAT  
CCCCAGGTGCGCAGCTCCTGTACCTTCTCTTCCCTGTTCTTGTAAATCTTGTGC  
TTTGACTCCTTCTCCATCTTTTCTACCTGACCTGGTGTGGAACTGCATAGTGAATATC  
CCCAACCCCAATGGGCATTGACTGTAGAATACCTAGAGTTCTCTGTAGTGTCTTACATTA  
AAAAATATAATGTCTCTCTATTCTCAACATAAAGGATTTTGCATATGAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 64

MRIMLLFTAILAPSLAQSPGAVCKEFOEEVVEGGGRSKRDPDLVQLLQRLFKSHSSLEGL  
LKALSOASTDPKESTSPKRDMDHFFVGLNGKRSVQPEGKTGPFPLPSVRVPRPLHPNQLG  
STGKSSLGTEQRPL

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 65

CTGACATGSCCTGACTCGGACAGCTCAGAGCAGGCGAGAACTGGGACACTCTGGGCGG  
 GCCTTCGCTTCG  
 ATGAGCGCTCTGAAGCCACCTGTCTCTGAGGAAACACGAGCGAGGGAAGGACAGG  
 GACTCGTGTGGCAGGAAGAACTCAGAGCCGGGAAGCCCACTTCACTAGAAGCACTGAGA  
 GATGCGGCCCCCTCGCAGGGT  
 CTGAATTTCTGCTGCTGTTCACAAAGATGCTTTTATCTTTAACTTTTGTGTTTCCCA  
 CTTCGACCCCGCGCTTGATCTGCATCTGACATTGGAGCTGCCATCTTCTGTGGCTG  
 ATCCAGAGCCTCAACCCGCTTACCTCTCTTGACCTGAACAATCAGTCTGTGGGAATT  
 GAGGGAGGAGCACGGAAGGGGTTTCCAGAAAGAACATGACCTAACAGTTGCTGCTTC  
 TCAGATGCCAAGACTATGATATGAGGTTTTCCAAAGAGGACTCGCTGTGTGACAAATGGG  
 CCTGCTTGGGATATAGAAAACCAACAGCCCTACAGATGGCTATCTTACAAACAGGTG  
 TCTGATAGAGCAGAGTACCTGGGTTCTGTCTCTTGACATAAGGTATATAATCATCACCA  
 GACCAGTTTGTGGCTATCTTGTCTCAGATAGGCCAGAGTGGATCATCTCCGAATTGGCT  
 TGTTCACGTACTCTATGGTAGCTGTACCTCTGTATGACACCTGGGACCCAGAGCCATC  
 GTACATATTTGTCAACAGGCTGATATCGCCATGGTGATCTGTGACACCCCAAAAGGCA  
 TTGGTGTGATAGGGAATGTAGAGAAAGGCTTACCCGAGCTGAAGGTGATCATCTTT  
 ATGGACCCCTTTGATGATGACCTGAAGCAAGAGGGGAGAGAGTGAATTGAGATCTTA  
 TCCCTATATGATGCTGAGAACCTAGGCAAGAGCACTTCAGAAAACCTGTGCCTCTAGC  
 CCAGAGACCTGAGCGTCACTGCTTACCAAGTGGGACCAAGGTGACCCCAAGAGGAGCC  
 ATGATAACCCATCAAAATATTTGTTTCAAAATGCTGCTGCTTTCTCAAAATGTGTGAGCAT  
 GCTTATGAGCCCACTCTGATGATGTGGCCATATCTTACCTCCCTCTGGCTCATATGTTT  
 GAGAGGATTGTACAGGCTGTTGTGACAGCTGTGGAGCCAGAGTTGGATTCTTCCAAAGG  
 GATATTCGGTTGCTGGCTGACGACATGAAGACTTTGAAGCCACATTGTTTCCCGCGGTG  
 CCTCGACTCTTAAACAGGATCTACGATAAGGTACAAAATGAGGCCAAGACACCCCTTGAAG  
 AAGTTCTTGTGAAGCTGGCTGTTCCAGTAAATTCRAAGAGCTTCRAAGGGATCATC  
 AGGCATGATAGTTTCTGGGACAAGCTCATCTTGCRAAGATCCAGGACAGCCTGGGCGGA  
 AGGGTTCGTATATTTGCTACTGGAGCTGCCCATGCTCCACTTCAGTCATGACATTCTTC  
 CGGGCAGCAATGGGATGTCAAGGTGTATGAAGCTTATGCTCAAAACAGATGACAGGTGSC  
 TGTACATTTACATTACCTGGGACTGGACATCAGGTCACGTTGGGGTGCCCTGGCTTGC  
 AATTACGTGAAGCTGGAAGATGTGGCTGACATGAAGTACTTTACAGTGAATATGAAGGA  
 GAGGTCTGCATCAAGGTTACAAACGTGTTCAAGGATACCTGAGGACCTGAGAGACA  
 CAGGAGCCCTGGACAGTGATGGCTGGC  
 TTGACACAGGAGACATTGCTGCTGGCTCCGAAATGGAACCTCGAAGATCTTCGACCGTA  
 AAAGACACATTTTCAAGCTGGCCCAAGGAGAAATACATTGACACAGAGAGATGAGAAAATA  
 TCTACACAGAGCTCAACCAAGTGTACAAATTTTGTACACGGGAGAGCTTACGCTCAT  
 CCTTACTAGGAGTGTGGTCTTCTGACACAGATGTACTTCCCTCATTTTGACGCCAAGCTTG  
 GGGTGAAGGCTCCTTTGAGGAACGTGSCAAAACCAAGTTGTAAGGGAAGCCATTTTAG  
 AAGACTTGCAAGAAATTTGGGAAGAAAGTGGCCTTAAACCTTTGAACAGGTCAAAGCCA  
 TTTTCTTCAATCCAGAGCCATTTTCCATTGAAAATGGGCTCTTGACACCAACATTGAAG  
 CAAAGCGAGGAGAGCTTCCAAATACTTTGGGACCCAAATGACAGCCTGTATGAGCACA  
 TCCAGGATTAGGATAAGGTACTTAAGTACCTGCCGCCCACTGTGCACTGCTTGTGAGAA  
 AATGGATTAAAACTATTCTTACATTTGTTTTCCTCTTCTCTTATTTTAACTCTG  
 TTAACCTCTAAAGCCATAGCTTTTGTGTTTATATGAGACATATAATGTGTAACCTTAGTT  
 CCCAAATTAATCAATCTGCTCTTCCCATCTTCGATGTTGCTAATATTAAGGCTTCAGGG  
 CTACTTTTATCAACATGCTGCTCTTCAAGATCCAGTTTATGTTCTGTGTCCTTCTCAT  
 GATTTCCAACTTAATATCTATTAGTAACCAAGTTCAAGGTCAAAGGGACCTCTGTG  
 CCTTCTCTTTGTTTGTGATAAACATAACTTGCCAAACAGTCTCTATGCTTATTATCATC  
 TTCTACTGTTCAAACTAAGAGATTTTAAATTCGAAAACTGCTTACAAATCATGTTT  
 CTAGCCACTCCACAAACCACTAAATTTTAGTTTTCAGCTATCACTCATGTCAATCATAT  
 CTATGAGACAAATGTCTCCGATGCTCTTTCGCTAAATTAATTTGTGTACTGAAGGAGAA  
 AGTTTGATCATACCAACATTTCTTAACTCTCTAGTTAGATATCTGACTTGGGAGTAT  
 AAAAAATGGGCTATGACATCTGCTCAAAAGGAATGCTGTTCTTAAAGCATTTATTACA  
 GTAAGGACTGGGAGTAATCTGTTCCCTACAGTTTGTGCTGAGCTGGAAGCTGTGGGG  
 GAAGGAGTTGACAGGTGGGCCAGTGAACCTTTCCAGTAAATGAAGCAAGCACTGAATAA  
 AACTCTGAACTGGGAACAAAGATCTACAGGCAAGATGCCCAACACAGGCTT

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 66

MDALKPFCLWRNHERGKKDRDSCGRKNSEPGSPHSLEALRDAAPSOGLNPLLLFTKMLFI  
FNFLFSFELFTALICILITFGAAIFLWLTTPQPVLELLDLNNSVGIIEGARKVVSQKN  
DLTSCCFSDAKMTIEVFQGLAVSDNGFCIGYRKPNQPYRWLSYKQVSDRAEYLGSCLLH  
KGIKSSFDQFVGIFAQNRPEWISLACVYYSNVAVPLYDTLQPAIYHIVNKADIAWVI  
CCTPQKALVLIQNVKSGPTPSLKVIIIMDPFDDDLKQGEKSGEILSLYDAENLGKEHF  
RKPVPSPEDLSVICFTSGTTGDEKGMITHQNIIVSHAAFLKCVHAYEPTFDDVAISY  
LPLAHMFERIVQAVVYSGGARVGFPGODIRLLADDMKTLKPTLFFAVPRLLNRIYDKVON  
BAKTTPLKKPLLKLVSSKFKELQKGIIRHDSFMDKLIFAKIQDSLGGVRVIVITGAAPMS  
TSVMTEFRAAMGCOVYEAYGQTECTGGCTFTLPGDNTSGHVGVPLACNVKLEDVADMNY  
FTVNNRGEVCIKGTNVFKGYLKDEKTEQALDSGDLHTGDIQRWLPNGTLKIIDRKKNI  
FKLAQGEYLAPEKIENIYNRSQPVLIQIFVHGESISSLVGVVVVPTDVLPSFAAKLGKVG  
SFEELCQNVVREILEDLOKIGKESGLKTFEQVKAIFLHPEPFSIENGLLTPTLKAKRG  
ELSKYFRTQIDSLYEHIQD

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 67

GAAAGA  
AIGTTGTGGCTGCTCTTTTTCTGGTGACTGCCATTATGCT  
GAACCTGTCAACCAAGGTGCAGAAATGCTTTAAAGTGAGACTTAGTATCAGAACAGCT  
CTGGGAGATAAAGCMTATGCCTGGGATACCAATGAAGAATACCTCTTCARAGCGATGGTA  
GCTTTCTCCATGAGAAAGTTCCCAACAGAGAGCAGAGAAATTTCCCATGTCTACTT  
TGCAATGTAAACCCAGAGGGTATCATTCTGGTTTGTGGTTACAGACCTTCAAAAAATCAC  
ACCTTCTCTGCTGTGAGGTGCAATCAGCCATAGAATGAACAAGAACCGGATCAACAAT  
GCCTCTTTCTAAATGACCAAACTCTGGAATTTTAAAAATCCCTTCCACACTTGCACCA  
CCCATGGACCCATCTGTGCCATCTGGATTATATATTTGGTGTGATATTTGCAATCATC  
ATAGTTGCAATTGCACTACTGATTTTATCAGGGATCTGGCAACGTAGAAGAAAGACAAA  
GAACCATCTGAAGTGGATGACGCTGAAGTAAAGTGTGAAAACATGATCACAATTGAAAAAT  
GGCATCCCTCTGATCCCTGGACATGAAGGGGGGCATATTAATGATGCCCTTCATGACAG  
AGGATGAGAGGCTCACCCCTCTCTGAAGGGCTGTTGTTCTGCTTCTCAAGAAATTAAC  
ATTTGTTTCTGTGTGACTGCTGAGCATCTGAAATACCAAGAGCAGATCATATATTTGT  
TTACCATTTCTTTTGTAAATAATTTGAATGTGCTTGAAGTGAAAGCAATCAATT  
ATACCCACCAACCACTGAAATCATAGCTATTACGACTCAAAATATTCTAAAAATT  
TTTCTGACGATATAGTG  
TATAAATGTGTCATGTGGTATTTGTAGTTATGATTTAAGCATTTTGAATAAAGATC  
AGGCATATGTATATATTTTCACTTCAAGACCTAAGGAAAAATAAATTTCCAGTGA  
GAATACATATAATATGGTGTAGAAATCATTGAAATGGATCTTTTGAAGTCACTTAT  
ATCACTCTGTATATGACTAAGTAAACAAAAGTGAGAGTAATTATTGTAATGGATGGAT  
AAAAATGGAATTACTCATATACAGGGTGAATTTTATCCTGTTATCACACCAACAGTTGA  
TTATATATTTTCTGAATACAGCCCTAATAGGACAATTTATTTGTTGACCATTTCTAC  
AATTTGTAAAGTCCAATCTGTCTAATTATAAAGTATAATCATCTCTTTTAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 68

MLWLLFFLVTAIHAELCQPGRAENAFKVRLSIRLTALGDKAYAWDTNEEYLFKAMVAFPMRK  
VPNRATEISHVLLCNVTQRVSFVFWVDDPSKNHTLPAVEVQSAIRMNKNRINNAFFLND  
QTLBFLKIPSTLAPPMDPSVPIWIIIFGVIFCTIIIVAILLILSGIWQRRRNKEPSEVD  
DAEDKCEMMITIENGIPSDPLDMKGGILMMP



WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 69

AACTCAAACCTCTCTCTGGGAAAACGCGGTGCTTGCTCCTCCCGAGTGGCCTTGGCA  
GGGTGTTGGAGCCCTGGGTCTGCCCCGTCCGGTCTCTGGGGCCAAAGCTGGGTTCCTC  
AGGTATGGCAAGAGCTCTACTCTGCGGTGCTCTTCTCCTTGGCATACAGCTCACAGCT  
CTTTGGCCTATAGCAGCTGTGGAATTTATACCTCCCGGTGCTGGAGCTGTAAATGG  
ACAGATGCTCGGTAAATATGCACTTTCTCCAGCTTTGCCCTGTGGGTGATGCTCTAACA  
GTGACCTGGAATTTCTGCTCTCTAGACGGGGACCTGAGCAGTTTGTATTTACTACCA  
ATAGATCCCTTCCAACCATGAGTGGCGGTTTAAGGACCGGTGTCTTGGATGGGAAT  
CCTGAGCGGTACGATGCTCCATCCTTCTCTGGAACCTGCACTTCGACGACAATGGGACA  
TACACTGCCAGGTGAAGAACCCAGCTGATGTTGATGGGTGATAGGGAGATCCGGCTC  
AGCGTCTGCACTGATGATCAATAGTAATTTAGTGGTCTCTTCCAGCATTAACGGAAA  
AAGCGATGGGCCGAAAGGCTCATAAAGTGGTGGAGATAAATCAAAGAGAGGAAAGG  
CTCAACCAAGAGAAAAGGTCTCTGTTTATTTAGAGACACAGACTAAATTTTAGATG  
GAAGCTGAGATGATTTCCAAAGAACAGAACCTAGTATTTCTTGAAGTTAATGGAACTT  
TTCTTTGGCTTTTCCAGTTGTGACCCGTTTCCAAACAGTTCTGAGCATATAGAACTT  
AGACAAGCAACACCCCTCTGGAGCCAGCACAGTGTCTCCATATCACCAGTCATACACA  
GCCTCATTATTAAAGTCTTATTAAATTCAGAGTGTA  
ATTTTTCAAGTGCTCATTAGGTTTTATAAACAAGAGCTACATTTTGGCCCTTAAGACA  
CTACTTACAGTGTATGACTTGTATACACATATATTGATCAAGGGGATAAAGCCAA  
TTTGTCTGTACATTTCCCTTACGATTTCTTTTAGCAGCACTTCTGTACTAAAGTTA  
ATGTGTTTACTCTCTTCTTCCACATTTCTCAATTAAGAGTGAGCTAAGCCTCCTCGG  
TGTTTCTGATTACAGTAAATCCATAATCAAACGTGTTAAATGACATTTTATTTTATG  
TCTCTCTTAATATGAGACACATCTTGTTTTACTGAATTTCTTCAATATCCAGGTGA  
TAGATTTTTGTCG

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 70

MYGKSSTRAVLLLLLGIQLTALWPIAAVEIYTSRVLEAVNGTDARKCTFSSFAPVGDALT  
VTWNFRPLDGGFEQFVEFYHLDFFQPM8GRFKDRVSMGDNPERYDASILLWKLQFDENGT  
YTCQVKNPPDVGIVGEINLSVVHTVRFSEIHFLALAIGSACALMIITIVVVVLFQHYRK  
KRWAEARAHKVVEIKSKEEERLNQ8KKVSVYLEDTD

PCT/US00/05841

AGAGCAACCAAACTGGAGCTCTGGGAGGCTTGTCCGCTCTCCCTCGCTCTGCTAGGGA  
GAGGACGACGAGGAGGAGGCGGCTGGCCGCCGGGCAAGCTCTCAGAAACGCTGACCGAGG  
**ATG**TACTCTGCTGGTGGTCTGGTGGTGGCTGGCCAGCTCTGGCGCGGTATGGCCCCGGGA  
GAGGAGGACGACGAGGCGGAGCAGCAGCAAGCAAGCAATGTGGT  
CTGGTGGTGGGACGACTCTCTGATGGAGAGGTTACATTTATCCAGGAAGTCAGGTAGTGT  
AAACTCTCTTTTACAACCTTTATGAAGACAAGCTGGGAGCTCTGTTTGAAGTCTGACACA  
AATCTCCAATTTGGTGGCCATACGCGCAGCAATGGAGTGGSCCTCTCTCATCACTTA  
ACAGATTTTGGGAATTTTAAAGGCTTAGATCAAATATACACAATGATGGATGTCT  
ATGGAAGAGGATCGGTCTACGAAACAGCAAGTGTGGGAATCGGATCACTATCCAGGACAT  
CATCTCAATGTATGATCTGGTGGAGAGCTGGGACAGAGATGTGGTTCTTATCTACGACAA  
GAAGGACGCCCATGGTAAATCTTATCTTCGTCAGGACATTAAGTCAGAGTCAGATGGTGAAGG  
TTGGCAGACATACAGCAAAATCGAATCGTATCGGTAGGAAGGAAGCAATTAATGACAT  
GACCATTTGTTATTTACCTGGAGTTAAATTTACCCACACCTTACCTCTACCATCTCT  
TGAGAAAATTTGGATCTTCAACATTTACACATCTCTTTATTTGGTTGAAAAGTGTTCT  
CATGATGGCTCACTCAAAATCCCAAGGTGGTCACTCTTGTGAGAAATGACCCCTGGATATTT  
TACTGCTCTTCAAAAAACCTGACATCTGCTTGTGATTAAGAAAGAAATGAGATAT  
ATGACATTTTATTTATGAGAGCAAGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT  
TCCCTTCTGCAATTAGATCTCTTCAGAAAATTTGGTTCATATCTCTCAGACATCGA  
GAGCTTCAGCATGGACATCGACATGTTTATAAATGAGCATATGACAGGCTATGTCACAT  
TCTTCGCTTTTGATATGGTGACAGGAATTTAAGATCCGCGCTCAAGATTAACAATGTGGT  
TCTCTTGGGATATTTACCTTCACTGCTGTAATTTGTGGTAAATTTCTCTCGTCAAGAC  
TGAGTGGATATCTTTTGTGGCTGTTATCATCAGAAAAGCAATTAAGAATGATCAAAAGT  
AAAAACCTGACCTACCCCTGGATTTGAGTGAATTCCTAGGTGTGATTAAGTGAATCGCTCC  
ACCTACATGCTTGCAGATTAACATGCAATGATATAGCTCATTTGGAATGGATCAATATA  
TGGCTCAACTCTTTGATCTCTTCTCGGATCGAGATGAATTAAGAAATTTGCTCTGTAAAT  
TTTCAGAAAATTTCTGCTTTTGGATCAGCAAGCTTACATTCATTTAAATCACTCTAAAT  
GTTTCCGAAATCTGCTCAACAGTATATAAGACAGTTTATCAAGTGGAAACAAAGTATA  
GACAGCAATTTCAACATCTATAGCAATTTAGTGGTGGTCCAGCAAGCTGGCAGAGGAA  
CAAGAGATATGATGAATGCAATTTGATCTAGTGGCTTAARACCTATAGTAATCAAGACGA  
TGT**GA**ACAGAAAGTTTAAAAATAGTGTCTTGAATATACAGATTTATATACAGATCT  
ATTAATTAATGATTTTAAATGAGGTTTATAAGATTAACAAGTTTGGCGCGGCACAT  
GGCTCACACCTGTAATCCGAGGACCTTGGGAGGCTGGAGAAAGCAGATCAAGGCTCAAG  
AGATTTAGACATCTCTGGCACAATGSGTAAGCTCGTCTCTCATTAATAATCAAAAAT  
AGCTGGGCGGGGTGGTGGAGGAGCTGTTGGTGGAGCTGAGATCTCAGAGCTGAGTCT  
TGGAGAGGAGGAGGAGGAGCTGTTGGTGGAGCTGAGATCTCAGATCTGATCTGCTCGC  
TGBCACAGCTGAGCATCTGCTCTGACAAAAATAAATAAATAATAATATTAATCACT  
TTTTCATATTTTGAAGATGTAGTATTTTGAATTAAGATGCCAATGATTATAAAT  
CACATATTTCAAAAATGGTATTTATTTAGGCTTTTGTACAAATTTCAACAAATTTGG  
AGTATCAAAAGAGGTGAAGCAAAATCTGTAAACAGTTTGTGTCTTTAAATATAGNAGA  
TATAAATTTGTTATTAATGTGATCATAAAAATTTGTTGTTGAGCATTTGATGGTGGAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 72

MLLLWVSVVAALALAVLAPGAGEQRRRAAKAPNVVLVVSDFDGLTFHFGSQVVKLPFI  
NFMKTRGTSFLNAYTNSPICCPRAAMWSGLFTHLTESWNNFKGLDPNYTTWMDVMERHG  
YRTQKFGKLDYTSGHHSISNRVEAWTRDVAFLLRQEGRPVNLIRNRTKVRVMERDQONT  
DKAVNWLKKEAINYTEPFVIVLGLNLPHYPSPSSGENFGSSTPHTSLYWLEKVSHTDAIK  
IPKWSPLSEMHFVDYSSYTNCTGRFTKKEIKNIRAFYYAMCAETDAMLGEIILALHQL  
DLLQKTIVIIYSSDHGELAMERQFYKMSMYEASAHVPLNMGPGLKAGLQVSNVSLVDI  
YPTMLDIAGIPLPQNLGGYSLFLSSETFKNEHKVKNLHPPWILSEFHGCNVNASTYMLR  
TNHWKYIAYS DGASILEQLFDLSSDPDELTVAVKFPETIYSLDQKLHSIINYPKVSASV  
HQYNKEQPIKWKQSIGQNVSNVIANLRWHQDWQKEPRKYENAIQWLKTHMNPRAV

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 73

GACGCCAGTGACCTGCCGAGGTCGGCAGCACAGAGCTCTGGAG  
ATGAAGACCCCTGTTCCTGGGTGTACGCTCGGCTGGCCGCTGCCCTGTCTTCACCCCTG  
GAGGAGGAGGATATCACAGGACCTGGTACCTGAAGCCATGGTGGTCGATAAGGACTTT  
CCGGAGGACAGGAGGCCAGGAAGGTGTCCCAAGTGAGGTGACAGCCCTGGGCGGTGGG  
AAGTTGGAGCCACGTTACCTTCATGAGGGAGGATCGGTGCATCCAGAAAGAAAATCCTG  
ATGCGGAAGACGGAGGAGCTGGCAATAACAGCGCTTATGGGGCAGGAAGCTCATGTAC  
CTGCGGAGCTGCCAGGAGGACCACTACATCTTTACTGCAAGACCAAGCACCATGGG  
GGCCTGCTCCACATGGGAAAGCTGTGGGTAGGAATTCTGATACCAACCGGGAGGCCCTG  
GAAGAATTAAAGAAATTGGTGCAAGCAAGGGACTCTCGGAGGAGGACATTTTACGCCC  
CTGCAGACGGGAAGCTGCGTTCCGGAACACTAGGCAGCCCCGGGTCTGCACCTCCAGAG  
CCACCCCTACCAACAGACACAGAGCCCGGACCACTGGACCTACCTCCAGCCATGACCC  
TTCCCTGCTCCACCCACCTGACTCCAAATAAAGTCCTTTCCCCCAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 74

MKTLFLGVTLGLAALSFLEEDITGTWYVKAMVVDKDFPEDRRPRKVSPVKVTALGGG  
KLEATFTFMREDRCIQKILMRKTEEPGKYSAYGGRKMLYLQELPRRDHYIFVCKDQHHG  
GLLHMGLVGRNSDTNREALEEPFKLVQRKGLSEEDIFTPLQTGSCVPEH

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 75

CTGGGATCAGCCACTGCAGCTCCCTGAGCACTCTCTACAGAGACGGGACCCAGAC  
ATGAGGAGGCTCCTCCTGCTCACCAGCCTGGTGGTTGTGCTGCTGTTGGAGGCGGTGCA  
GTCCAGACACCAAGGTCCCTATCAAGATGCAAGTCAAACTCTGGCCCTCAGAGCAGGAC  
CCAGAGAGGCTGGGGCGCCCTGTGGTGGAGCCTCCGGAGAGGAGGACCAAGCTGGTG  
GTGCTGTTCCCTGTCCAGAGCCGAACTCTTGACCCAGGAGGAGGACCAAGGTCTAG  
GGCAGGGGGCCCATCCTTCCAGGCACCAAGCCTGATGGAGACCGAGGACACCTGGGC  
CGTGTCTGAGTCCCGAGCCCGACCATGACAGCCTGTACACCTCCGGCTGAGGAGGAC  
CAGGGCGAGGAGGAGGCGCCGCTGTGGGTGATGCCAATCACCAAGGTGCTCCTGGGACCG  
GAGGAAGACCAAGACCACTATACACCCCAAGTGGGCTCCAGGGGCCATCACTGCCCC  
CGCCCTGTCCAGGCGCCAGGCTGTGGGACTGGGACCTCCCTACCTGCCCCAGCTAG  
ACAATAAACCAGCAGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 76

MRRLVLTSLVVVLLWEAGAVPAPKVPPIKMQVKKHPSEQDPEKAWGARVVEPPERDDQLV  
VLFPVQKPKLLTTEKPRQQRGPIPGTKAMMETEDTLGRVLSFEFDHDSLYHFPPEED  
QGEEPRRLWVMPNHQVLLGFEEQDHIYHPQ



WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 77

GGGAGAGAGGATAAAATAGCAGCGTGGCTTCCCTGGCTCCTCTCTGCATCCTTCCCGACCT  
TCCAGCAATATGCATCTTGCACTGTGGTGGCTCCTGCTCCCTCCTTCTGCTACTGGG  
GGCCCTGTCTGG  
ATGGGCGGCCAGCGATGACCCATTGAGAAGGTCAATGAAGGGATCAACGAGGGCTGAG  
CAATGCAGAGAGAGAGGTGGCAAGGCCCTGGATGGCATCAACAGTGGAAATCAGCATGC  
CGAAGGGAAAGTGGAGAAGGTTTCAACGGACTTAGCAACATGGGGAGCCACACCGGCAA  
GGAGTTGGACAAAGGCGTCCAGGGGCTCAACACGGCATGGACAAGGTTGCCCATGAGAT  
CAACCATGGTATTGGACAAGCAGGAAGGAAGCAGAGAAGCTTGGCCATGGGGTCAACAA  
CGCTGCTGGACAGGCCGGGAAGGAAGCAGACAAGCGGTCCAAGGGTTCCACACTGGGGT  
CCACCAGGCTGGGAAGGAAGCAGAGAACTTGGCCAGGGGTCAACCATGCTGCTGCTGACCA  
GGCTGGAAGGGAAGTGGAGAAGCTTGGCCAGGTGCCACCATGCTGCTGGCCAGGCCGG  
GAAGGAGCTGCAGAAATGCTCATAATGGGTCACCAAGCCAGCAGGAGGGCCACCAACAGCT  
GCTGAATGGCAACCATCAAGCGGATCTTCCAGCCATCAAGGAGGGGCCACCAACACGCC  
GTTAGCCTCTGGGGCCTCAGTCAACACGCTTTTCATCAACCTTCCCGCCCTGTGGAGGAG  
CGTCGCCAACATCATGCCCTAAACTGGCATCCGGCCTTGTGGGAGATAATGTCGCGGT  
TGTCACATCAGCTGACATGACCTGGAGGGGTTGGGGTGGGGGACAGGTTTCTGAAATCC  
CTGAAGGGGTTGTACTGGGATTGTGAATAAACTTGATACACCA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 78

MHLARLVGSCSLLLLGAISGWAASDDPIEKVIEGINRGLSNAEREVKGALDGINSGITH  
AGREVEKVFNGLSNMGSHGTGKELDKGVQGLNHGMDKVAHEINHIGIAGKEAEKLGHGVN  
NAAGQAGKEADKAVQGFHTGVHQAGKEAEKLGQGVNHADQAGKEVEKLGQGAHHAAGQA  
GKELQNAHNGVNAQSKANQLLNQNHQSGSSSHOGGATTTPLASGASVNTPPFINLPALWR  
SVANIMP

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 79

GGACAAACCGTTGCTGGGTGTCCAGGGCTGAGGCAGGACGGTACTCGCTGACACCTTC  
CCTTTCGGCCTTGAGGTTCCAGCCTGGTGGCCCCAGGACGTTCCGGTCGCATGGCAGAG  
TGCTACGGACGAGCCT  
ATGAAGCCCTTAGTCTTCTAGTTGCGCTTTTGCTATGGCCTTCGTCTGTGCCGGCTTAT  
CCGAGCATAACTGTGACACCTGATGAAGAGCAAACTTGAATCATTATATACAAGTTTAA  
GAGAACCTAGTACGAAGTGTCCCTCTGGGGAGCCAGGTGAGAGAAAAATCTAACTCT  
CCAAACCATGTTTATTCTATAGCATCAAGGGATCAAAATTTAAGGAGCTAGTTACACAT  
GGAGACGCTTCAACTGAGAAATGATGTTTAAACCAATCCTATCAGTGAAGAACTACAACT  
TTCCCTACAGGAGGCTTCAACCCGGAATAGGAAAGAAAAACACACGGAAGTACCCCA  
TTCTGGTCGATCAAAACCAACAAATGTTTCCATTGTTTTGCATGCAGAGGAACCTTATATT  
GAAATGAAGAGCCAGAGCCAGAGCCGGAGCCAGCTGCAAAACCAACTGAGGCACCAAGA  
ATGTTGCCAGTTGTTACTGAATCATCTACAAGTCCATATGTTACCTCATACAAGTCACCT  
GTCACCACTTTAGATAAGAGCACTGGCATTGAGATCTCTACAGAATCAGAAAGTGTTCCT  
CAGCTCTCAGGTGAAACTGCGATAGAAAAACCCGAAGGTTTGGAAGCAACCCAGAGAGT  
TGGAATATGATGACATTTTGAAGAAAAATTTAGATATTAAATCACAAGTGCAACAGGCA  
CTTCTTAGTGACACCAGCAACCCAGCATATAGAGAGATATTGAAGCCTCTAAAGATCAC  
CTAAACGAAGCCTTGCTCTAGCAGCAGCAGAGACATAAATTAAGAAACATGTATAAG  
TCCCACTTATTGCCAGTAGGACGAGCAAGTAATAAAATTGATGACATCGAACTGTTATT  
AACATGCTGTGTAATCTAGATCTAACTCTATGAATATTAGATATTAAATGTGTCCA  
CCAGAGATGAGAGAAAAAGCTGCTACAGTATTCAATACATTAATAAATATGTGTAGATCA  
AGGAGAGTACAGCCTTATTAAAGTTTATTAAACAATAATAAATTTTAAACCTAC  
TTGATATTCCATAACAAAGCTGATTTAAGCAACTGCATTTTTTACAGGAGAAATAATC  
ATATTGCTAATTTCAAAAGTTGTATAAAATATTTTCTATTGTAGTTCAATGTGCCAAC  
ATCTTTATGTGTCAATGTTTATGAACAAATTTCTATATGCATAAAAACCTAATTTTAAAT  
AAAAATTTGGTTCAGGAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 80

MKPLVLLVALLLWPSVVPAYPSITVTPEDEQNLNHYIQVLENLVRSVFSGEPGREKKNS  
PKHVYSIASKGSKFKELVTHGDASTENDVLTNPISZTTTFFJGGTFEIGKKKHTSTP  
FWSIKPNNVSIVLHAEFPYIENEPEPEPEPAKQTEAPMLPVVTSSSTSPYVTSYKSP  
VTTLDKSTGIEISTESEDVPQLSGETAIEKPEEPFGKHPEWMNDDILKILDINSQVQQA  
LLSDTSNPAFYREDIEASKDHLKRSALAAAAEHLKTMVKSQLLPVGRSTSNKIDDIETVI  
NMLCNSRSKLYEYLDIKCVPEMREKAATVFTLQWMCRRRTALKVY

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 81

TGCAGCTGTGGGGAGATTTCAGTGCATTGCCTCCCTGGGTGCTCTTCATCTTGGATTTC  
AAAGTTGAGAGCAGC  
ATGTTTGGCCACTGAAACTCATCTGCTGCCAGTGTACTGGATTATTCTTGGGSCCTG  
AATGACTTGAATGTTTCCCGCCTGAGCTAACAGTCCATGTGGGTGATTTCAGCTCTGATG  
GGATGTGTTTCCAGAGCACAGAGACAAATGTATATTCAAGATAGACTGGACTCTGTCA  
CCAGGAGAGCACGCCAGGACGAATATGTGCTATACTATTACTCCAACTCTCAGTGTGCCT  
ATTGGGCGCTTCCAGAACCCGCTACACTTGGATGGGGACATCTTATGCAATGATGGCTCT  
CTCTGCTCCAGATGTGCAAGAGGCTGACAGGGAACTATATCTGTGAAATCCGCTC  
AAAGGGAGAGCCAGGTGTTCAAGAGGCGGTGGTACTGCATGTCTTCCAGAGAGCCCC  
AAAGAGCTCATGTCCATGTGGGTGGATTGATTCAAGTGGGATGTGTTTTCCAGAGACACA  
GAAGTGAACACCTGACCAAGGTAGAATGGATATTTTCAGGACCGGCGCCAAAGAGAGAG  
ATTGTATTTCTGTTACTACACAACTCAGGATGTCTGTGGAGTACTCCAGAGCTGGGCG  
CACTTCCAGAATCGTGTGAACCTGTTGGGGACATTTTCCGCAATGACGGTTCATCATG  
CTTCAAGGAGTGAGGGAGTCAGATGGAGAACTACACCTCAGTATCCACCTAGGGAAC  
CTGCTGTTCAGAAAAACATTGTGCTGCATGTGACCCCGAAGAGCTCGAACACTGGTG  
ACCCCGGACGCCCTGAGGCCTCTGGTCTTGGGTGGTAA  
TCAGTTGGTGATCATTTGTGGGAATTGTCTGTGCCCCAATCCTGCTCCCTGTTCTGAT  
ATTGATCGTGAAGAAGACCTGTGGAAATAAGAGTTTCAGTGAATTTACAGTCTTGGTGAA  
GACACGAAGAAGACTAATCCAGAGATAAAGAAAAACCTGCCATTTTGAAGATGTGA  
AGGGGAGAAACACATTTTACTCCCAATAATTGTACGGGAGGTGATCGAGGAAGAAGAAC  
AGTGAATAATCAGAGGCCACTACATGACCATGACCCAGTTTGGCCTTCTCTGAGGTC  
AGATCGGAACAACCTCACTTGAATAAAGTCAGGTGGGGGAATGCCAAAAACACAGCAAGC  
CTTTGAGAGAAGATGGAGAGTCCCTTCATCTCAGCAGCGGTGGAGACTCTCTCTGTGTG  
TGTCTGGGCCACTCTACCAAGTGAATTCAGACTCCCGCTCTCCAGACTGTCTCTGTCT  
CATGTTTGGTCAATACATGAAGATGGAGAATTGGAGCCTGGCAGAGAGACTGGACAG  
CTTGGAGGAACAGGCCTGTGAGGGGAGGGGAGCATGGACTTGGCCTCTGGAGTGGGAC  
ACTGGCCCTGGGAACAGGCTGAGCTGAGTGGCTCAGACCCCGCTTGGATCAGACCT  
CTGTGGGCGAGGTTCTTAGTGGATGAGTTACTGGGAAGATCAGAGATAAAACCAACC  
CAAAATCAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 82

MFCPLKLLLPVLLDYSLGLNDLNVSPPELTVHVGDSSALMGCVFQSTEDKCIKIDWTL  
PGEHAKDEYVLYYNSLSPVIGRFQNRVHMGDILCNDGSLLLQDVQEDQGTICIRL  
KGESQVFKXAVVLHVLPEEPKELMVRVGLIQMGCVFQSTEVKHVTKVEWIFSGRRAKEE  
IVERYYHKLKMSVEVVSQSWGHFQNRVNLVGDIFRNDGSIIMLQGVRESGGNYTCSIHLGN  
LVFKKTIVLHVSPEEPRTLVTFAALRPVLVGGNQLVIIVGIVCATILLPVLILIVKKTC  
GNKSSVNSTVLVKNKKTNPEIKKPKCHFERCEGEKHIYSPIIVREVIEEESPSEKSEAT  
YMTMHPVWPSLRSDRNNSLEKKSGGGMPKTQAF

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 83

GTGGAAGGTTATAAAGCTTCCAGCCAAACGGCATTGAAGTTGAAGATACAACTGACAG  
CACAGCCTGAGATCTTGGGGATCCCTCAGCCTAACACCCACAGACGTGAGCTGGTGGATT  
CCCGCTGCATCAAGSCCTACCCACTGTCTCC  
ATGCTGGGCTCTCCCTGCTCTCTGTGGCTCCTGGCCGTGACCTTCTTGGTTCCACAGAGCT  
CAGCCCTTGGCCCTCAGAGCTTGAAGAAGAGGAGGAGATGAGACTGAGAGCGGCTGG  
CCGCTTTGCCGGCTTCCCTGCGACTAGGACCACTGCCGACACTGAGGTGCTCTGC  
AAGGAGCTACAGAGGCTCGGGCCGGCGCTGCTGCTGTGCCAGGACTCTCCAGCCCGCC  
CAGCCCGCCGACCCGCGCGCATGSGAGAGTGCAGATTGGGCGGAGAGGSCCGCGCA  
GTGCTCACTGGTGTGCCCCCTTCTCCCGGTCCTCACTACTGGCTGCTGCTTTGGGAC  
GGCAGCGAGGCTGCGCAGAGAGGGGCCCCGCTGAACGCTACGGTCCGCGAGAGCGAACTG  
AAGGGGCTGAAGCCAGGGGCGCTTTATGTGCTTTGCTAGTGGCCGCTAACGAGGCGGG  
GCAAGCCGCTGCCCGAGGCTGGAGGAGAGGGCTCGAGGGGCGGACATCCCTGCTTC  
GGGCTTGACCGCCCTTGGGTTGCCGCAACCCCGCACTCTGGTCCACGGGCGCTC  
GGGTTGGGACGGCCCTGGCCCTGCTAAGCTGTGCCGCCCTGGTGTGGCACTTCTGCTG  
CGGATCGCTGGGCTGCCCCGCGCGAGCGCGCGCGAGCGCGAGGGCGCTCTGAAG  
GGGCTGGGGGCTCTCGGGCACAGACAGCCCACTGGGGCGCTCAGCCTGGCCCCGG  
GAAAGAGGAAACCGCTGCTCCAGGGAGGGCTGSAAGGCGAGCTGGGAGCCAGCCCCA  
GGCTCCAGGGCCAGGGGAGTCTAGGTTCTCAGGACTGAGCGCTTGTAGGTCCGTA  
CTTGGCGCTTTGTTCTGCTGAGGTCTGGGAGGAATAGAAAGGGGCCCCAATTTT  
TTTTAAGCGGCAGATAATAATAATGTAACTTTGCGGTTAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 84

MLGSPCLLWLLAVTFLVPRAGPLAPQDFEEDDEADETETAWPPLPAVPCDYDHCRLQVPC  
KELQRVGPAACLCPLSSPAQPPDPPRMGEVRIAEEGRVAVVHWCAPFSEVLHVWLLWD  
GSEAAQKGPPLNATVRRRELKGLKPGIYVVCVVAANEAGASRVFQAGGEGLEGADIPAF  
GPCSRLAVPPNPTLVHAAVGVGTALALLSCAALVWHFCLDRWGCPRRRAARAAGAL



WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 85

CGACG  
**ATG**CTACGCGCGCCGCGCTGCCTCCTCCGSACTCCGTAGCGCCTGCGCGGCGCTGCGCT  
 GCGCGCTGCTCTCGTGGCTTGGCGCTGCTCTCTCTAGAGCCGAGGSAACCGGTGGCC  
 TCGTCCGCTCAGCCCTATTTCGGCACCAAGACTCGCTACGAGGATGTCAACCCCGTGTCTA  
 TTGTCCGGCCCCGAGGCTCCGTGGCGGGACCTCGAGCTGCTGGAGGGGACCTGCACCCCG  
 GTGACGCTGGCTGCTCTATTCCGCCAGCGACCCGCTACCCCAAGGTCAACAGATCCGC  
 AAGCTGAGGCACTGACCGGCTTGTGCGAGGCCCCGGGTCCAGGGATGGCGGGGCTAGT  
 AGTACCGCGAGCGCGACCTGGGTGCGAGCGTGGCCGACTGGCCCTTTTGTAGCGGGAC  
 TGGATGGACGGGAGCTAGTAGAGAAGGAGCGGCGAGATATGGACAGCTGGCGCTGCGCT  
 CTGGCCCTGCTCTTCCCGGCCCTTTTCAGCCGTGAGAACTACGCGCGCTGCGGCTCATC  
 ACCAGTCCCAAGCACCGCTGCTAGGATAGCAGCGCCGCTTCTGCGAGGGCTGTGGCAG  
 CACTACCAACCTGGCTTGGCGCGCGCGGACGTGCGAGATATGGAGTTTGGACCTCCAACA  
 GTTAATGATAAATAATGAGATTTTGTGATCACTGTGAGAGTTTAACTGAAGTAGAA  
 AAAAATGCTACAGCTCTTTATCACGTGGAAGCTTCAAAACTGGACCAAGATGAGAAAC  
 ATTTAAAAAAGTTGCAGCTACTTTGCAAGTGCCAGTAAATGATTTAAATGCAGATTTA  
 ATTTCAAGTAGCCTTTTCACTGTTTATTGACCTGGCAATTAAGGTGTAAATCTCCT  
 TGGTGTGATGTTTGTGATAGATGATGCAAGGTATTAGAAATTTAAATGATCTGAAA  
 CAATATTGGAAAAGAGATATGGGTATACATTTAAGCTGATCCAGCTGCACCTGTGTT  
 CAGGATATCTTTCAAGCTTGGACAAAGCAGTTGAACAGAAACAAAGGTCTCAGCCAAAT  
 TCTTCTCCAGTCATCTCCAGTTTGGTCATGCGAGACTCTTCTTCCACTGCTTCTCTC  
 ATGGGCTACTTCAAGACAAGGAAACCCCTAACAGCGTACAAATTAACAAAAACAAATGCAT  
 CGGAAGTTCCGAAGTGGTCTCATTTGTACCTTATGCTCGAAGCTGATATTGTGCTTTAC  
 CACTGTGAAAATGCTAAGACTCCTAAGAAACAAATCCGAGTGCAGATGTTATTAAATGAA  
 AAGGTGTACCTTTGGCTTACTCAAGAAACCTGTTTCAATTTATGAAGATCTGAAGAAC  
 CACTACAAGGACATCCTTCAGAGTTGTCAAACTGAGAGATGTAAGATTAGCAAGGGCT  
 AACAGTACATCTGATGAACATGAGTAACTGAAGAACATTTTAATCTTTAGGAATCTG  
 CAATGAGTGATTACATGCTTGTAAAGTAGGAGCAATTCCTTGATTACAGGAAGCTTTTAT  
 ATTACTTGAGTATTTCTGCTTTTACAGAAAAACATTTGGGTTTCTCTGGGTTTGGAC  
 ATGAATGTAAAGAAAGATTTTCACTGGAGCAGCTCTCTTAAGGAGAAACAAATCTATT  
 TAGAGAAACAGCTGGCCCTGCAATGTTTACAGAAATGAATTTCTTCTACTTATATAAG  
 AATCTCACACTGAGATAGAAATTTGTGATTTCAATAACACTTGAAGAGTGTGGAGTAA  
 CAAAATATCTCAGTTGGACCATCTTAACTTGATTGAACGTCTAGGAACCTTTACAGATT  
 GTTCTGCAGTTCTCTCTTCTTCTCAGGTAGGACAGCTCTAGCATTCTTTAATCAGG  
 AATATTGTGTAAGCTGGGAGTATCACTCTGGAAGAAAGTAACATCTCCAGATGAGAATT  
 TGAACAAGAAACAGAGTGTGTAAAAGGACACCTTCACTGAAGCAGTCCGGAAGTACA  
 ATGAATAATAATTTTTGGTATTATTTATGAATATTTGAACATTTTCAATAATTC  
 CTTTTATCTTAGGAAGTCTCAAGACCATCTAAATTTATATGTTTGGACAAATTA  
 GCAACAGTCAAGATAGTATGAATCGAAGTTTTCAAAATCCATGCTTAGCTAACTTTTTC  
 ATCTGTCACTTGGCTCGATTTTATATTTTCTATTATGAATGTATCTTTGGTT  
 GTTGAATTTTCTTCTTCTTTGTAAATAGTCTGAGTTCTGTAAATGCCGTGAAGT  
 ATTTGCTATAATAAGAAATTTCTGTGACTTTAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 86

MLRAPGCLLRTSVAPAAALAAALLSSLARCSLLEPRDPVASSLSPYFGTKTRYEDVNFVL  
LSGPBAPWRDPELLEGTCTFPVQLVALIRHGTRYPTVKQIRKLRLHGLLQARGSRDGGAS  
STGSRDLGAALADWPLWYADWMDGQLVEKGRQDMRQLRLASLFPALFSRENYGRLELI  
TSSKHRCDSSAAFLQGLWQHYHFGLPFPDVADEPFPPTVNDKLMRFFDHCEKPLTEVE  
KNATALYHVEAFKTFPEMQNILKKVAATLOVPVNDLNADLIQVAFPTCSFDLAIKGVKSP  
WCDVFDIDDAKVLEYLNDLKQYWKRGYGYTINSRSSCTLFQDIFQHLDKAVEQKQRSQPI  
SSPVILQFGHAETLLPILLSLMGYFKDKEPLTAYNYKKQMRKFRSGLIVPYASNLI FVLY  
HCENAKTPKEQFRVOMLLNEKVLPLAYSQETVSFYEDLKNHYKDILQSCQTSSECELARA  
NSTSDEL

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 87

[illegible]

WO 00/53758

PCT/US00/05841

CACCCCTCAGCGTTGGGGATTCAAGCTCCAGCCTCCTTCTTGGTTGTCATAGTGATAGGGT  
AGCCTTATTGCCCCCTCTTCTTATACCCCTAAAACCTTCTACACTAGTGCCATGGGAACCA  
GGTCTGAAAAAGTAGAGAGAGTGAAGTAGAGTCTGGGAAGTAGCTGCCATAACTGAG  
ACTAGACGGAAAAGGAATACTCGTGTATTTAAGATATGAATGTGACTCAAGACTCGAGG  
CCGATACGGAGCTGTGATTCTGCCCTTGGATGGATGTTGCTGTACACAGATGCTACAGAC  
TTGTACTAACACACCGTAATTTGGCATTGTGTTAACCTCATTTATAAAAGCTTCAAAAA  
ACCCA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 86

HALRRPPRLRLCARLPDFFLLLLFRGCLIGAVNLKSSNRTFVVQEFESVELSCIITDSQT  
SDPRLEWKKIQDEQTTTVFFDNKIQGDLAGRAEILGKISLKIWNVTRDSALYRCEVVAR  
NDRKELDEIVIELTVQVKPVTFCRVKAVPVGRMATHLCQESBEGHFRPHYSWYRNDVPL  
PTDSRANPRFRNSSPHLNSGTGLVFTAVHKDDSGQYYICLASNDAGSARCEEQEMEVIDL  
NIGGIQGVLVVLAVLALITLIGICCAIRRGYFINNKQDGESYKNFGKFDGVNIIRTEEG  
DFRHKSSTVI

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 89

CCCACGCGTCCGGACAACTGGAGGTGAAAGGAGCTGCTACTGTCCACTGTGCTGTCGGT  
GCTGAACCTGAGACGCGAGCGGACCACTTGCTCCAGCACCTGAAGGCAACGCCCTCTTGC  
ACCCCTCTGTGCCCTTGGGAGCCGCTTCACCAACAGGACCCATATCAACTTGCACAAAGGA  
GTGTGTATCGGACGTGGGAGAGTCCCTCTGTTTGGCACCTGGCGCTCATTGAGGGGT  
GACTTTGGAGATTTCTATAGTTTGTAGCCAACTATTTTTTTCCCGCTAAGACGAT  
CTTTGGAGAGTTTTTTTTTATTTGCTGATTTATATTTCCACGCGTTTAGGAATCTTCT  
GGGGGACTTTTGTACTGTTAAATAGGTCAAAGCAATAAGG  
**ATG**TTTAAGTGCTGCTCACTTGTCTTGGTTCTCGGATTCATTTTCTGGAGTCGGAAGGA  
AGGCCAACCAAGARGAGGATATGGCCTTAAATCCTATCAGCCTCTAATGAGATTGCGA  
CATAGCAGGAATAAATCAAGAACTTCAAGAGTCAAAGGATTATGATTCAGGATGGC  
CCTTTTGGATCTTGTGAAATAGTACTGTGGTTGGGAGACACTGTGTTACGAGCAGA  
GAGACAGGGCAAGCAGAATGTGCTGTATGSACTTTGCAACGTCACCTACAAACCTGTG  
TGTGGATCTGACGGAGAATCTATGAAACCCAGTGTGAAGTGCACAGAGCTCTTGCCTG  
AAAAACAAAGATTACCATTTGTTCAAAATGAAGACTGCTCTTTAAAGGAGATAAGTGC  
AAGACTACTGAATACAGCAAGATGAAAAATATGCTATTAGATTTACAAATCAAAATAT  
ATTATGCAAGAAATGAAATCCTAATGGCGAGACATATCTCGGAAGAAGCTATTGGTG  
GATCAAAATGTTAAATATTTTGTATGACAGCACTAATGGAATCTGTAGATATTAATGAAC  
ACTCAGGTGATAAAACAGGAAGAATCTGGCAAGGATCTCTTGTATGACTTTGTATGTT  
CTATTGAAATATGATGATTTTAAATGCTGACAGCACTGGCTCTTGAAGATTTTATAGA  
GCATTCCAAGTGATCCAGTTGAGTCTGCCAGAGATCAGAACTAAGCATCACTGCAGCA  
ACTGTGGGACAAAGTGCTGTTCTGAGCTGTGCCATTCAGGAACCTGAGACCTCCCAT  
ATCTGGAAGGAACAATATTATTCTAAATAATTTAGATTTGGAAGACATCAATGACTTT  
GGAGATGATGGGTCTTGTATATTACTAAGGTTACCACTCACTGCTGGCAATTACACC  
TGCTATGCAGATGGCTATGAACAAGTCTATCAGACTCACAATCTTCCAAAGTGAATGTTCT  
CCAGTCATCC

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 90

MFKCWSVVLVLGFIFLESEGRPTKEGGYGLKSYQFLMRLRHKQEKQESSRVKGFMIQDG  
PFGSCENKYCGLGRHCVTSRETGQABECACMDLCKRHYKPVCGSDGEFYEENHCEVHRAACL  
KKQKITTVHNEDCFFKGDCKTTEYSKMKMMLLDLQNKQYIMQENENPNNGDDISRKKLLV  
DQMPKYFDADSNGLVDINELTQVIKQBELGKDLFDCTLYVLLKYDDFNADKHLALEEFYR  
AFQVIQLSLPEDQKLSITAATVGQSAVLSCAIQGTLRPPIIWKRRNIIILNLDLEDINDP  
GDDGSLYITKVTTTHVGNVTCYADGYEQVYQTHIFOVNVPPVI...

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 91

GCAGCGAGCGCGGGTGCAGCCCTGCGCGCGCAGGGATGTGACCTTACCGTCGCTTAGC  
CAGGATGACCGGAGCCCGTGTCTGCGGGGTCCGCGCTTCGCTTCAGCCTCCCGGGTGCT  
CTGACCGCACGCTCCCGGCTGTAGGGCTCCCGGCACCGGCTCGCC  
ATGCGCGCACCGCGCGCGCGCGCGCTGGCACTGCGCTTCTGCTGCTCCTGCTG  
GCTTCCGAGTCTTCTCACTGTGCTGTTGCGGGCGGTGAGCGCGCCAGTTCTGCGCG  
CCGAGCGAGCGCGC  
GCCTACCAAGTCTTCGAGGAGGCCAAGCAGGGCCACCTGGAACTGGAGTGCCTGGAGGAG  
GTGTGCAGCAAGAGGAGGCCAGAGAGTGTTCGAGAACGACCCCGAGACGGAGTATTTT  
TATCCACGATATCAAGAGTGCATGAGAAAAATATGGCAGGCTGAGAGAAAAAACCCAGAT  
TTCGCCAAATGTGTTCAAGACTTGCCTGACAGTGCACCCCAAACCTTGTGATAAGAG  
GGTACTCATATCTGCCAAGACTCATGGGCACTTCTTCTGCGTGTGCACAGATGGCTGG  
GGAGGCGGGCTCTGTGACAAAGATGTCAATGAGTGTTCAGAGAAATGGGGGCTGCAGC  
CAGGCTCTGCCCAACAACCCAGGAAGCTTCCAATGTGCTGCCATAGTGGCTTCTGCTT  
GCATCAGACGCGCAGACCTGCCAAGATATCGATGAATGCACAGACTCAGACACCTGTGGG  
GACGCGGATGCAAGAACTTGCAGGCTCTTACTCTTGCCTCTGCGATGAGGGATATACA  
TACAGCTCCAGGAGAAAGACTGCCAAGATGTGGACGAGTGCAGCAGGATCGCTGTAG  
CAGACCTGTGTCAACTCCCGAGGAGCTATACCTGCCACTGTATGGGCGAGGGGCGCTA  
AAACTATCCCGCAGACATGGATCTTGTGAGGACCTTACCATGTGTGCGCTTCAGCATG  
GCCAAGAGCGTGAAGTCTTGTACTTGGGCGCATGTTCAAGCGGACCCCGGTATTAGA  
CTACGCTTCAAGAGGCTTCAGCCTACAGGCTGCTGGCTGAATTTGACTTCCGCACTTT  
GACCTGAAGGAGTCTCTTCTTCTGCTGGAGGCGCTTCAAGCAGCAGCTGGATTGTCTG  
GGCTAAGAGCTGGGCGGCTTGTGCTGAGCTTCGGTCAATGGCGTGGGCGCATCAC  
AGCAGCGGGCCAACTCAACCAAGCATGTGGCAAACTATCTCCGTGGAGAGCTGGAA  
CGTAACCTTGTCTCAAGGTCACAAAGATGTCTGAATGAAGATCGCGTAGCTGGGGAG  
CTGTTTCAGCTGGAGAGGGGCTCTATCACTGAATCTCACCTGGGCGGCTTCCCTTC  
AAGGAGAGTGAAGCTCTGTCAGCGGATTAACCTTCGCTGGATGGTGCATGAGGAGTTGG  
AAGTGGCTGAAGCGGGAAGACAGCGCCATCCAGGAGACAGTCAAGGCAACACAAAAATG  
CAGTGTCTCTCTGTGACAGAAAGGGCTCTCTTCTTCCCGGGGAATGGAATTTGCTACCTAC  
AGGCTCACTCACTACCGCAACCTGCTGGATGTGCGCACGGAAACCACTGGGAAGTTAAA  
CTTGTGCTCGGATCCGCGCTGCGCAGGACAGGGGCTGCTGCTGGGCTGTGCGGAGAC  
GACGATGCTGCTCTCTGTGGGCTAGTGCATACCACTCTACAGAGAGCTCAAGAG  
CAGTTGGTGTCTGCGCAGTTGAGGATGTGCGCTGGCACTGATGGAATCAAGGTGTGC  
GACAGCAGGAACACACGCTCACTGTCTCTGCGGGAGGTTGAGGCCACCTAGAAATG  
GATGGCAAAAGGCGCAGAGTGAATGAGCACTGCCAGCTGCAAGGAGCACTGACACA  
CTTAAGACACATCTGCAAGGCTCTGTGCACACTATGTTGGAGGCTGCGAGAGTATCG  
GTGATTTCTGCACCGCTCACTGCGTTTACCGCGGATGATGACTCTGGAGGTAACCGG  
AAATCTTGGACCTGGATACGCGCTCGTCAAGACACAGTACACTCACTCCCACTCCTGC  
CGCCTGTGGAGCATGCCACCCCTAGACCGAGCTGCAAGAGGGCTCCACACTAAAGAC  
AAAAATGAAGCAGGGTTGGACACACAGCACTGGCTCTCTCGCATGGTCTGCAACACT  
GGAGCAGCGTGGACCGGCTTGTGTTTTTTTTTCTTGAATCTTCTTTTGGCTTGT  
ACATATCTGTACATAATGAGCGGGTGTGGGTACCGGCTGCTCAGAGAGGCCAGTGA  
CCTGGTGGGAGCTGGCTGGAGGGGCTGGGTAGAGGGGCTGGCAGTTTGACAGAAAG  
GATGTGAAGAAAAATTTCTTATTATTTTATTACTACATGCTTCTTCTGACTCTAAA  
ATATGGAAAAATAAATATTTACAGAAACCTTTTAAAAAATAAATAAATAA



WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 92

MPPPPCPAAALGTALLLLLLLASESSHTVLLRAREAAQFLRPQRORRAYQVFEEAKQCHLE  
RECVEVCSKEEARVVFENDPETEYFYPRYQBCMRKYGRPEEKNDPAKCVQNLPPQCT  
PNPCDKKGTTHICQDLGNFPCVCTDGGGRLCDKDVNECVQKNGGCSQVCHNKPGSFQC  
ACHSGFSLASDQQTQDDIDECTSDSDTCGDARCKNLPGSYCLCDEGYTYSKKEKTCQDV  
DECCQDRCEQTCVNSPGSYTCHCDGRGGLKLSFDMDTCEDILPCVPFMSAKSVKSLYLG  
RMFSGTVPVIRLRKRLQPTRLLAEFDPRTPDPPEGVLPFAGGRSDSTWIVLGLRAGLEL  
QLRYNGVGRITSSGPTINHGMWQTI SVEELERNLVKVNKDAVMKIAVAGELPOLERGL  
YHNLTVGGIPFKESELVQPINRDLGCMRSWNMLNGEDSAIQETVKANTKMOCFSVTE  
RGSFFPGNGFATYRLNVTRTSLDVGTETTWEVKVVARIRPATDTGVLLALVGDDDVVIS  
VALVDYHSTKKLKKQLVVLAVEDVALALMEIKVCDGQEHVTVSLREGEATLEVNGTKG  
QSEVSTAQLQERLDTLKTHLQSSVHTYVGGLEPVSVISAPVTAFYRGCMTELVNGKILD  
LDTASYKHSDITSHSCPPVEHATP

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 93

AGTCGACTGCGTCCCTCTACCCGGGCGCAGCTGTGTCTCTGACCCCGAATAAATCAAGG  
GCTGCACCGGGCTTGGCAGCGCTCCGCAACATTTCCTGTGCGGCTTAGGGAATCTGT  
TGGCCGCTGGGCCCCGGGGGGATTCTTGGCAGTTGGGGGCTCCGTCCGGAGCGAGGGCG  
GAGGGGAAGGAGGGGGAACCGGTTGGGGAAGCCAGCTGTAGAGGGCGGTACCCTGCT  
CCAGACACAGCTCTGCGTCTCGAGCGGACAGATCCAAGTTGGGAGCAGCTCTGCTGTC  
GGGGCTCAGAGA  
ATGAGGCGGGCTTGGCCCTGTGCCTCTCTGSCAGGCGCTCTGSCCGGGCGGGGCGGG  
GGGACACCCCACTGCGACCGTGTGCTGCTCGGCTCGGGGCTGCTACAGCCTG  
CACCACCTACCATGAAGCGGCGGCGGAGGAGCTGCATCCTGCGAGGTGGGGCG  
CTCAGCACCGTGTGCGGGCGCGGAGCTGCGCGCTGTGCTCGCGCTCCTGCGGGCAGGC  
CCAGGGCCCCGAGGGGGCTCCAAGACCTGCTGTCTGGGTGCGACTGGAGCGCAGGCGT  
TCCACTGCAACCTGGAGAACGAGCCTTTGGGGGTTTCTCTGGCTGTCTCCGACCCG  
GGCGGTCTGAAAGCGACACGCTGCACTGGGTGGAGAGCCCCAACGCTCCTGACCGCG  
CGGAGATGCGCGTACTCCAGGCCACCGTGGGTGCGAGCCCGAGGCTGGAAGGAGATG  
CGATGCCACCTGCGCGCAACGGCTACCTGTGCAAGTACCAAGTTGAGGTCTTGTGTCT  
GCGCGCGCCCCGGGGCGGCTCTAACTTGAGCTATCGCGCGCCCTTCCAGCTGCACAGC  
GCCGCTCTGAGTTCACTCCACTGGGACCGAGGTGAGTGCCTCTGCCGGGACAGCTC  
CCGATCTCAGTTACTGTATCGCGGACGAAATCGGCGCTCGCTGGGACAACTCTCGGGC  
GATGTGTGTCTCTGCCCGGGAGGTACTCCGTGCTGGCAATGCGCAGAGCTCCCT  
AATGCTAGACGACTTGGGAGGCTTTGCTGCGAATGTGTACGGGCTTGGAGCTGGGG  
AAGGACGGCGCTCTTGTGTGACCACTGGGGAAGGACAGCCGACCTTGGGGGACCGGG  
GTGCCACACAGGCGCCCGCGGCACTGCAACAGCCCGTGGCGCAGAGACATGGCCA  
ATCAGGGTCGACGAGAAGCTGGGAGAGACACCACTTGTCTTGAACAGACAAATTCAGTA  
ACATCTATTCTGAGATTCTCGATGGGATCAGAGACAGATGTCTACCTTCAAATG  
TCCCTCAAGCCGAGTCAAAGGCCACTATCACCCATCAGGGAGCGTATTCCAAGTTT  
AATTCTACGACTTCTCTGCCACTCTCAGGCTTTCGACTCTCTCTGCGGTGTCTTC  
ATATTGTGAGCACAGCAGTAGTAGTGTGTGTGATCTTGACATGACAGTACTGGGGCTT  
GTCAAGCTCTGCTTTCAGGAAAGCCCTCTTCCAGCCAAGGAAGGAGTCTATGGGCCG  
CCGGCTGGAGAGTGATCCTGAGCCCGCTGCTTGGGCTCCAGTTCTGCACATTGCACA  
AACATGGGGTGAAGTCGGGACTGTGATCTCGGGACAGAGCAGAGGTGCTTGTCTG  
GCGAGTCCCTCTTGGCTCTAGTGTGCTTGGGAAACAGGGGACATGGGCACTCCTGT  
GAACAGTTTTCACCTTTTGTATGAACGGGGACCAAGAGGA  
CTTACTTGTGTAACTGACAAATTTCTGCAAAATCCCTTCTCTAAATCCCTTTTACTC  
CACTGAGGAGTAAATCAGAACTGCACACTCTCCCTGATGATAGAGGAAGTGAAGTG  
CCTTTAGGATGTGATACCTGGGGACCGGGTAGTGTCTGGGAGAGATATTTCTATCTT  
TATTCGAGAAATTGGAGAGTGAATTGAACCTTTCAAGACATTTGAAACAAATAGAACAC  
AATATAATTACATTAAAAATAATTTCTACCAAAATGGAAGGAATGTTCTATGTTGT  
TCAGGCTAGGAGTATATTGTTTCGAAATCCAGGGAAAAAATAAAATAAAAAATTAAG  
GGATTGTTGAT

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 94

MRPAFALCLLWQALWPGGGGEHPTADRAGCSASGACYSLHHATMKRQAREEACILRGA  
LSTVRAGAELEAVLALLRACPCPGGGKDLLFWALERRRSHCTLENEPLRGFSWLSDDP  
GGLESDTLQWVEBFQSCRTARRCAVLQATGGVEPAGWKEMRCHLRANGYLCKYQFEVLCP  
APRPGAASNLGYRAPFQLHSAALDFSPPGTVEVSALCRGQLPISVTCIADEIGARWDKLSG  
DVLCPGPGRYLRAGKCAELFNCLDDLGGFACECATGFELGKDGSCVTSSEGSQPTLGQTG  
VPTRPPATATSPVPORWTWIRYDEKLGETFLVPEQDNSVTISIPEIPRWGSQSTMSTLGM  
SLQAESKATITPSGSVISKFNSTTSSATPOAFDSSSAVVFI FVSTAVVVLVILTMVLGL  
VKLCFHESPSSQPRKESWGPPOLESDEPAALGSSSAHCTNNGVKVGDCLDRDREGALL  
AESPLGSSDA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 95

GACTAGTTCTCTTGGAGTCTGGGAGGAGGAAAGCGGAGCCGGCAGGGAGCGAACCAGGAC  
TGGGGTACCGCAGCCCAAGGGGGGCTGCTGGCCGGGGAGAGCCCGGGGGCTGGAGCACCA  
CCAACTGGAGGGTCCCGAGTAGCGAGCCCGGAGGAGGGCCATCGGGAGCCCGGAGGG  
GGGACTGGCGAGGAGCCCGGCTCCGGGCTCCCGTCCCGCT  
ATGAGGCCACTCTCTGCTCTGCTCTCTGGGCTGGGCGGCTCGCCCCACTGGAC  
GACAAAGATCCCGAGCTCTGCCGGGGACCCCGGCTTCCAGGACCGCCGGCCAC  
CATGGCAGCAGGGCTTTCGGGGCCGAGTGGCCCGGAGCCCGGAGCCCGCCCGG  
GCTCCGGGAGAGAAAGCCGAGGGCGGGAGGCCGGAATGCGGGACCTCGAGGGAGCCCG  
GGCCCGGAGAGAGCGCGGACCCCGGGGGCCACCGGCTGCGGGGAGTCTCGGTG  
CCTCCGCGATCCGCTTCCAGCGCCAGCGCTCCGAGAGCCGGGTGCTCCGCGTCTGAC  
GCACCTTGGCCTTCGACCGGCTGCTGGTGAACGAGCAGGGACATTACGACCGCTCAC  
GGCAAGTTACCTGCGAGGTGCTGGGGTCTACTTTCGCGCTCATGCGCCGCTAC  
CGGGCCAGCTGCAGTTTGTCTGGTGAAGAAATGGCGAATCCATTGCTCTTTCTCCAG  
TTTTTCGGGGGTGGCCCAAGCCAGCTCGCTCTCGGGGGGGCCATGGTGGGCTGGAG  
CCTGAGGACCAAGTGTGGGTGCGAGTGGGTGGGTGACTACATTGGCATCTATGCCAGC  
ATCAGACAGACAGCACCTTCTCCGATTCTGGTGTACTCCGACTGGCACAGCTCCCA  
GTCTTTGCTTAGTGCCACTGCAAGTGAGCTCATGCTCTCACTCTAGAGGAGGGTGT  
GAGGTGACAAACAGGTCTATCCAGGAGGGCTGGCCCCCTGGAATATTGTGAATGACTAG  
GGAGGTGGGTAGAGCACTCTCGCTCTGCTGGCAGGAATGGGAACAGTGGCTGTC  
TGCGATCAGGTCTGGCAGCATGGGGCAGTGGTGGATTCTGCCAAGACAGAGGAGTG  
TGCTGTGCTGGCAAGTGAAGTCCCCAGTTGCTCTGGTCCAGGAGCCACCGTGGGGTG  
CTCTCTCTCTGGTCTCTGCTTCTCTGGATCTCCCAACCCCTCTGCTCTGGGGCG  
GCCCTTTCTCAGAGATCACTCAATAAACCTAAGAACCTCATAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 96

MRPLLVLILLGLANGSPFLDDNKIPSLCPGHPGLPOTPGHHGSQGLPGRDGRDRDGPAG  
APGEKGGGRPLPGPRGDPGPRGEAGPAGTGPAGECSVPPRSAFSAKRSESRVPPPSD  
APLPFDRVLVNEQGHYDAVTGKFTCCQVPGVYFAVHATVYRASLQFDLVKNGESIASFFQ  
FFGGWPKPASLGGAMVRLEPEDQVWVQVGVDYIGIYASIKTDSTFSGFLVYSDWHSSP  
VFA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 97

TG  
CCCCCTGCTGCTGCTGCCCTGCTGTGGGGGGGTCCCTGCAGGAGAAGCCAGTGTACGAG  
CTGCAAGTGCAGAAGTCGGTGACGGTGCAGGAGGGCCTGTGCGTCCCTTGTGCCCTGCTCC  
TTCTCTTACCCCTGGAGATCCTGGTATTCTCTCCCCCACTCTACGTCTACTGGTTCCGG  
GACGGGGAGATCCCATACTACGCTGAGGTTGTGGCCCAAAACACCCAGACAGAAGAGTG  
AAGCCAGAGACCCAGGGCCGATTCCGCCCTCTTGGGGATGTCCAGAAGAAGAACTGCTCC  
CTGAGCATCGGAGATGCCAGATTGGAGGACACGGGAAGCTATTTCTTCCGCTGGAGAGA  
GGAAGGGATGTAAATATAGCTACCAACAGAAATAAGCTGAACCTTGGAGGTGACAGCCCTG  
ATAGAGAAACCCGACATCCACTTTCTGGAGCCTCTGGAGTCCGGCCGCCCCACAGGCTG  
AGCTGCAGCCTTCCAGGATCCTGTGAAGCGGACACCTCTCACATTCTCCTGGAGCGGG  
AATGCTCTAGCCCCCTGGACCTGAGACACCCGCTCCTCGGAGCTCACCTCACCCCC  
AGGCCGAGGACCATGGCACCAACTCTACCTGTCAAGGTGAAGGCCAAGGAGCTCAGGTG  
ACCAAGGAGAACTGTCCAGCTCAATGTCTCTATGCTCCACAGAACCTCGCCATCAGC  
ATCTTCTCAGAAATGGCAGGCAAGCCCTGGGATCCTGAGCAATGGCAATGTGGTG  
CCCATTCAGGAGGGCCAGTCCCTGTTCTCGCTGCACAGTTGACAGCAACCCCTGCCC  
TCACTGAGCTGTTCCGGGAGGAAAGCCCTCAATCCTTCCAGACCTCAATGTCTGGG  
ACCTGGAGCTGCTCAACATAGGAGCTAGAGAGGGAGGGAAATTCACCTGCGGGTTGAG  
CATCCGCTGGGCTCCAGCACCTGTCTTCACTTTCTGTGCAGAGAGCTCCTCTTCC  
TGCAATGTGTAACTGAGAAACAGCAGGTTCTCTGGCCCTCGTCTCACCTGATCAGG  
GGGCTCTCATGGGGCTGGCTTCTCTCACCTATGGCCTCACCTGGATCTACTATACC  
AGGTGTGGAGGCCCCAGAGAGCAGGCTGAGAGGCTGGCTGAGGCCCTCCCGCTCAA  
GACAGAAATTGAGGTGTGGACACTAGCCCTGTGGGACACATGACGACATCACTGTGAGC  
TTCTTCTGGAAGCTCACATCCCACTGACTACCCCTCTTTTCTCTGCCCCATACCCC  
TTCTACTTATTCCCTCTGCTTGTGAGTCTTGGCCCANCAACACCTGCATCCCCATCTGCA  
NCCCATCCCTCTCCANCTGCCCTTCTCTTCCCTCTCCATCCANCATCTCCAGCCCTGTG  
AAGGGAATGTACTTTCGGTCTATACCCCAATTACCATACCAAAAGTTACCTTTTTTTT  
TTTTT

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 98

PLLLPLLMGSSLQEKFYELQVQKSVTVQEGLCVLVPCSFSPWRSWYSSPPLYVYVFR  
DGEIPYYAEVAVATNNEDRRVKPETQGRFLLGQVQKNCSLSIGDARMEDTGSYFFRVER  
GRDVKYSIQNKLNLEVIALLIEKPDHFLFLESGRPTRLSCSLPGSCEAGPPLTFSWTG  
NALSPLDPEITRSSLTLTPRPEDHGINLTCCQVKKQGAQVTTERTVQLNVSYAPQNLAIS  
IFRNGTCTALRILSNKMSVPFQEGQSLFLACTVDSNPPASLSWFRBGRKALNFSQTSMSG  
TLELPHIGAREGGGFTCRVQHFLGSQHLSFLELVQRSSSSCICVTEKQGSWFLVLTILIR  
GALMGAGFLTYGLTWIYITRCGGPQQSRAERPG

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 99

TTCTGTGACCCCTTGAGAAAAGAGTTGGTGGTAAATGTGCCACGCTCTTCTAAGAAGGGGGAG  
TCCTGAACCTTGTCTGAAGCCCTTGTCCGTAAAGCCTTGAACTACGTTCTTAAATCTATGAA  
GTCCGAGGGACCTTTGGCTGCTTTTGTAGGGACCTTCTTTCCTTGCTTCAGCAAC  
ATGAGGCTTTTCTTGAGAAAGCGGCTTGACTCTGTTCGTCACCTCTTTGATTGGGGCT  
TTGATCCCTGAACCAGAAAGTGAATTTGAAGTTCTCCAGAAAGCCATTCACTGCGCATCGC  
AAGACCAAGAGAGGGGATTGTATGTTTGGTCCACTATGAAGGCTACTTAGAAAAGGACGGC  
TCCTTATTTCACTCCACTCACAAACATAACAAATGGTCAGCCCATTTGGTTTACCTTGGGC  
ATCCTTGAGGGCTCTCTCTCTGCTCTGGGCTATGGAAAAGAGGAAAAGGTAAATTTCCC  
CCAGAAAGTCACTGATATTTAATATGATCTCTGGAGATTTCGAAAAGGACCAAGATCC  
CATGAATCATTCCAGAAATGGATCTTAATGATGACTGGAAACTCTCTAAGATGAGGTT  
AAAGCATATTTAAGAAAGGAGTTTGA AAAACATGGTCCGGTGTGAATGAAGTCATCAT  
GATGCTTTGGTGGAGGATATTTTGTATAAAGAGATGAGACAAAGATGGGTTTATATCT  
GCCAGAAATTTACATATAAACACGATGAGTTAAGAGATACATCTACCTTTTATATATA  
GCCTCATCTTCAAGAGAGGGCAGTCATCTTTAAGAACATTTTATTTTATACATGAT  
TCTTTCTTGCTTTGTTTTTTATTTTATATATTTTTTCTGACTCCTATTTAAGAACCCC  
TTAGGTTTCTAAGTACCCATTCTTTCTGATAAGTTATTTGGGAAGAAAAGCTAATTTGGT  
CTTTGAATAGAAGCTTCTGGACAAATTTTCACTTTCAAGATATGAAGCTTTGTTTAC  
TTTCTCACTATAAATTTAAATGTGCAACTGGGAATATACCAAGCATGAGACAGGT  
TATAGCACAAATAGCACCTATATTTCTGCTTCCCTCTATTTTCTCCAAGTTAGAGGTC  
AACATTTGAAAGGCTTTTGCAATAGCCCAAGGCTTGCTATTTTCTATGTTATAAGAAAT  
AGTTTATGTGTAAGTGGCTCTGAGTCTGCTTGAGGACCAAGAGGAAAATGGTTGTTGGA  
CCTGACTTGTTAATGGCTACTGCTTTACTAAGGAGATGTGCAATGCTGAAGTTAGAAACA  
AGGTTAATAGCCAGGCTGGT  
GGCTCATGCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCGGGCGGATCACTGAGGTTG  
GGAGTTCCAGAGACCGCTGACCAACACGGAGAAACCTATCTCTACTAAAAATACAAAGT  
AGCCCGGCTGGTGATGCTGCTGTATCCAGCTACCCAGGAAAGGCTGAGGCGGAGAG  
ATCACTTGAAACCGAGGCGAGGTTGCGGTAAGCCGAGATCACTTNCAGCTGGACACTC  
TGCTCGAAAAAGAAAAGAACCGGTTAATACCATATNAATATGATGCTGAGACAT  
GCTACCTAGGACTTAAGCTGATGAAGCTTGGCTCCTAGTATTGGTGGCTATTATGATA  
AATAGGACAAATCATTTATGTGAGGTTTCTTTGTATAAAATGTATCAATATGTTATAG  
ATGAGGTAGAAAGTTATATTTATATCAATATTTACTTCTTAAGGCTAGCGGAATATCCT  
TCTGGTTCTTTAATGGGTGCTATAGTATATTTACTACAAATAACATTGTATCATAG  
ATAAGGTAGTAAACAGTCTACATTTTCCCAITTTCTGTCTCATCAAAAACCTGAAGTTAGC  
TGGTGTGGTGGCTCATGCTGTAATCCAGCACTTTGGGGGCCAAGGAGGGTGGATCAC  
TTGAGATCAGGAGTTCAAGACCAAGCTGGCCCAACATGTTGAACCTTTGTCTCTACTAAAA  
ATACAAAAATTAGCCAGGCTTGGTGGTGCACACTGTAGTCCAGCTACTCGGGAGGGCTG  
AGACAGGAGATTTGCTTGAAACCGGGAGGCGGAGGTTGCACTGAGCCAGATTGTGCCAC  
TGCACTCCAGCTGGGTGACAGAGCAAGCTCCATCTCAAAAAAAGAGAGAGAGAGAGAG  
CCTACAGCAGCTACTATTGAATAAATACCTATCCTGGATTTT



WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 100

MRFLMNAVLTLFVTSLIGALIPPEVKIEVLQKFFIHRKTKGGDLMLVHYEGYLEKDG  
SLFHSTHKHNNQPIWFTLGILEALKGWDQGLKGMCVGEKKLIIPPALGYGEGKGKIP  
PESTLI FNIDLLEIRNGPRSHESFQEMDLNDDWKLSKDEVKAYLKKEFEKHGAVVNESHH  
DALVEDIFDKEDDKDGFISAREPTYKHDEL

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 101

GAATTCGGGGCCCCAGGATGCCAACTTTGAATAGG  
ATGAAGACTAC  
AACTTGTTCCTTCTCATCTGCATCTCCCTGCTCCAGCTGATGGTCCAGTGAATACTGA  
TGAGACCATAGAGATTATCGTGGAGAATAAGGTCAGGGAACTTCTTGCCAATCCAGCTAA  
CTATCCCTCCACTGTAAACGAAGACTCTCTCTTGCACTAGTGTCAAGACTATGAACAGATG  
GGCTTCCTGCCCTGCTGGGATGACTGCTACTGGGTGTGCTTGTGGCTTTGCCTGTGGATC  
TTGGGAGATCCAGAGTGGAGATACTTGCACCTGCCCTGTGCTTACTCGTTGACTGGACCAC  
TGCCCGCTGCTGGCAACTGTCCCTAAGAATGAAGAGGTGGAGAACCAGCTTTGATATGAT  
CAATCTAACAAAACTGCAGTCTCAATTTGGAAATCTGACTCATGTGCCTTTAAATGTGT  
TCATATTGCCCAATTACCTGCTTCTTGAAATGCTTCTTGAAAAATAAGACAAATTTGC  
ATGTG

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 102

MKTTTCSLLICISLLQLMVPVNTDETIRIIVENKVKELLANPANYFSTVTKTSLCTSVK  
TMNRWASCPAGMTATGCACCFACGSWEIQSGDTCNCLLLVDWTTARCCQLS

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 103

GCCAGGGGAAGAGGGTGATCCGACCCGGGGAAGTCCGCTGGGCAGGGCGAGTTGGGAAAG  
CGGCAGCCCCCGCGCCCGCCGAGCCCTTCTCCTCCTTTCTCCACGTCCTATCTGCCT  
CTCGCTGGAGGCCAGGCGGTGCGCATCGAAGACAGGAGGAAGTGGAGCCTCATTGGCCG  
GCCCCGGGCGCGGCTCTGGGCTTAAATAGGAGCTCCGGGCTCTGGCTGGGACCCGACCG  
CTGCCGGCCCGCTCCCGCTGCTCCTGCCGGGTG  
**ATG**GAAGACCCGAGCCCGCCGCGCCCTGGGCAAGGCCCTCTGCGCTCTCCTCCTGGCC  
ACTCTCGGCGCCCGCGCCGAGCCTCTTGGGGGAGAGTCCATCTGTTCGCGCAGAGCCCGG  
GCAAAATACAGCATCACCTTCACGGGCAAGTGGAGCCAGAGCGCCTTCCCCAAGCAGTAC  
CCCCGTTCGCGCCCGCTGGCGAGTGGTCTTCCGCTGCTGGGGGCGCGCATAGCTCCGAC  
TACAGCATGTGGAGGAAGAACCAGTACGTACGTAAACGGGCTGCGCGAGCTTTCGGAGCGC  
GGCAGGCTCTGGGCGCTGATGAAGGATCGAGGGCGCGGGGAGAGCGCTGCGAGAGCTG  
CAGAGGTGTGTTTCGGCGCCCGCTCCCGAGCGGCAACCGGCGAGAGCTCGCGGAGCTG  
GAGGTGCGAGGCGAGGCACTCGCTGGTCTGTTTGTGGTGGCATGCTGCCGAGCCCGAC  
TGGTTCTGGGGCTGGACAGCCTGGACCTGTGGACCGGGACCGCTTCCCTCTCCAGCCAC  
CGGCTGAGCCTGTACCCCTACGACGCGGGACGGACGGAGATAACGCTCTCCTCTCCAGCCAC  
CCGCGCAATCCTCTTACTACCGCGGGCTGAAGGCCCTGCCTCCCATCGCAGGGTGACA  
CTGCTCGGCTGGACAGAGCCCGAGGCTTCTATCCTCCCGCCAGTCTGCGCCAGC  
AGGACCAATGAGATTGTAGACAGCGCTCAGTTCCAGAAACGCGCTGGACTGCGAGGTC  
TCCCTGTGGTCTCTCTGGGGACTGTGCGGAGGCCACTGTGGGAGGCTCGGGACCAAGAGC  
AGGACTCGCTACGTCCGGGTCCAGCCCGCAACCAACGGGAGCCCTGCGCGAGCTCGAA  
GAAGAGGCTGAGTGGTCCCTGATAACTGCTCT**TAAG**ACAGAGCCCGCGAGCCCTGGG  
GCCCCCGGAGCCATGGGTGTGGGGGCTCCTGTGCGAGGCTCATGCTGCGAGGCGCGA  
GGGACAGGGGGTTTCGGGCTGCTCCTGACCGGGTGAGGCCGCGCGACCATCTCTGCA  
CTGAAGGGCCCTCTGGTGGCGGCACTGGGCAATGGGAAACAGCCTCTCCTTTCCCAACC  
TTGCTTCTTAGGGGCCCCGCTGCTCCGCTGCTCTCAGCCTCCTCCTCTGCGAGATAAA  
GTATCCCCAAGGCTCCAGTACTCTAATATATGCTCCTTATAAGTTATGCTGCTCCA  
GGAGATTGCTCTTCTATGCTCCAGGGGCTGGCTCCCAAGTGTTCAGATACCTCAGACC  
TGGTGCTCTAGGCTGTGCTGAGCCACTCTCCCGAGGGCGCATCCAGCGGGGGCCACTT  
GAGAAGTGAATAAATGGGGCGGTTTCGGAAGCGTCAGTGTTCATGTTATGGATCTCTC  
TGGGTTTGAATAAAGACTATCTCTGTGCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 104

MENPSPAALGKALCALLLATLGAAGQPLGGESICSARAPAKYSITFTGKWSQTAFPKQY  
FLFRPPAQWSSLLGAHSSDYSMWRKNQYVSNGLRDFAEERGEAWALMKEIEAAGEALQSV  
HEVFSAPAVPSGTQTSAELEVORRHSLVSPVVRIVFSPDNFVGVDSLDLCDGDRWREQA  
ALDLIPYDAGTDSGFTSSPNFATIPQDTVTETITSSSPSHPANSFYYPRLKALPIARVT  
LLRLRQSPRAFIPFAPVLPSPRDNEIVDSASVPETPLDCEVSLNSSWGLCGGHCGRLGTS  
RTRYVRVQPANNGSPCPELEEEAECEVDNCV

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 105

GCCTAGCCAGGCCAAGA  
ATGCAATTGCCCGGTGGTGGGAGCTGGGAGACCCCTGTGCTTGGACGGGACAGGGTCGG  
GGGACACGCAGG  
ATGAGCCCCCGACCACTGGGCACATTCTTGCTGACAGTGTACAGTATTTCTCCAAGGTA  
CACTCCGATCGGAATGTATACCCATCAGCAGGTGTCTCTTTGTTTCATGTTTGGAAAGA  
GAATATTTAAGGGGGAATTTCCACCTTACCCAAAACCTGGCGAGATTAGTATGATCCC  
ATAACATTAAATACAAATTTAATGGGTTACCCAGACCGACCTGGATGGCTTCGATATATC  
CAAAGGACACCATATAGTGTGGAGTCTTATATGGGTCCCAACAGCTGAAATGTGGGG  
AAGCCAACATCATTGAGTAACTGCTTACAAAGGCGCACCTTTGAGACTGCAAGGCAT  
AATTGATAATTAATATAATGTCTGCAGAGACTTCCCGTTGCCATATCAAGCAGAAATC  
TTCATTAGAATAATGAAATGTAGAAGAAATGTTGGCCAGTGAGGTTCTTGAGACTTTCTT  
GGCGCAGTGAAATGTGTGGCAGCCAGAGCGCTGAACGCCATAAACATCACATCGGCC  
CTAGCAGGGGTGGCAGGGTGCCACTTCCCATTAATGACCTGAAGGAGGGCGTTTATGTC  
ATGGTTGGTGAGATGTCCCGTTTCTCTGTTTACGAGAAGTTGAAATCCACAGAAAT  
CAATTGAGATGTAGTCAAGAAATGGAGCCTGTAATACATGTGATAAAAAATTTCTGTACT  
CAATTTTACATTGACTGTGTGCAAAATTTTCAATTGGTTGATAAAACAAAGCAAGTGTCCACC  
TATCAGGAAGTGATTCGTGGAGAGGGGATTTTACCTGATGGTGAGAAATACAAACCCCT  
TCTGATCTGTTGAAAAGCAGAGACTATTACAGGATTTCTTAATTACACTGGCTGTGCGACGGAA  
TCCGCACTGGCACTGGTCTTTTCTAATACTTGCTTATATCATGTGTGCTGCGACGGAA  
GGGTGGAAGAGAACTGCAACACAGACATCCAACTGGTCLATCAGAGTGTCTATT  
CAGAAATCTACAGGAGCTTCCAGACATGTCCAGAAATAGAGAGATAGCATGGCCCCG  
TCAACGCTTCTGTGTTCCACCTGTGACTGGGAAATCATACCTCTTTACACAGAC  
AAGTATGTAGCACAACATGCCATTGATGCAACGCGACGAGACTTCCCATCAGACT  
CAGATCCCCAACAGCAGACTACAGGTAAATGGTATCCCTGAGAAAGAAAATGACTGA  
AGCAATGAATTTAATCAGACAAATAGCAGTTACATCAGATTCTTTCTCTTCCAAT  
AATGCAATGAGCTTTTCTGGCATATGTTATGCAATGTTGGCAGTATTAGTGTATACCAAT  
AATCAACATAAATTTTACTATTATGTAATTTTGTACTTAAAGCATTTTTCACAA  
TTTGTAAAACATTGATGACTTTATATTTGTTACAAATAAAGTTGATCTTTAAATATAA  
TTATTAATGAAGCTAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 106

MQLFRMELGDPICAWIGQGRGTRRMSPTTGTFLTVYSIFSIVHSDRNVPYPSAGVLFVH  
VLEREYFKGEFFPPYKPGGEISNDPITFNTNLMGYPDPRFGWLRVYIQRTPYSDGVLYGSPTA  
ENVGKPTIIETAYNRRIFETARHNLIINIMSAEDFPLFYQAEFFIKNNVSEMLASEVL  
GDFLGAVENVMQPERLNAINITSALDRGGRVPLPINDLKEGVYVMVGADVFPSSCLREVE  
NPQNLKRCSCQEMEPVITCDKKFRTQFYIDWCKISLVDKTKQVSTYQEVIRGEGILPDGGE  
YKPPSDSLKSRDYTTDFLITLAVPSAVALVFLILAYIMCCRREBGEKRNMQTQDIQLVH  
HSAIQKSTKELRDMKSKNREIAWPLSTLPVFHVTGEIIFPLHTDNYDSTNMPLMQTQQNL  
PHQTQIFQQTTGKNYP

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 107

ATTCTCCTAGAGCATCTTTGGAAGC  
ATGAGGCCACGATGCTGCATCTTGGCTCTTGTCTGCTGGATAACAGTCTTCCTCCTCCAG  
TGTTCAAAAGGAACACAGACGCTCCTGTTGGCTCAGGACTGTGGCTGTGCCAGCCGACA  
CCGAGGTGTGGGAACAAGATCTACAACTTCAGAGCAGTGTGTTATGATGATGCCATC  
TTATCCTTAAAGGAGACCCGCGCTGTGGCTCCAGCTTGACCTTCTGGCCCTGCTTTGAG  
CTCTGCTGTCCGAGTCTTTTGGCCCCAGCAGAAATTTCTTTGTGAAGTTGAGGTTTCTG  
GGTATCAGTCTCAGTGTCACTTATCTCCATCTCCGAGGCTGTACAGGAAACAGGAGG  
CACGTCCTGTACCCATAAAACCCAGGCTCCACTGGCAGAGCCAGACAGAGGGAGAG  
AGACGAGCAGCTGACATCGAGACTACAGTTGAACTTCGAGAGAGCAACTTCACTT  
CAGAGGGATGGCTCAATGACATAGCTTTGGAGAGGAGCCAGCTGGGATGGCCAGACTT  
CAGGGGAAGATGCCTTCCTGCTTCACTCCCTTCCAGCTCCCTTCCGCTGAGAGCCA  
CTTTCATCGGCAATAAAATCCCCACATTACCATCT



WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 108

MRPRCCILALVCWITVFLQCSKGTDDAPVGSGLWLCQPTPRCGNKIYNPSEQCCYDDAI  
LSLKETRRCGSTCTFWPCFELCCPESFGPQQKFLVKLRVLGMKSQCHLSPIRSCTRNRR  
HVLYP

[illegible]

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 110

MAPQSLPSSRMALQMLLGLLMAACFTFCLSHQNLKEFALTNPESSTKETERKETKAE  
ELDAEVLEVFPHTHEWQALQPGQAVPAGSHVRLNLQTEREAKLYEDKFRNNLKGKRLD  
INTNTYTSQDLKSALAKFKEGAEEMESKEDKARQAEVKRLFRPIBELKKDFDELNVVIET  
DMQIMVRLINKFNSSSSLEEKIAALFDLEYVYHQMDNAQDILLSFGGLQVVINGLNSTP  
LVKEYAALVGLGAFSSNPKVOVEAIEGGALQKLLVILATEOPLTAKKKVLFALCSLLRHF  
PYAQROFLKGLGLVRLTLVQEKTEVLAVRVVTLVLDLVTERMFEEEEELTQEMSPEK  
LQQYRQVHLLPGLWEGNCEITAHLLALPEHDAREKVLQTLGVLLTTCRDYRQDFQLGR  
TLASLQAEYQVLASLELQDGEDEGYFQELLGSVNSLLKELR

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 111

AAATATATCATCTATTTATCATTAAATCAATAATGTATTCTTTTATTCGAATAACATTGGG  
TTTTGGGATTTTAAATTTCAACACACAGCAGA  
ATGACATTTTCTGTCTACTATTATTATTGTTGGTATGTGAAGCTATTTGGAGATCCAAT  
TCAGGAAGCAACACATTGGAGATGGCTACTTTCTATCAAGAAATAAGGAGAACCCACAGT  
CAACCCACACATCATCTTTAGGAAGACAGTGTGACTCTACCAAAGCTGTCAAACCCACA  
GGCAAGGGCATAGTTTAAAGGACGGAATCTTGACTCAAGAGGGTTAATTCTTGGTGTGAA  
GCCTGGGCGAGGGGTGTAAGGAAGAACCTTAGATTCAATGATTGTAAATTTAAGGCAAA  
TACACATATTAGTATTACCTTAGTGTAAATGTATCCCTGTCATATATACAATAAGGTGAAA  
TTATAAGTACCCATGCAAGTTGGCTGGAC  
AGTTCTAAATGGAGCTTTATTAATTTTAAATCAGTAACTGATTTATCACTGGCTATGT  
GCTTAGATCTACAGGAGATCATATAATTGTATACAATAAGGAAAGTGTCTCTCCCC  
TTACAGAAATTGACATTTTAAATGCGATACAGTTAGAAATAGGAATATGACATTAGAAAGG  
AAGAAATGACAGGGAGAAAGGAAGAAGGAAATGTTGCCAAGGAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 112

MTFFLSLLLLLVCEAIWRNSNGSNTLENGYFLSRNKENHSQPTQSSLEDSVTPTKAVKTT  
GKGIVKGRNLDSRGLILGAEAWGRGVKKNT

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 113

TGAAGGACTTTTCCAGSRCCCAAGGCCACACACTGGAAGTCTTGCAGCTGAAGGGAGGCA  
CTCCTTSGCTCCGAGCCGATCAC  
ATGAAGSTGSGCCAGCTCTCCTGCTCTCCGCTCCTCTGSCACAGSTGTGGCTG  
GTACCCGGCTTGGCCCCCACTCCTCAGTGGCCAGAGACCCAGCCCTCAGAACCCAGACC  
AGCAGGGTAGTGCAGGCTCCAGGGAGGAAAGAGAGATGAGCAGAGAGGCCAGCGAGGAG  
AAGSCCGGTGAGGAAGAGAAGCTTGGCTGATGGCCAGCAGGACAGCTTSCCAAGGAG  
ACTTCAAACTTCGGATTACGCTGCTGCGAAGATCTCCATGAGGCACGATGCCAACATG  
GTCTTCTCTCCATTTGGCATGTCTTGGCCATGACAGGCTTATGCTGGGGGCCACAGGG  
CCGACTGAAACCCAGATCAAGAGAGGGCTCCACTTGCAGGCCCTGAAGCCCAAGCCCC  
GGGCTCTGCTCTTCCCTCTTAAGGGACTCAGAGAGACCCCTCTCCGCAACTGGAACCTG  
GGCTCTCAGAGGGAGTTTGGCTCTCATCCACAGGATTTTGTATGCAAGAGACTTTC  
TTCAATTTATCAAGAGGTATTTTGATACAGAGTGCGTGCCTATGAATTTTCGAATGCC  
TCACAGGCCAAAGGCTCATGAATCATTACATTAACAAGAGACTCGGGGGAATTTCCC  
AAACTGTTTGTAGAGATTAACTCCTGAAACCAATTAATTTCTGTGGATTACATCTGTTC  
AAAGGGAAATGGTTGACCCCATTTGACCTGTCTTACCGAAGTCGACACTTTCCACCTG  
GACAGGTACAAGACCATTAAGGTGCCCATGATGTACGGTGACGGCAAGTTTGCCTCCACC  
TTTGACAAGAATTTTCGTTGTCTCTTCAAACTGCGCTTACCAAGGAATGCCACCATG  
CTGGTGGTCTCATGGAGAAATGGGTGACCACTGCGCTTGAAGACTACCTGACCACA  
GACTTGGTGGAGATGGCTCAGAAACATGAAACCCAGAAACATGGAAGTTTCTTTCCG  
AAGTTCAAGCTAGATCAGAAGTATGAGATGATGAGCTGCTTAGGCAGATGGGAATCAGA  
AGAACTCTTCTACCCCTTTGCTGACCTTAGTGAATCTCAGCTACTGGAAGAAATCTCCAA  
GTATCCAGGGTTTACGAAGAACAGTGAATTGAAGTTGATGAAGGGGCACTGAGGCAGTG  
GCAGGAATCTTTCAGAAATTAAGCTTATTCATGCTCCTGTCTCATCAAGTGGACCGG  
CCATTTCAITTCATGATCTATGAAGAAACCTCTGGAATGCTTCTGTTCTGGGGCAGGGTG  
GTGAATCCGACTCTCCTATAATTAGGACATGACATAGCACTTCTGCTGTAGTAGATGC  
TGAATCTGAGGTATCAAAACACACAGGATACCAAGCAATGGATGGCAGGGGAGAGTGTTC  
CTTTTGTCTTAAGTATT  
AGGGTGTCTCAAAATAATACAGTAGTCCCCACTTATCTGAGGGGATACATTCAAAGAC  
CCCCAGCAGATGCTGAAACGGTGGACAGTGTGAACCTTATATATATTTTCTTACAC  
ATACATACCTATGATAAAGTTTAATTTATAAATTAGGCACAGTAAGAGATTAACTAAT  
AACAACATTAGTAAATAGTTACTTGAACGCAAGCACTGCAATACCAATACAGTCAAA  
CTGATTATAGGAAGGCTACTAAGTGACTCATGGCCGAGGAGCATAGACAGTGTGGAGAC  
ATTGGCAGAGGGAGAAATTCATCTCTGGGTGGGACAGAGCAGGACGATGCAAGATTCCA  
TCCACTACTCAGATGGCATGCTTAAAGACTTTTAGATTGTTTATTTCTGGAATTTT  
TCATTTAATGTTTTGGACCATGTTGACCATGGTTAAGTGAAGTGCAGAAAGCAAAAC  
CATGGATAGGGAGGACTACTACAAAGCATTAATTTGATACATATTTTTAAAAA  
AAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 114

MKVVPSSLLSVLLAQVWLVFGLAPSPQSPETPAPQNOTSRVVQAPREEEEDQEASEEKA  
GEEKKWLMSRQQLAKETSNFGFSLRKISMRHDCNMVFSPPGMSLMTGLMLGATGPT  
ETQIKRGLHLQALKPTKPGLLPSLFKGLRETLNRNLEGLSQGSFPIHKDFDVKETFPN  
LSKRYFDTECVMMNFRNASQAKRLMNHYNKETRGIKPLFDEINPETKLILVDYILFKG  
KWLTPFDVPTFVDTFHLDKYKTIKVPMYAGKFASTFDKNFRCHVLKLPYQGNATMLV  
VLMEKMGDHLALEDYLTDLVETWLRNMKTRNMEVFFPKFKLOQKYMHELLRQMGIRRI  
FSPPADLSLSATGRNLQVSRVLRRTVIEVDERGTEAVAGILSEITAYSMPPIKVDRPF  
HFMIVEETSGMLLFLGRVVNPTLL

AGGCAACACAGCGCGCCGCAACACCGCTGCGCATCGCCGCTCGCGGGGGC  
 ATGTTCGCTCTGGGCTTGCCCTCTGGCTGTCTTGTTGGGCTCTGGGAGGAGCATCTG  
 GGGTCTCTGGGGGCCCAAGACAGCTCTCGGACAGGAAGCGGCAGTTTGAGCGACATCTGCTG  
 GCAGAGTTCACACAGGAGCTGCTCACTACATCAACTCTACCACTACTGACACCGGACAC  
 AGGACAGGAGGGGCTGCGTGTGTCTGTGAACTGCTCTGAACACAGGACAGGAAGGGCGCGTGTG  
 TCTTGTGGTGTGCGGACAGGAGGAGTCTGGTGTGTCTTCAGGCTGGCCCTTAATCTGCGA  
 GGGATGTTTACGCGAGCACTCTCTCAACAAAGAGTGGAAAGACACCTCTGTGACGCCCCC  
 ACCAAGAATAGCTGGAGATTCAGTTGTTCTACGTGGGATCTGTGCACCTCTGACCAACTG  
 AACACACATACATCGAGCTCTCGGCTCAGGCGCATGAGGAGATTTGTGTCTCAGAGCTGGGGAG  
 CAGTTTGACTTCAATACACAGCAGGACGCGCCAGTCTCAGATATGAGTTCTCTGTG  
 GSGCTGGCTCGGTATATCTGTCAAGTGACCTCCACAAAGGCTCTCCCTCTCAGTCACTG  
 TCCATTCCAGATGTGCTGTCTCTGTCTATGACTCTGGACAAACAGTACGTTCTCTCGGCT  
 GTGTACGACAGATGACCAAGGAGGCGGCCATCACGCTACGACGCAAGAGCTTCCCGACG  
 AACAGCTTTTATGTGTGTGGTGTGGTAGAGCAAGAACAGCTCTCGGGGGCTCTCGCT  
 CTTTGTCTCCCTCTCGACAGAGATGACACGGTGTGATCAAGGCGACCGCCAGAAACACCTG  
 TCATGTGTGGTCTTCAGGACAGTCACTCTGAAGG  
 ATATGCTCAGCTGGGATGCTCTTTTGGCTGGATATATCTCTCTCTTATCTCGTAGCAGCT  
 CTTCTGCGCTCTCTGGGAGATCTGAGGAGGACAGGAAGAGACCTCTGTGGTGACATTGA  
 CGAGGCTGCGCAGAAAGCGGTCAACCTCGAGTCTCGTGCGTATTTCTTTCTGGGACTGT  
 CTTCTATGAGGTTTACACTATGCTCTTTTGAAGATGTTTGTGATCTACGAGTGTGCT  
 GGTGTACACGSGCTGGCATCTGGGAGCACTCTCTGACGTTCACAGGGCGCGCTCTTTGAACT  
 TATGGATCTCGGCGCGGAGTGAATCTCTGAGCTCTGTGGAGGAGTAGTACAGCAC  
 ATGACCGCACTCGATTCCGACAGAGATGTCTATCTCGCACAGCAACTACTCTATGTGGTG  
 TGAGCTCGGACGAGGAGGACAGAGTGTCTGCGAAAGAAAGTACAGATCTCTGTGTGGAA  
 CATTGCCACATCTGCTGCTCTTATGCGCTCTCTGTGTGCGACTGTGTATCTACCTACA  
 GAGCTGSGTGAATGTACAGGGAAGTACGAGACATCTGCTACCAACTCTCTCTCGGCCCA  
 CCCATCGGGACATCTCAGCGGCTCTCAACCAACATCTCTGACAGCTCGGGATATGATGCT  
 GGGGCTCGGTTTCTCTGCTCATATCTCTGCAACGGGAGATCACACACATCGGCGCTCTG  
 GCGACAGCATCTCTGTGCTGGGAATGGGCTGCGCCACATCTCTGAGGCTCTCTTACGCT  
 CATGGGACAGCTCTGTGATGATGGAGGGGCTCTGCGGACATCTCTATCATCTGTGCGCCCA  
 CTATACCAATCTCCGATTTGACACATCTGCTGATGCTGATCTGCGGAGCTCTGTGACT  
 GAGCTCTTACGAGGCGGACAGCCGCGCATCAACGCGAGGCGCTACAGTCTCAGCGCT  
 CTGTCAGTCACTGAGTCTCTGCTGATGCTGCTGCTGCTGGGCTGTCTTGG  
 CTACGACGCGACTCTTATACATGGGCGCGGATCTGCAATCTGAGATCTCTCGCGCT  
 CATCTCCGATCGCTTACAGACATGTCTACGACATGTGCTCAGGCTCAGCGCGCGCTCTAGTGG  
 CGCATCGGCTGCTGTGCTGTGAGGCACTCTGACATCTGTGCTGTGCTGTCTATGGGCT  
 TATCATCGGCGCGGATTTGCTTCTACTTGTGGCATTTGGCATCTGCAACCTGCT  
 CTTTACTTCTCCACTCTTACATCATTAAGACCTCGGAGTAGGAGAGATCAAGCTCAT  
 CCCCCCTGCTCTGACATGCTTGACACTCTCGGTGTGTGGGCTCTCGGCTCTCTTCTTCT  
 CAGAGGCTCAGCACTCTGACAGAAACCTTGAGGCTGAGGAGGACCAACCGGAGATCT  
 CATCTCTCTCGACTCTTTGACAGCACAGCATCTGSCACTTCTCTCTCATCTCGCATCGCAT  
 GTTGGGCTCTCTCTGTGTGTGTGACACATGGATGAGCACTGAGTGTGATGTGACG  
 CGGACAGAGTCTATGTTCTTACGAGGAGCTGGGCCCTTCTCTCACTCAAGGGGCCCT  
 TGAGCTCTCTTTGTGTATAGACCGCATCTGTGTGTGCTGTGGGATAGAGTCTGGGAC  
 CCGCTGCCAGCATGTGATGAGCAGGACAGGACAGGTCATGCTTAGGCTTGGCTGGGAC  
 AGCATATGGGTTGSGATGGAACTTGACGCTGCCCTCTGCGAGGAGGAGGCTCTGCCCT  
 TGGAAACCGCGAGTATGAGTGTGTGCTTGTCTTCAAGTGTGGGGCTCTCCATGG  
 GCCCCCTCTTGTGCTCTCAATTTCTTGTCTTGAAGAGGAGGATGAGGAGGACACC  
 TCCCATTTTATGCTCTGTCACTTTTGGCGCTCTCTCCCACTCGCCAGCTGGGAC  
 TCAAGGCGCTTTTCTCTCCATATCTCCACTCCAGGCGCTGATCTGGGCGTGAATCT  
 TGTGCTGATCAGGSGCCGAGTTCTTCTTGGGCTGCTCTGGCTGCGCATCTGCCCATT  
 CAGTCTGAGGATGAGGATGGGGGATAGAGATTTGGGGGTTGSCGACGTGGTGACGAC  
 TTTGGTGTCTGAGGCTCTGACGGGCGCTGGGCGAGTGCGATTTCTCTCTCTCGACCTG  
 TGCTCAGGCGCTGGGCTTTAGCAATCTGCTCAGCCCAATTTAGAGACAGCTCTGTGAT



WO 00/53758

PCT/US00/05841

AAGAGGCTGAATTCAGAGGTCACCTCTTCATCCCATCAGCTCCAGACTGATGCCAGCAC  
CAGGACTGGAGGGAGAGGGCTCAGCCCTTCCCTTCTTTCCAGGCCCTTAGTCTT  
GCCAACCCTCAGCTGGTGGCTTTCAGTGCATTGACACTGCCCAAGATGTCCAGGGGC  
AAAGGAGGGATGATACAGAGTTCAGCCCTTCTG  
CCTCCACAGCTGTGGGCACCCAGTGCCTACCTTAGAAGGGGCTTCAGGAAGGGATGTG  
CTGTTTCCCTCTACGTGCCAGTCTTAGCTCGCTCTAGGACCCAGGGCTGGCTTCTAAG  
TTTCGTCCAGTCTTCAGGCAAGTCTGTGTAGTCATGCACACATACCTATGAACC  
TGGAGTTTACAAAGAATTGCCCCAGCTGTGGGCACCTGGGCCACCTGGTCTCTTGGATC  
CCCTTCGTCCCACTGGTCCACCCAGATGCTGAGGATGGGGAGCTCAGGCGGGGCTC  
TGCTTTGGGGATGGGAATGTGTTTTCTCCAAACTGTGTTTTATAGCTCTGCTTGAAGG  
GCTGGGAGATGAGGTGGTCTGGATCTTTCTCAGAGCGTCTCCATGCTATGCTTGCATT  
TCCGTTTTCTATGAATGAATTGCATTCAATAACAACCCAGACTCAAAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 116

MPALGLPFLVLLVASVESHGLGVLGPKWVSQKDAEFERTYVDEVNSELVNIYTFNHTVTRN  
RTEGVRVSVNVLNKQKGAFLLEFVVRQKEAVVSFOVPLILRGMFORKYLKOKVERTLCOPP  
TKNESEIQOFFYVDVSTLSFVNITTYQLRVSRMDDFVLRTEGQFSFNTTAAQOQYFKYEPPE  
GVDSVIVKVTSTNKAFFPCSVISIQDVLCPVYDLNNAVAFIGMYQTMKKAAITVQRKDFFS  
NSFYVWVVKTEQACQGSLLPFYPPAEDEPVDQGHROKTLVLVSQAVTSEAYVSGMLFC  
LGIFLSFYLLTVLLACWENNRQKKKTLVAIDRACFESGHPRVLADSPGSSPFYEGYNYG  
SFENVSGSDGLVDSAGTCDLSYGYOGRSFEFVGTFRPVDSMSSEEDDYDTLTDIDSDK  
NVIRTKQYLYVADLARKDKRVLKRYIYFNNIATIAVFYALPVVOLVITYQTVVNVGN  
QDICYNNFLCAHPLGNLSAFNNILSNLGYILLGLLPLLIILQREINHNRRALLRNDLCALC  
CGIPKHPGLFYAMGTALNMEGLLSACYHVCNVTNFOFDTSEFMYMIAGLCMLKLYOKRHP  
DINASAYSAYACLAIVIFFSVLGVVFGKNTAFNIVFSGIIHIIATLLSTOLYYMGRWKL  
DSGIFRRILHVLVYTDICIRQCSGPLYVDRMVLVMGNVINMSLAAYGLIMRPNDPASYLEA  
IGICNLLLYFAFYIIMKLRSGERIKLIPLLCIVCTSVVWGPALFFFFOGLSTWQKTPAES  
REHNRDCILLDDFFDDHDIWHFLSSIAMFGSFLVLLTLDDDDLTQVORDKIYVF

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 117

GACTTTGCTTGAATGTTTACATTTTCTGCTCGCTGCTCATATATACAAATATAGTGTTC  
 ACGTTTCTTAAACCTTTGCGGTCTCAGGAGTTGAGCTTGTCTCAGCAAGCCAGC  
 ATGGCTAGGATGAGCTTTGTTATAGCAGCTTCCCAATTGGTGTGGGCTACTAATGACT  
 TCRTTAACCGAGTCTTCCATACAGAAATAGTGAAGTCTCAGCAATTTGCGTATGTGAAAT  
 CGTCCCTGGTTTACCCACAGTCTACTTACAGAGAGCCACCACTGTTGATTGCAATGAC  
 CTCGCTTAACAAGGATTCCAGTAACCTCTCTAGTACACACAAGTCTTCTCTTACAG  
 AGCAATAACATCGGAGAGCTGTGATGAGCTGCAGCAGCTTTTCACTTGACTGAACTA  
 GATTTCCTCCAAACAACCTTACTAATATTAGGAGGTTCGGGCTGGCAACCTAACCCAG  
 CTCACAACGCTGCATTGGAGGAAATCAGATTACCGAGATGACTGATTACTTCTTCAAA  
 GACCTCAGCAACCTTCAGAACTCTACATCAACCAACAACCAATTAGCACTATTCTGCT  
 CATGCTTTTGCAGGCTTAAATAATCTATTAGGCTCCACCTGAACTCCAACAAATGAAA  
 GTTATTGTAGTGTGCTGGTTTGATTCTACACCAACCTGGAAATCTCATGTATCGGAGAA  
 AACCTCTGATTGGAATTTGGATATGAACCTCAACCCCTCGCAATTTGAGAAGCTTA  
 GTTTTGGCAGGAATGTATCTCACTGATATCTCTGGAAATGCTTTGGTGGGTCTGGATAGC  
 CTTGAGAGCTGTCTTTTATGATAACAACTGGTTAAAGTCCCTCACTTGCCCTGCAA  
 AAAGTTCCAAATTTGAAATCTTAGACCTCAACAAAAACCCATTCAACAAATCCAAGAA  
 GGGGACTTCAAAATATGCTTCGGTTAAAGAACTGGGAATCAACRAATGGGCGAGCTC  
 GTTCTGTGCGACCGCTATGCCCTGGATAACTTGGCTGAACTCAAAAGCTGGAGGCCACC  
 AATAACCTTAACCTCTCTTACATCCACCGCTTGGCTTTCCGAAGTGTCCCTGTCTGGAA  
 AGCTTGATGCTGAACAACAAATGCTTGAATGCCATTTACCAAAAGACAGTCAATCCCTC  
 CCAATCTGCTGAGATCAGTATCCATAGCAATCCCTCAGGTGTGACTGTGTGATCCAC  
 TGGATTAACTCCAACAAACCAACATCCGCTTCAAGGAGCCCTGTCAATGTTCTGTGCC  
 ATGCCGCCGCAATATAAAGGGGACCCAGGTGAAGGAAGTTTAAATCCAGGATTGAGTGAA  
 CAGTGCTCCCAATGATATCTCACGACAGCTTCCCAATCGTTTAAACGTGGATATCGGC  
 ACGACGCTTTCTAGACTGTGAGCCATGGCTGAGCCAGAACCTGAAATTTACTGGGTC  
 ACTCCCATTTGAAATAAGATAACTGTGAAACCCCTTTAGATAAATCAAGCTAAGTAGC  
 GAAGGTACCTTGGAATATCTAACATACAAATTTGAAGACTCAGGAAGATACACATGTGTT  
 GCCCAGATGTCCAGGGGGCAGACCTCGGGTGGCAACATTAAGGTTAACGGGACCTTT  
 CTGGATGGTACCCAGGTGCTAAAAATATACGTCAAGCAGACGAATCCCATTCATCTTA  
 GTGCTCTGGAAGTTAATTCCAATGTGATGACGTCAAACTTAAATGGTCTGCTGCCACC  
 ATGAAGATTGATACCTTCACATAACATATAGTCCAGGGTCCCAGTCCGATGTCCATGAA  
 TACAACTTAACGCAATTCAGGCTTCCAGAGATTATGAAGTGTGTCTCAGAGTGTCCAAT  
 ATTATCAGCAGACTCAAAAGTCTATGCGTAAATGTCAACACCAAAATGGCGCTTCCGA  
 GTGGACATCTCTGATCAAGAAACCGTACAGCCCTTGTCTCAGTAATGGGGTCTATGTTT  
 GCCCTCATTAAGCTTGGCTCCATTGCTGTACTTTGCCAAAGATTAAAGAGAAAC  
 TACCACCACTCATTAACCTCTGGGAAGTGAACAGCAGAGAAAGACAAGATGCTTCTGCA  
 GACCAAGCAACCCAGGTGACACATCCAGAGCTATTACATGTGTCTAATCAGAGGA  
 TATTTTGTCTTGGTGTAGTAGGAGCACAAAGACGTTTTTGTCTTATTCTGCAAAAGTGAA  
 CAAGTTGAAGACTTTGTATTTTGTACTTTGTAGTTTGTGGCAGAGTGAGAGGACGGG  
 TGGATATTTCAAAATTTTGTATAGCGTATCGCAAGGGTTTGACACGGCTGCCAGCGA  
 CTCTAGGCTTCCAGTCTGTGTTTGTGTTTATTCTTATCATATTATGATTGTTATTATA  
 TTATTATTTTATTAGTTGTTGTGTTAACTCAATAATGCTGTTCTAACTACAGTGCTC  
 AATAAATGATTATGACAGGAAAAA  
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 118

MARMSFVIAACQLVLGLLMTSLTESSIONSECPQLCVCEIRPWFTPOSTVREATTVDGN  
DLRLTRIPSNLSSDTQVLLLSNNIAKTYDELQQLFNLTELDPSQNNFTNIKEVGLANL  
TQLTTLHLEENQITEMTDYCLQDLSNLQELYINHNNQISTISAHAFAGLKNLLRLHLDNSN  
KLKVIDSRWFDSTENLEILMIGENFVIGILDMNFKPLANLRSLVLAGMYLTDIPGNALV  
GLDSLESLSFYDNKLVKVPQLALQKVFNLFKFLDLNKNPIHKIQEGDFKNMLRLKELGIN  
NMGELVSVDRYALDNLPELTKEATNNPKLSYIHLAFRSVFALESILMANNAIMAIYC  
KTVESLENLREISIHENPLRCDVVIHWINSKNTNIRFMEPLSMFCAMPPEYKGHOVKEV  
LIQDSSECLPMISHDSFENRLNVDIGTTVFLCRAHAEPEPELYVVTPIGNKITVETL  
SDKYKLSECTLEISNIQIEDSGRYTCVAQNVAGADTRVATIKVNCITLLDGTQVLKIVY  
KOTESHSILVSHKVNNSNMVMTSNLKWSSATMKIDNPHITYTARVFDVUHEYNLTHLPST  
DYEVCLTVSNIHQQTQKSCVNVTKNAFAVDISDQETSTALAAVNGSMFAVISLASIA  
VYFAKRFKRKNYHSLKKYMQKTSSIPLNELYPLINLWEGDSEKDXDGSADTKPTQVD  
TSRSYMW

PCT/US00/05841

CCAGCGCTCCGCCAGAGGTCCTCGGGTGCACATCGGCGCGCGCGCGCTCCGGGCTCTCT  
CTTTTCTCTCGAGCGCAGCAGCGCTCGACACAGCATCTCGGTCGCTCGGGTCTTGAGAGAGCT  
CGCCAAACCTCTCGGAGAGAGAGCGAGCGCGCAGCTGGCTGGCTGGCGCGGGGCGCGCTTG  
GTCTCGAGAGAGCGGAGGAGCGAGCGCGAGGATGAGCGACTGAGGCGCGCGCGCGAGCTGA  
CGGAGTCTGGGGCGCGACCTACCTGGCAGCTACAGCGCGATGAGCGACTCCGAGAGAGCG  
CCTTAGCCGCTGTGCGCGCAGGCGAGCGCGCGCGAGGTGGGCGTGGCTTGTAGTGTGCT  
CGCTCGCGCGGCTCGCGCGCGCTCGAGATGGCGCGCTGGGCAACCGAGGCGCGCGCGCG  
GCTCTGATCTCCCTCGCGCGCTCGAGCGCGCGCTCGCGCGCGCTCGCGCTCTGAGT  
CGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGTGAATGCGACTCGCGCTCTCGCTCTCGG  
CGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCTGAGGGG  
**ATG**CCAGCTCTGCGATCGATCGATAGCTTGGCGCGCTCTCCAGTCTCCCTCTGGTCAACGTC  
TGCTGTATGGTGCTCTTGCTCGATGCTCGAGCATCTCCGCTGGAGAGAGCTGCGCAGGCGAC  
GAGCGAGCGCGCGCAGGAGAGAGCTGAGCAGCGCTCTGGGAGCGCGCGCGGCGCTGTGAC  
AGCTCTGGTGGCTCTGCGCGCGCGAGGAGCAGGCGCGCTAGCGCGGAGCTGGAGAGAGAG  
GCGCGTGGCTCTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGAGAGCAGCGTGGTCTCGAG  
GGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTTCTGAGCGTGGCGCGCGCGCGAGAGCAGCGCGCGG  
GAGCGCTCTCGCGCGCGCGCGCGCTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
CAGCCAGGAGATAGCTGTATCCCGAGCTAGTGGCGAGCTCTGTGACGAGAGCGGCT  
TCTGTGTACGCGATCGAGCGAGAGCTTCGCGCGCGCGCGCTGGCTGGCTGGCTGCTG  
ACCGAGAGAGGCGCGCTGTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTG  
CAGCTGCGACGACGAGCGCTGCTCTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTG  
CGGGCGACAGCTATCAGACTTGGAGAGTCTGTGGTGTCTCCATCGGAGAGGTGCTGCG  
TGTGAGCGCAACGTTGAGAGTG  
TACTGACAGACTCTACGGTGTCTCCCGACAGGCTGTGGTGAACCTGTGTACAGAGCTGAT  
CAGCTGTGTCCCATCTCGCAAAATCTGGTCTTCAGAAAACCGCGGTATCGCTCT  
CTGTGCGAGAGATGAGAGCTACGAGCTGCGACCATATGCCACTGTACTTATGAGAGAGCG  
ACATGAGAGATCGAGCGCGCAGCGCATCTGTGCGAGAGCATGATTCAGCGGCAAGTATGAGCG  
CTTCCGACAGCAAACTCTGCACTTCTTGTAGAACATTTACTGATGTGGAACACTGAGA  
TGACTCTGGGACATCTGATGACCAAGAGAGCTTGTATGAGGAGAAATATGAGAAATCTGTGG  
TACTTTTCTTTTCTGATACAGGACTACTCAACAGAGAGAAATGGATATTTTCAAAC  
ATCAACAGAGACTTTGGGCAATAAAATCTGCTTAAATAAATGTGCTATTCTACAGTAA  
GTACACAGAACTGACATATTATATCAATGTATTTCTAATCTCCCTCATTAGAGAGC  
TATATAGTGTTTTTATATAGTGCAGATTAATAATGCTGTGTGTGTCAACGCTCAAAA  
AAAAAAATTTTTTAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 120

MPSTAMAVGALSSSLVTCCLMVALCSFSIPLEXLAQAFQPGQEKREHATRDGPGRVN  
ELGRPARDEGGSGRDWKKSGRGLAGREBWSKLQAWVSQGGGAKAGLLQVRFRGDTFQA  
EALAAAQDAIOPELAPTPEPPEYVYFDYRGKGCVDSSGFVYAIGEKFAFGPSACPCLC  
TEEGPLCAQPECPRLHPRCIHVDTSCCPQCKERNYCEFRGKTYQTLBEFVVSFCERC  
CEANGEVLCTVSACPOTECVDPRVYEPDQCCPICKNGFNCFAETAVIPAGREVKTDECTIC  
HCTYEEGTWRIERQANCTRHECRQM

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 121

CGCGAGCCCTGCGCTGGGAGGTGCACGGTGTGCAAGCTGGACTGGACCCCATGCAACC  
CCGCGCCCTGCGCTTAACCAAGGACTGCTCCGCGCGCCCTGAGCCTCGGGCTCCGGCCCC  
GGACCTGCGAGCTCCAGGTGGCTGGGAAGAACTCTCCAAACAATAAATACATTGTATAG  
AAAG  
ATGSCCTTTAAAAGTGCTACTAGAACAGAGAAAACGTTTTTCACTCTTTTAGTATTACTA  
GCTATTGTGCAATGIAAAGTGACTTGTGAATCAGGAGACTGTAGACAGCAAGAATTCAAG  
GATCGGTCTGGAACCTGTGTTCCCTGCAACCACTGTGGGCTAGGCAATGGAGTTCTTAAG  
GAATGTGCTTCCGCTATGGGAGGATGCACAGTGTGTGACCTGCCGCTGCAAGGTTT  
AAGGAGGACTGGGCTTCCAGAAATGCAAGCCTCTCTGACTGCGCACTGCGCAGTGTGAACGC  
TTTCAGAAGGCAATTTTTCAGCCACCACTGATGCCATCTCGCGGACTGCTTGGCAGGA  
TTTTATAGGAAGACGAACCTTGTGCGCTTTCAGACATGGAGTGTCTGCTTGTGAGGAC  
CCTCCTCCTCTTACGAACCGCACTGTGCCAGCAAGGTCAACTCGTGAAGATCGCGTCC  
ACGGCTCCAGCCACGGGA  
CACGGCGCTGGCTGCCGTTATCTGCAAGGCTCTGGCCACCGTCCGTGGCCCTGCTCAT  
CCTCTGTGTCATCTATTGTAAAGAGACAGTTTATGGAGAGAAACCCAGCTGGTCTCTGCG  
GTGCGAGGACATTCAGTACAAACGGCTCTGAGCTGTGCTGTTTTGACAGACCTCAGCTCCA  
CGAATATGCCACAGAGCCTGTGCTGCAAGTGGCGCTGACTCAGTGCAGACCTGCGGGCC  
GGTGGCTTGTCTCCATCCATGTGCTGTGAGGAGGCTGCAAGCCCAACCCGGCGACTCT  
TGGTTGTGGGTGCTTCTGAGCAGCTCTTCAAGCAAGAAACAGGCGCCAGCCGGGGA  
GATGGTGGCGACTTCTTCGGATCCCTCAGCAGTCCATCTGTGGGAGTTTTAGATGC  
CTGGCTCTGATGCAGAACTCCATGGGTGGTGAACATCTCTTTTGTGACTCTTATCC  
TGAACTCACTGGAGAAGACATTCATTCTCAATCCAGAACTTGAAGCTCAACGCTCTTT  
GGAATCAAATAGCAGTCAAGATTGTTGTTGGTGGGCTGTTCAGTCCAGTCTCATCTGA  
AACTTTACAGCAGTACTGATTTATCTAGATATAACAACAACACTGGTGAATCAGCATC  
AACTCAGGATGCATACTATGAGAAGCCAGTATAGTACAGGAGAGTGGCGCTGTATCCA  
CCAGCCACTCAGACGTCCTCCAGGAAGCTTAAAGAACCTGCTTCTTCTGCAGTAGAA  
CGCTGTGTGGAACCAAGAGTACTCCTTTGTTAGGCTTATGACTGAGCAGTCTGGAC  
CTTGATGGCTTCTGGGGCAAAAATAAATCTGAACCAAACTGACGGCATTGAAGCCTTT  
CAGCCAGTGTCTTCTGAGCCAGACCACTGTAAAGCTGAAACCTCAATGAATAACAAGAAA  
AGACTCCAGGCGACTCATGATACTGTGATCTTTCATCATGAGAAGCTTCTCTGCCAC  
AAAAGTGACTTCAAGACTGATGGGTGAGCTGGCAGCTATGAGATTGTGGACATATAA  
CAAGAAACAGAAATGCCCTCATGCTTATTTTCATGGTGATTGTGGTTTTACAAGACTGAA  
GACCCAGAGTATACCTTTCTTCCAGAAATAATTCATACCGCTATGAAATATCAGAT  
AAATTACCTTAGCTTTTATGTAGAAATGGGTTCAAAAGTGAGTGTCTTCTATTGAGAAGGA  
CACITTTTCATCATCTAAACTGATTCGCATAGGTGGTTAGAAATGGCCCTCATATTGCTG  
CCTAAATCTTGGGTTTATTAGATGAAGTTTACTGAATCAGAGGAATCAGACAGGAGGA  
TAGCTCTTTCAGAAATCCACTTCTGACCTCAGCCTCGGTCTCATGAACCCGCTGAT  
CTCAGGAGAACACCTGGCTAGGGAATGTGCTGAGAAAGGCGACGCCATTGCCAGAAAT  
TACACATATTGTAGAGACTTGTATGCAAGGTTGSCATATTTATATGAAAATAGTTC  
TATAGAAACATTTGTGATCTGTCCCTCTGCTGAGCTTAGAAGTTATAGAAAGGG  
TATTTATAACATAAATGACCTTTTACTTGCAATTGTATCTTATACTAAGGCTTTAGAAA  
TTACAAACATACAGTTCCCTTACTACTGAAGTACGCTTCCGTGAGAACACACCATATGT  
TAGGACTAGAAGAAATGCACAAATTTGTAGGGGTTGGATGAAGCAGCTGTAACTGCCCT  
AGTGTAGTTTGAACAGGACATGTGCTGCTCCTTCCAATTGTGTAGATTAGTTAGCACA  
TCATCTCCTACTTTAGCCATCGGTGTTGGATTTAAGAGGACGCTGCTTCTTTCTATTAA  
AGTGTCTCCATCCCTACCATCTACACATTAGCATTGTCTCTAGAGCTAAGACAGAAATTA  
ACCCCGTTCAGTCAAAAGCAGGGAATGGTTTCAATTACTCTTATCTTTATGCCCTGGAG  
AAGACCTACTTGAACAGGCGATATTTTGTAGACTTCTGAACATCAGTATGTCGAGGGTA  
CTATGATATTTGGTTTGAATGGCCCTGCCAAGTCACTGTCTTTAACTTTTAAACTG  
AATATPAAATGTATCTGCTTTCCT

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 122

MALKVLLLEQEKTFFTLLVLLGYLSCKVTCESGDCRQQEFDRSGNCVPCNQCQPGMELSK  
ECGFGYGBDAQCVTCRLHRFKEDWGPQCKPCLDCAVVRFOKANCSTSDAICGDCCLPG  
FYRKTKLVGFQDMCECVPCGDPPEPPYEPHCASKVNLVKIASTASSPRDTALAIVICGALAT  
VLLALLILCVIYCKRFMEKKPSWSLRSQDIQYNGSELSCFDRPOLHEYAHRACQCRRD  
SVQTCGPFVRLPSCMCEEACSENPATLGCQVHSAASLQARNAGPAGEVMTFFGSLTQSI  
CGEFSDAWPLMQNPMGGDNISFCDSYPELTGEDIHSLNFELESSTSLDSNSSQDLVGGAV  
PVQSHSENFTAATDLGRYNTLVESASTQDALTMRSQDLQESGAVIHPATQTSLSLQEA



WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 123

GGGTGATTGAACCTAAACCTTCGCCGACCGAGTTTGAGTACGGCCGTCACCCGACCCGC  
TGCTGCTTGCCTTGGAGAAATCAAGGCCCTACCGGGCTCCGTASTCACCTCTCTATA  
GTGGGCGTGGCGGAGGCGGGGTGACCTGCCGGAGCCTCCGCTCCAGCGAC  
ATGTTCAAGGTAATTCAAGAGGTCCGTGGGGCCAGCCCTGAGCTTGCTCACCTTCAAA  
GTCTATGCAGCACCAAAAGGACTCACCTCCCAAAATTCGTTGAAGTTGATGAGCTT  
TCACTCTACTCAGTTCCCTGAGGGTCAATCGAAGTATGTGGAGGAGCAAGGAGCCAGCTT  
GAAGAAAGCATCTCACAGCTCCGACACTATTGCGAGCCATACACAACTGGTGTGAGGAA  
ACGTACTCCCAAACTAAGCCCAAGATGCAAGTTTGGTTCAATGGGGGTTAGACAGCTAT  
GACTACTCTCCAAATGCACCTCCCTGATTTTTCCGAGACTTGGTGTATTGGTTTGGCT  
GGCTTATTTGGACTCCTTTGGCTAGAGGTTCAAAAATAAAGAGCTAGTGTATCCGCT  
GGTTTCATGGGATTAGCTGCTCCCTCTATTATCCACAACAAGCCATCGTGTTCGCCAG  
GTCAGTGGGAGAGATTATATGACTGGGGTTTACGAGGATATATAGTCATAGAAGATTG  
TGAAGGAGAACTTTCAAAAGCCAGGAAATGTGAAGAACTTACCTGGAACTAAGTAGAAA  
ACTCCATGCTCTGCCATCTTAATCAGTTTATAGGTAAACATTGGAACTCCATAGATAAA  
TCAGTATTTCTACAGAAAAATGGCATAGAAGTCAGTATTGAATGTATTAAATTGGCTTTC  
TTCTCAGGAAAACTAGACCAGACCTCTGTTATCTTCTGTGAATCATCCTACAAGCAA  
ACTAACCTGGAAATCCCTTACCTAGAGATAATGTACAAGCCTTAGAACTCCTCATTCTCA  
TGTGCTATTTATGTACCTAATTAAACCCCAAGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 124

MFKVIQSVGPASLSLLTFKVYAAPKKDSPPKNSVKYDELSTLYSVPEGQSKYVEEARSQ  
EESISQLRHYCEPYTTWCQETYSQTKPKMSLVQWGLDSYDYLQNAFFGFFPRLGVIGFA  
GLIGLLARGSKIKKLVYPPGFMGLAASLYPQQAIVPAQVSGERLYDWGLRGYIVIEDL  
WKENFQKPGNVKNSPCTK

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 125

TTGAAATCTACTCTATCAGCTGCTGTGGTTGCCACCATTCCTCAGGACCCCTGGCC  
ATGAAAGCCCTTATGCTGCTCACCCTGTCTGTCTCTGCTGTGGTCTCAGCT  
GACATTCGCTGTCACTCCTGCTACCAAGTCCCTGTGCTGTGGTGTGGACCGGAGTCC  
TGCCGCTGGAGCCAGGACAGCAATGCTGACAAACATGCTATCTTGGTAAGATGTGG  
GTTTCTCCAACTCTGGGCTGTGGCACACAGAGAGCCCTGCTCAGGAGGCTTCAACCA  
ACCAACCGCAAGCTGGGCTGTGACATATAACACCCTGCTGCAACAGGACAACTGCAAC  
AGCCAGGACCCCGCCACTCCAGCCCTGGGCTTGTCTTCTTACCTCTTGGCTGGC  
CTTGGCTCTGGCTGTGCACTGAGACTCATTCATTGGCTGCCCTCCTCCACCTGCC  
TTGGCTGAGCCTCTCTCCTGTGCTCTGTATCCTCTGGCTTACAGAACTGCTCTCTCC  
CTAGCTCCCATTTCTTAATTAACTGTTCCGAGTGGCTCTCTCATCCATCCTTCCCA  
CTCACACCCCTTCACTCTCCTTTTCTGGTCCCTTCCACTTCTTCCAGGACCTCCAT  
TGGCTCCTAGAAGGGCTCCCACTTTTCTGGTCCCTATCTCTGCTGCTCCCTACTTGAGGAG  
GGATTGGGATCTGGGCTGAATGGGCTTCTGTGTGTCTCCAGTGAAGGCTCCACAA  
GGACCTGATGACCTCACTGTACAGAGCTGACTCCCAAACCCAGGCTCCCATATGTACCC  
CATCCCCATACCTCTTCCATTTTGAGTAATAATGTCTGAGTCTGAAAAAAA  
AAAAAAAAA

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 126

MKALMLLTLSVLLCWVSADIRCHSCYKVPVLGCVDROSCRLPGQQCLTHAYLGKMMVF  
SNLRGTPPEPCQEA FNQTNRLGLTYNTTCCNKDNCNSAGPRPTPALGLVFLTSLAGLG  
LWLLH

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 127

ACC  
ATGGATTGCCAAGAAAAATGAGTACTGGGACCAATGGGGACGGTGTGTACCTGGCCAACGG  
TGTGTCCTTGGACAGGAGCTATCCAAGGATTGTGGTTATGGAGAGGGTGGAGATGCCCTAC  
TGCCACAGCCTGCCCTCCTCGCAGGTACAAAAGCAGCTGGGGCCACCACAGATGTCAAGAT  
TGCAATCACCTGTGCTGTCAATCATCTGTTCAGAGGTCAACTGCACAGCTACCTCTAAT  
GCTGTCTGTGGGACTGTTTGCCAGGTTCTACCGAAGACACGCAATTGGAGGCTTGCAG  
GACCAAGAGTGCATCCCGTGCACGAAGCAGACCCCACTCTGAGGTTCAATGTGCTTTC  
CAGTTGAGCTTAGTGGAGGCAGATGCACCCACAGTGCCCTCTCAGGAGGCCACACTTGT  
GCACTGTGTGAGCAGCTGTAGTGGTGTACCTGGCCCTCTCTGGGCTCTCTTCTCTC  
TACTGCAAGCAGTTCTTCAACAGACATTGCCAGCTGTATCAGGAGGTTTGTGTCAGTTT  
GAGGCTGATAAAACAGCAAGGAGGAATCTCTTCCCGTGCCACCCAGCAAGGAGACC  
AGTGCTGAGTCCCAAGTGAGTGAGAACATCTTTCAGACCCAGCCACTTAACCTATCTCTC  
GAGGACGACTGCAGCTGACTAGTGGCTTCCCAACAGGAGTCCCTTACCATGGCTCTC  
TGCACTCAGAGAGCCACTCCCACTGGTCCACAGCCCATCGAATGCACAGAGCTGGAC  
CTCGAAAAGTTTTCCAGCTCTGCCTCCTATCTGAGCTGAGACCTTGGGGGGAACACA  
GTCGAAAGCACTGGAGACAGGCTGGAGCTCAATGTGCCCTTTGAAGTCCAGCCCTTAA  
GC

WO 00/53758

PCT/US00/05841

Figure 128

MDCQENEYWDQWGRVTCQRCGPGQELSKDCGYGEGGDAYCTACFPFRYKSSWGHHRQ  
SCITCAVINRVQKVNCTATSNVCGDCLPRFYRKTRIGGLQDQECIPCTKQTPTSEVQC  
AFQLSLVEADAPTVPQEATLVALVSSLLVVFTLAFGLFFLYCKQFFNRHCQRTGGGL  
LQFEADKTAKEESLFPVPPSKETSQVSENIQTQPLNPILEDCCSSTSGFPTQESF  
TMASCTSESHSHVHSPICELELDLQKFSSASVTGAETLGGNTVESTGDRLELNVPFE  
VPSP

WO 00/53758

PCT/US00/05841

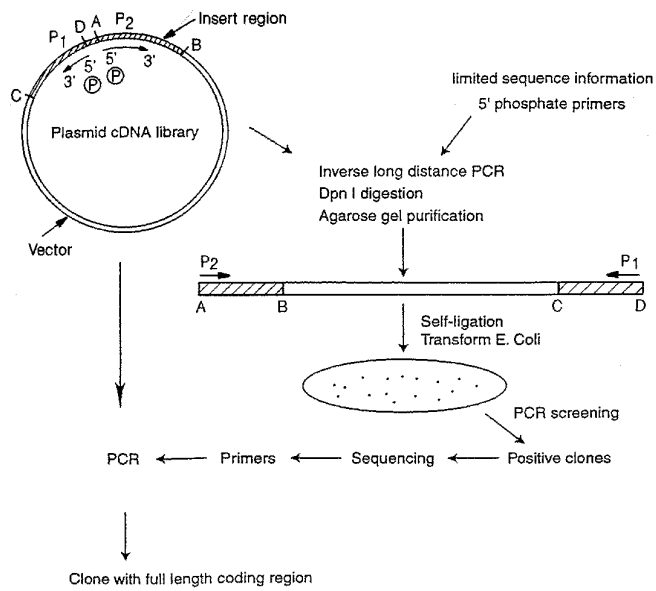


FIG. 129

133/133

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
14 September 2000 (14.09.2000)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 00/53758 A3

|                                           |                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                             |                               |    |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|----|
| (51) International Patent Classification: | C12N 15/12,<br>C07K 14/47, A61K 38/17, G01N 33/53, C12Q 1/68,<br>C12N 15/62, C07K 16/18 | PCT/US99/28313                                                                                                                                                                                                                                                              | 30 November 1999 (30.11.1999) | US |
|                                           |                                                                                         | PCT/US99/28409                                                                                                                                                                                                                                                              | 30 November 1999 (30.11.1999) | US |
| (21) International Application Number:    | PCT/US00/05841                                                                          | PCT/US99/28301                                                                                                                                                                                                                                                              | 1 December 1999 (01.12.1999)  | US |
| (22) International Filing Date:           | 2 March 2000 (02.03.2000)                                                               | PCT/US99/28634                                                                                                                                                                                                                                                              | 1 December 1999 (01.12.1999)  | US |
| (25) Filing Language:                     | English                                                                                 | PCT/US99/28551                                                                                                                                                                                                                                                              | 2 December 1999 (02.12.1999)  | US |
| (26) Publication Language:                | English                                                                                 | PCT/US99/28564                                                                                                                                                                                                                                                              | 2 December 1999 (02.12.1999)  | US |
|                                           |                                                                                         | PCT/US99/28565                                                                                                                                                                                                                                                              | 2 December 1999 (02.12.1999)  | US |
| (30) Priority Data:                       |                                                                                         | PCT/US99/30095                                                                                                                                                                                                                                                              | 16 December 1999 (16.12.1999) | US |
| PCT/US99/05028                            | 8 March 1999 (08.03.1999)                                                               | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| 60/123,618                                | 10 March 1999 (10.03.1999)                                                              | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| 60/123,957                                | 12 March 1999 (12.03.1999)                                                              | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| 60/125,775                                | 23 March 1999 (23.03.1999)                                                              | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| 60/128,849                                | 12 April 1999 (12.04.1999)                                                              | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| PCT/US99/08615                            | 20 April 1999 (20.04.1999)                                                              | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| 60/131,445                                | 28 April 1999 (28.04.1999)                                                              | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| 60/132,371                                | 4 May 1999 (04.05.1999)                                                                 | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| 60/134,287                                | 14 May 1999 (14.05.1999)                                                                | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| PCT/US99/12252                            | 2 June 1999 (02.06.1999)                                                                | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| 60/141,037                                | 23 June 1999 (23.06.1999)                                                               | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| 60/144,758                                | 20 July 1999 (20.07.1999)                                                               | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| 60/145,698                                | 26 July 1999 (26.07.1999)                                                               | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| 60/146,222                                | 28 July 1999 (28.07.1999)                                                               | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| PCT/US99/20111                            | 1 September 1999 (01.09.1999)                                                           | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| PCT/US99/20594                            | 8 September 1999 (08.09.1999)                                                           | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| PCT/US99/20944                            | 13 September 1999 (13.09.1999)                                                          | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| PCT/US99/21090                            | 15 September 1999 (15.09.1999)                                                          | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| PCT/US99/21547                            | 15 September 1999 (15.09.1999)                                                          | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| PCT/US99/23089                            | 5 October 1999 (05.10.1999)                                                             | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| 60/162,506                                | 29 October 1999 (29.10.1999)                                                            | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
| PCT/US99/28214                            | 29 November 1999 (29.11.1999)                                                           | US                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |    |
|                                           |                                                                                         | PCT/US00/00219                                                                                                                                                                                                                                                              | 5 January 2000 (05.01.2000)   | US |
|                                           |                                                                                         | PCT/US00/00277                                                                                                                                                                                                                                                              | 6 January 2000 (06.01.2000)   | US |
|                                           |                                                                                         | PCT/US00/00376                                                                                                                                                                                                                                                              | 6 January 2000 (06.01.2000)   | US |
|                                           |                                                                                         | PCT/US00/03565                                                                                                                                                                                                                                                              | 11 February 2000 (11.02.2000) | US |
|                                           |                                                                                         | PCT/US00/04341                                                                                                                                                                                                                                                              | 18 February 2000 (18.02.2000) | US |
|                                           |                                                                                         | PCT/US00/04342                                                                                                                                                                                                                                                              | 18 February 2000 (18.02.2000) | US |
|                                           |                                                                                         | PCT/US00/04414                                                                                                                                                                                                                                                              | 22 February 2000 (22.02.2000) | US |
|                                           |                                                                                         | (71) Applicant (for all designated States except US): GENEN-<br>TECH, INC. (US/US); 1 DNA Way, South San Francisco,<br>CA 94080-4990 (US).                                                                                                                                  |                               |    |
|                                           |                                                                                         | (72) Inventors; and                                                                                                                                                                                                                                                         |                               |    |
|                                           |                                                                                         | (75) Inventors/Applicants (for US only): ASHKENAZI,<br>Avi, J. (US/US); 1456 Tarrytown Street, San Mateo, CA<br>94402 (US). BAKER, Kevin, P. (GB/US); 14006 Indian<br>Run Drive, Darnestown, MD 20878 (US). GODDARD,<br>Audrey (CA/US); 110 Congo Street, San Francisco, CA |                               |    |

[Continued on next page]

WO 00/53758 A3

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF IMMUNE RELATED DISEASES

MSLFGILLLSALAGQRQGTQAESNLSSKFQFSSNKEQNGVODPQHERIITVSTNGSIHS  
PRFPHYTPRNTVLVWRLVAEENVVQLTFDERFGLDEPDICKYDFVEVEEPSDGTIL  
GRWCGSGTVPKGQISKGNQIRIRFVSDEYFPSEPGHCIIHYNIIVMPQFTEAVSPSVLPSPA  
LPLDLLNNAITAFSTLEDLIRYLEPERWQLEDLRYRPTWQLLKAFVFGKSRVVDLNL  
LTEEVRLYSCTPRNFSVSIREELKRTDTIFWPGCLLVKRCGGNCACCLHNCNECCQVPSK  
VTKKYHEVLQLRPKTGVRGLHKS LTDVALEHHECDCVCRGSTGG

(57) Abstract: The present invention relates to a composition containing novel proteins and methods for the diagnosis and treatment of immune related diseases.



WO 00/53758 A3



- 94131 (US). GURNEY, Austin, L. [US/US]; 1 Debbie Lane, Belmont, CA 94002 (US). HEBERT, Caroline [US/US]; 1809 Vine Street, Berkeley, CA 94703 (US). HENZEL, William [US/US]; 3724 Southwood Drive, San Mateo, CA 94030 (US). KABAKOFF, Rhona, C. [BR/US]; 1084 Granada Drive, Pacifica, CA 94044 (US). LU, Yaomei [CN/US]; 1001 Continentals Way #206, Belmont, CA 94002 (US). PAN, James [CA/US]; 2705 Coronet Boulevard, Belmont, CA 94002 (US). PENNICA, Diane [US/US]; 2417 Hale Drive, Burlingame, CA 94010 (US). SHELTON, David, L. [US/US]; 5845 Clover Drive, Oakland, CA 94618 (US). SMITH, Victoria [AU/US]; 19 Dwight Road, Burlingame, CA 94010 (US). STEWART, Timothy, A. [US/US]; 465 Douglass Street, San Francisco, CA 94114 (US). TUMAS, Daniel [US/US]; 3 Rae Court, Orinda, CA 94563 (US). WATANABE, Colin, K. [US/US]; 128 Corliss Drive, Moraga, CA 94556 (US). WOOD, William, I. [US/US]; 35 Southdown Court, Hillsborough, CA 94010 (US). YAN, Minhong [CN/US]; 1910 Garden Drive #114, Burlingame, CA 94010 (US).
- (74) Agents: SVOBODA, Craig, G. et al.; Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— With international search report.
- (88) Date of publication of the international search report:  
8 February 2001
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| International Application No.<br>F / US 00/85841                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER<br>IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 A61K38/17 G01N33/53 C12Q1/68<br>C12N15/62 C07K16/18                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                |
| B. FIELDS SEARCHED<br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 C12N C07K C12Q G01N A61K                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                |
| Category *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                        |                                                                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No.                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | EP 0 679 716 A (MATSUBARA KENICHI ;OKUBO KOUSAKU (JP)) 2 November 1995 (1995-11-02) see passages relating to G006330 and the claims.<br>---                                                                                               | 22-42                                                                          |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | DATABASE EMBL - EMBEST HUM1 [Online] Entry/Acc.no. AA631149 31 October 1997 (1997-10-31) STRAUSBERG, R. ET AL.: "nq75h03.s1 NCI CGAP Pr22 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1158197 3', mRNA sequence." XP002113997 the whole document<br>--- | 22-31,41                                                                       |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | WO 98 01541 A (TULARIK INC) 15 January 1998 (1998-01-15) the whole document<br>---                                                                                                                                                        |                                                                                |
| -/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                           | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. |
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"B" document member of the same patent family</p> |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                |
| Date of the actual completion of the international search                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Date of mailing of the international search report                                                                                                                                                                                        |                                                                                |
| 4 August 2000                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 01.11.00                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eps nl,<br>Fax (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Authorized officer<br>Smalt, R                                                                                                                                                                                                            |                                                                                |

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
T/US 00/05841

## C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                  | Relevant to claim No.                         |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| A          | WO 98 24908 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC<br>;SEIBEL GEORGE (US); LI HAODONG (US))<br>11 June 1998 (1998-06-11)<br>the whole document<br>---                                                                         |                                               |
| A          | WO 96 27603 A (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS<br>INC) 12 September 1996 (1996-09-12)<br>the whole document<br>---                                                                                                       |                                               |
| A          | WO 98 11138 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC<br>;ZENG ZHI ZHEN (US); OLSEN HENRIK S (US))<br>19 March 1998 (1998-03-19)<br>the whole document<br>---                                                                    |                                               |
| P,X,<br>L  | WO 99 46281 A (BAKER KEVIN P ;CHEN JIAN<br>(US); GENENTECH INC (US); GURNEY AUSTIN ())<br>16 September 1999 (1999-09-16)<br>see whole document, particularly passages<br>relating to PRO200, and the claims.<br>--- | 1,2,9,<br>10,12,<br>22-42,44                  |
| P,X,<br>L  | WO 99 47677 A (GENENTECH INC)<br>23 September 1999 (1999-09-23)<br><br>the whole document<br>---                                                                                                                    | 1,2,9,<br>10,12,<br>19,<br>22-39,<br>41,42,44 |
| P,X        | WO 00 04183 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC<br>;RUBEN STEVEN M (US); YOUNG PAUL E (US))<br>27 January 2000 (2000-01-27)<br>the whole document<br>---                                                                   | 1,2,9,<br>12,<br>22-35,<br>39,41,42           |
| P,X        | WO 99 37671 A (NA SONGQING ;SONG HO YEONG<br>(US); DOU SHENSHEN (US); LILLY CO ELI ())<br>29 July 1999 (1999-07-29)<br>the whole document<br>---                                                                    | 1,2,9,<br>10,12,<br>19,<br>22-35,<br>39-42,44 |
| E          | WO 00 34474 A (ZYMOGENETICS INC)<br>15 June 2000 (2000-06-15)<br><br>the whole document<br>-----                                                                                                                    | 1,2,9,<br>10,12,<br>19,<br>22-35,<br>39-42,44 |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Int. application No.<br>PCT/US 00/05841 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                         |
| <small>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</small> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                         |
| 1. <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                                                  | <small>Claims Nos.:<br/>because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</small><br>Although claims 7-11, 44, and claim 43 in as far as it pertains to in vivo use, are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. |                                         |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                                                  | <small>Claims Nos.:<br/>because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:</small><br>see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210                                                                                    |                                         |
| 3. <input type="checkbox"/>                                                                                                                             | <small>Claims Nos.:<br/>because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</small>                                                                                                                                                                                                                       |                                         |
| <b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                         |
| <small>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</small>                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                         |
| 1. <input type="checkbox"/>                                                                                                                             | <small>As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</small>                                                                                                                                                                                                                       |                                         |
| 2. <input type="checkbox"/>                                                                                                                             | <small>As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</small>                                                                                                                                                                                                           |                                         |
| 3. <input type="checkbox"/>                                                                                                                             | <small>As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</small>                                                                                                                                                           |                                         |
| 4. <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                                                  | <small>No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</small><br>Claims 1-44, (all partially)                                                                                                               |                                         |
| <b>Remark on Protest</b>                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                         |
| <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                         |
| <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                         |

International Application No. PCT/US 00/05841

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

A meaningful search for the claims 1-8 was not possible due to the lack of disclosure of the (ant)agonist (lack of conciseness, clarity, support and disclosure, Art. 5 and 6 PCT). The search of said claim in respect of these (ant)agonists has been limited to (ant)agonistic antibodies against the polypeptide(s) of claim 1.

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

International Application No. PCT/US 00/05841

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## 1. Claims: Invention 1: claims: 1-44, all partially

Composition of PR0200 protein, agonist, antagonists, or fragment thereof, for the treatment of immune-related disorders, method for determining the presence of said protein with an antibody against it, methods for diagnosing an immune-related disease by comparing the expression level of the gene encoding said protein to a standard or by detecting the presence of said protein with an antibody, diagnostic kit, and method for identifying inhibitors of expression or activity of said gene/protein, purified proteins having at least 80% homology to PR0200 and nucleic acids having at least 80% homology to polynucleotides encoding said proteins, and use of said protein to affect the proliferation of T-lymphocytes or vascular permeability.

## 2. Claims: Inventions 2-64: claim 1-44, all partially

As invention 1, but limited to the respective proteins/nucleic acids encoding:

- PR0204,
- PR0212,
- PR0216,
- PR0226,
- PR0240,
- PR0235,
- PR0245,
- PR0172,
- PR0273,
- PR0272,
- PR0332,
- PR0526,
- PR0701,
- PR0361,
- PR0362,
- PR0363,
- PR0364,
- PR0356,
- PR0531,
- PR0533,
- PR01083,
- PR0865,
- PR0770,
- PR0769,
- PR0788,
- PR01114,
- PR01007,
- PR01184,
- PR01031,
- PR01346,
- PR01155,
- PR01250,
- PR01312,
- PR01192,

International Application No. PCT/US 00/05841

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

- PR01246,
- PR01283,
- PR01195,
- PR01343,
- PR01418,
- PR01387,
- PR01410,
- PR01917,
- PR01868,
- PR0205,
- PR021,
- PR0269,
- PR0344,
- PR0333,
- PR0381,
- PR0720,
- PR0866,
- PR0840,
- PR0982,
- PR0836,
- PR01159,
- PR01358,
- PR01325,
- PR01338,
- PR01434,
- PR04333,
- PR04302,
- PR04430, and
- PR05727.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

P US 00/05841

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)                                                                                                                                                   | Publication<br>date                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EP 0679716 A                              | 02-11-1995          | AU 8116494 A<br>CA 2153480 A<br>WO 9514772 A                                                                                                                                 | 13-06-1995<br>01-06-1995<br>01-06-1995                                                                                                                 |
| WO 9801541 A                              | 15-01-1998          | US 5874230 A<br>AU 3656497 A<br>US 5981250 A<br>US 6107074 A                                                                                                                 | 23-02-1999<br>02-02-1998<br>09-11-1999<br>22-08-2000                                                                                                   |
| WO 9824908 A                              | 11-06-1998          | AU 5383498 A<br>EP 0958366 A                                                                                                                                                 | 29-06-1998<br>24-11-1999                                                                                                                               |
| WO 9627603 A                              | 12-09-1996          | US 6066322 A<br>US 5721351 A<br>AU 718245 B<br>AU 5178396 A<br>CA 2214589 A<br>EP 0813538 A<br>JP 11501807 T<br>US 6066498 A<br>US 6084083 A                                 | 23-05-2000<br>24-02-1998<br>13-04-2000<br>23-09-1996<br>12-09-1996<br>29-12-1997<br>16-02-1999<br>23-05-2000<br>04-07-2000                             |
| WO 9811138 A                              | 19-03-1998          | AU 4268097 A                                                                                                                                                                 | 02-04-1998                                                                                                                                             |
| WO 9946281 A                              | 16-09-1999          | AU 3072199 A<br>AU 3075099 A<br>WO 9947677 A<br>AU 1532499 A<br>EP 1032667 A<br>WO 9927098 A<br>AU 3757099 A<br>WO 9954467 A<br>AU 1070399 A<br>EP 1025227 A<br>WO 9920756 A | 27-09-1999<br>11-10-1999<br>23-09-1999<br>15-06-1999<br>06-09-2000<br>03-06-1999<br>08-11-1999<br>28-10-1999<br>10-05-1999<br>09-08-2000<br>29-04-1999 |
| WO 9947677 A                              | 23-09-1999          | AU 3072199 A<br>AU 3075099 A<br>WO 9946281 A                                                                                                                                 | 27-09-1999<br>11-10-1999<br>16-09-1999                                                                                                                 |
| WO 0004183 A                              | 27-01-2000          | AU 4989399 A<br>AU 5212299 A<br>WO 0004140 A                                                                                                                                 | 07-02-2000<br>07-02-2000<br>27-01-2000                                                                                                                 |
| WO 9937671 A                              | 29-07-1999          | AU 2562199 A<br>EP 0984063 A                                                                                                                                                 | 09-08-1999<br>08-03-2000                                                                                                                               |
| WO 0034474 A                              | 15-06-2000          | AU 2167900 A                                                                                                                                                                 | 26-06-2000                                                                                                                                             |



## フロントページの続き

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | F I            | テーマコード (参考) |
|--------------------------|----------------|-------------|
| A 6 1 P 5/14             | A 6 1 P 3/10   | 4 C 0 8 4   |
| A 6 1 P 11/00            | A 6 1 P 5/14   | 4 C 0 8 5   |
| A 6 1 P 11/02            | A 6 1 P 11/00  | 4 H 0 4 5   |
| A 6 1 P 17/00            | A 6 1 P 11/02  |             |
| A 6 1 P 19/02            | A 6 1 P 17/00  |             |
| A 6 1 P 25/00            | A 6 1 P 19/02  |             |
| A 6 1 P 29/02            | A 6 1 P 25/00  |             |
| A 6 1 P 35/00            | A 6 1 P 29/02  |             |
| A 6 1 P 37/00            | A 6 1 P 35/00  |             |
| A 6 1 P 37/04            | A 6 1 P 37/00  |             |
| A 6 1 P 37/06            | A 6 1 P 37/04  |             |
| C 0 7 K 14/47            | A 6 1 P 37/06  |             |
| C 0 7 K 16/18            | C 0 7 K 14/47  |             |
| C 0 7 K 19/00            | C 0 7 K 16/18  |             |
| C 1 2 N 1/15             | C 0 7 K 19/00  |             |
| C 1 2 N 1/19             | C 1 2 N 1/15   |             |
| C 1 2 N 1/21             | C 1 2 N 1/19   |             |
| C 1 2 N 5/10             | C 1 2 N 1/21   |             |
| C 1 2 N 15/09            | C 1 2 P 21/02  | C           |
| C 1 2 P 21/02            | C 1 2 Q 1/68   | A           |
| C 1 2 Q 1/68             | G 0 1 N 33/15  | Z           |
| G 0 1 N 33/15            | G 0 1 N 33/50  | Z           |
| G 0 1 N 33/50            | G 0 1 N 33/53  | D           |
| G 0 1 N 33/53            | G 0 1 N 33/566 |             |
| G 0 1 N 33/566           | G 0 1 N 33/577 | B           |
| G 0 1 N 33/577           | C 1 2 N 15/00  | Z N A A     |
| // C 1 2 P 21/08         | C 1 2 N 5/00   | B           |
|                          | C 1 2 P 21/08  |             |

- (31)優先権主張番号 60/125,775  
(32)優先日 平成11年3月23日(1999.3.23)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 60/128,849  
(32)優先日 平成11年4月12日(1999.4.12)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 US9908615  
(32)優先日 平成11年4月20日(1999.4.20)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 60/131,445  
(32)優先日 平成11年4月28日(1999.4.28)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 60/132,371  
(32)優先日 平成11年5月4日(1999.5.4)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 60/134,287  
(32)優先日 平成11年5月14日(1999.5.14)  
(33)優先権主張国 米国(US)

- (31)優先権主張番号 US9912252  
(32)優先日 平成11年6月2日(1999.6.2)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/141,037  
(32)優先日 平成11年6月23日(1999.6.23)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/144,758  
(32)優先日 平成11年7月20日(1999.7.20)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/145,698  
(32)優先日 平成11年7月26日(1999.7.26)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/146,222  
(32)優先日 平成11年7月28日(1999.7.28)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 US9920111  
(32)優先日 平成11年9月1日(1999.9.1)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 US9920594  
(32)優先日 平成11年9月8日(1999.9.8)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 US9920944  
(32)優先日 平成11年9月13日(1999.9.13)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 US9921090  
(32)優先日 平成11年9月15日(1999.9.15)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 US9921547  
(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 US9923089  
(32)優先日 平成11年10月5日(1999.10.5)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/162,506  
(32)優先日 平成11年10月29日(1999.10.29)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 US9928214  
(32)優先日 平成11年11月29日(1999.11.29)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 US9928313  
(32)優先日 平成11年11月30日(1999.11.30)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 US9928409  
(32)優先日 平成11年11月30日(1999.11.30)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 US9928301  
(32)優先日 平成11年12月1日(1999.12.1)  
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 US9928634  
(32)優先日 平成11年12月1日(1999.12.1)

(33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 US9928551  
 (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 US9928564  
 (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 US9928565  
 (32)優先日 平成11年12月2日(1999.12.2)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 US9930095  
 (32)優先日 平成11年12月16日(1999.12.16)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 US9930999  
 (32)優先日 平成11年12月20日(1999.12.20)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 US9931274  
 (32)優先日 平成11年12月30日(1999.12.30)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 US0000219  
 (32)優先日 平成12年1月5日(2000.1.5)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 US0000277  
 (32)優先日 平成12年1月6日(2000.1.6)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 US0000376  
 (32)優先日 平成12年1月6日(2000.1.6)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 US0003565  
 (32)優先日 平成12年2月11日(2000.2.11)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 US0004341  
 (32)優先日 平成12年2月18日(2000.2.18)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 US0004342  
 (32)優先日 平成12年2月18日(2000.2.18)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 US0004414  
 (32)優先日 平成12年2月22日(2000.2.22)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

U N I X

- (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 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 110
- (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 ヘベール, キャロライン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94703, バークリー, ヴィン ストリート 1809
- (72)発明者 ヘンゼル, ウィルアム  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94030, サン マテオ, サウスウッド ドライブ 3724
- (72)発明者 カバコフ, ローナ, シー.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94044, パシフィカ, グラナダ ドライブ 1084
- (72)発明者 ルー, ヤンメイ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404, フォスター シティ, ハドドック ストリート 921
- (72)発明者 パン, ジェームズ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002, ベルモント, コロネット ブールバード 2705
- (72)発明者 ペニカ, ダイアン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリンゲーム, ヘール ドライブ 2417
- (72)発明者 シェルトン, デイビッド, エル.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94618, オークランド, クローバー ドライブ 5845
- (72)発明者 スミス, ビクトリア  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリンゲーム, ドゥワイト ロード 19
- (72)発明者 ステュアート, ティモシー, エー.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94114, サンフランシスコ, ダグラス ストリート 465
- (72)発明者 テュマス, ダニエル  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94564, オリンダ, レイ コート 3
- (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
- (72)発明者 ヤン, ミンホン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリンゲーム, ガーデン ドライブ 114番 1910

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 BB10 BB14 BB24 BB41 BB46 BB50 CB01  
CB17 DA13 DA36 FA20 FB02 FB03 FB08  
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA07 CA09 CA20 DA02 DA06 DA12  
EA04 FA02 GA11 HA11  
4B063 QA01 QA19 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR56  
QR62 QS16 QS25 QS34 QX02 QX10  
4B064 AG01 AG27 CA02 CA06 CA10 CA19 CA20 CC01 CC24 DA01  
DA13  
4B065 AA26X AA58X AA72X AA90X AA93X AA93Y AB01 AC14 AC20 BA02  
BA30 CA24 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA14 BA01 CA18 CA53 ZB012



|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用于治疗免疫相关疾病的组合物和方法                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2004516227A</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 公开(公告)日 | 2004-06-03 |
| 申请号            | JP2000603379                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 申请日     | 2000-03-02 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 健泰科生物技术公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | Genentech公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |            |
| [标]发明人         | アシュケナジアヴィジェイ<br>ベーカーケヴィンピー<br>ゴダードオードリー<br>ガーニーオースティンエル<br>ヘパールキャロライン<br>ヘンゼルウィリアム<br>カバコフローナシー<br>ルーヤンメイ<br>パンジェームズ<br>ペニカダイアン<br>シェルトンデイビッドエル<br>スミスビクトリア<br>ステュアートティモシーエー<br>テュマスダニエル<br>ワタナベコリンケー<br>ウッドウィリアムアイ<br>ヤンミンホン                                                                                                                                                               |         |            |
| 发明人            | アシュケナジ,アヴィ,ジェイ.<br>ベーカー,ケヴィン,ピー.<br>ゴダード,オードリー<br>ガーニー,オースティン,エル.<br>ヘパール,キャロライン<br>ヘンゼル,ウィリアム<br>カバコフ,ローナ,シー.<br>ルー,ヤンメイ<br>パン,ジェームズ<br>ペニカ,ダイアン<br>シェルトン,デイビッド,エル.<br>スミス,ビクトリア<br>ステュアート,ティモシー,エー.<br>テュマス,ダニエル<br>ワタナベ,コリン,ケー.<br>ウッド,ウィリアム,アイ.<br>ヤン,ミンホン                                                                                                                              |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/50 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P11/00<br>A61P11/02 A61P17/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/02 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/04 A61P37<br>/06 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15<br>/09 C12N15/10 C12N15/12 C12N15/62 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53<br>G01N33/566 G01N33/577 |         |            |
| CPC分类号         | A61K38/00 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/02 A61P17/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/02 C07K14<br>/4703 C07K14/70578 C07K16/18 C12N15/10 C12N2799/026 C12Q1/686 C12Q2531/113 C12Q2521<br>/331                                                                                                                                                                                                        |         |            |

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FI分类号     | A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P11/00<br>A61P11/02 A61P17/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/02 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/04 A61P37<br>/06 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A<br>G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/577.B C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B<br>C12P21/08                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB24 2G045/BB41 2G045<br>/BB46 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA20 2G045/FB02<br>2G045/FB03 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024<br>/CA09 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11<br>4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063<br>/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34<br>4B063/QX02 4B063/QX10 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064<br>/CA19 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA58X<br>4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20<br>4B065/BA02 4B065/BA30 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA14 4C084<br>/BA01 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/ZB012 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD63 4C085/DD86<br>4C085/DD88 4C085/EE03 4C085/FF20 4C085/GG02 4C085/GG10 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045<br>/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50<br>4H045/FA72 4H045/FA74 |
| 优先权       | 09/905028 1999-03-08 US<br>60/123618 1999-03-10 US<br>60/123957 1999-03-12 US<br>60/125775 1999-03-23 US<br>60/128849 1999-04-12 US<br>09/908615 1999-04-20 US<br>60/131445 1999-04-28 US<br>60/132371 1999-05-04 US<br>60/134287 1999-05-14 US<br>09/912252 1999-06-02 US<br>60/141037 1999-06-23 US<br>60/144758 1999-07-20 US<br>60/145698 1999-07-26 US<br>60/146222 1999-07-28 US<br>09/920111 1999-09-01 US<br>09/920594 1999-09-08 US<br>09/920944 1999-09-13 US<br>09/921090 1999-09-15 US<br>09/921547 1999-09-15 US<br>09/923089 1999-10-05 US<br>60/162506 1999-10-29 US<br>09/928214 1999-11-29 US<br>09/928313 1999-11-30 US<br>09/928409 1999-11-30 US<br>09/928301 1999-12-01 US<br>09/928634 1999-12-01 US<br>09/928551 1999-12-02 US<br>09/928564 1999-12-02 US<br>09/928565 1999-12-02 US<br>09/930095 1999-12-16 US<br>09/930999 1999-12-20 US<br>09/931274 1999-12-30 US<br>0000219 2000-01-05 US<br>0000277 2000-01-06 US<br>0000376 2000-01-06 US<br>0003565 2000-02-11 US                                                                                                                                                                                     |

0004341 2000-02-18 US  
0004342 2000-02-18 US  
0004414 2000-02-22 US

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)  
含有新蛋白质的组合物技术领域本发明涉及含有新蛋白质的组合物和免疫相关疾病的诊断和治疗方法。