

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 501087

(P2003 - 501087A)

(43)公表日 平成15年1月14日 (2003.1.14)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		39/395	E 4 B 0 2 4
39/395			T 4 B 0 6 3
		45/00	4 B 0 6 4
45/00		A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 5

審査請求 有 予備審査請求 (全200数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 502580(P2001 - 502580)

(86) (22)出願日 平成12年5月15日 (2000.5.15)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月10日 (2001.12.10)

(86)国際出願番号 PCT/US00/13358

(87)国際公開番号 W000/075317

(87)国際公開日 平成12年12月14日 (2000.12.14)

(31)優先権主張番号 60/138,385

(32)優先日 平成11年6月9日 (1999.6.9)

(33)優先権主張国 米国 (US)

(31)優先権主張番号 60/144,790

(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)

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

(72)発明者 ボツタイン, デーヴィッド, エー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002,
ベルモント サマセット ドライブ 2539

(72)発明者 ゴッダード, 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

(74)代理人 弁理士 園田 吉隆 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 腫瘍の治療のための組成物と方法

(57)【要約】

本発明は、ヒトを含む哺乳類における腫瘍性細胞の成長及び増殖の診断と治療についての組成物及び方法に関する。本発明は、腫瘍細胞のゲノムにおいて増幅する遺伝子の同定に基づいている。このような遺伝子増幅は、同じ組織型の正常細胞に比べて遺伝子産物の過剰発現に関連しており、腫瘍形成の一因であると予想される。従って、増幅遺伝子によってコードされているタンパク質は、ある癌の診断及び/治療 (予防を含む) にとって有用な標的であると考えられ、腫瘍治療の予後の予測指標となりうる。本発明は、新規ポリペプチド及びこれらのポリペプチドをコードする核酸分子に関する。また、ここにおいて提供されているのは、これらの核酸分子、異種ポリペプチド配列へ融合している本発明のポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチド、本発明のポリペプチドと結合する抗体を含んでなるベクター及び宿主細胞、そして本発明のポリペプチドを生産する方法である。

MRRRLWLGLWLLARAPDAAGTSPASRGPRSPHLEGDVRWRRLFSSTHFFLRVDPGGRVQCTRWRRHGQD
SILEIRSVHVGVVVVIKAVSSGFYVAMNRRGRLYGSRLYTVDCRFRERIEENGHNTYASQRWRRRGQPMFLA
LDRRGPRPFGGRTRRYHLSAHFLFVLVS

シグナルペプチド: アミノ酸 1-17

N-ミリストイル化部位: アミノ酸 22-28

【特許請求の範囲】

【請求項1】 PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドに結合する単離された抗体。

【請求項2】 前記ポリペプチドへ特異的に結合する請求項1の抗体。

【請求項3】 前記ポリペプチドを発現する細胞の死を誘導する請求項1の抗体。

【請求項4】 前記細胞が、同じ組織型の正常細胞と比較して前記ポリペプチドを過剰発現する癌細胞である、請求項3の抗体。

【請求項5】 モノクローナル抗体である請求項1の抗体。

【請求項6】 非ヒト相補性決定部位(CDR)又は枠組み構造領域(FR)を含む請求項5の抗体。

【請求項7】 標識された請求項1の抗体。

【請求項8】 抗体断片又は一本鎖抗体である、請求項1の抗体。

【請求項9】 製薬的に許容可能な担体との混合である請求項1の抗体を含む製造品。

【請求項10】 前記抗体の治療的有効量を含む請求項9の製品。

【請求項11】 細胞毒性又は化学療法薬剤を更に含む請求項9の製造品。

【請求項12】 請求項1の抗体をコードする単離された核酸分子。

【請求項13】 請求項12の核酸分子を含んでなるベクター。

【請求項14】 請求項13のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項15】 PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドに結合する抗体を生産する方法であって、前記抗体の発現を可能にならしめるのに十分な条件下で請求項14の宿主細胞を培養すること、及び細胞培養からの前記抗体を回収することを含んでなる前記の方法。

【請求項16】 PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO742

2, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドのアンタゴニスト。

【請求項17】 腫瘍細胞の成長を阻害する請求項16のアンタゴニスト。

【請求項18】 PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチド、又はその補体をコードする核酸配列とハイブリッドダイゼーションする単離された核酸分子。

【請求項19】 前記ハイブリッドダイゼーションが緊縮ハイブリッドダイゼーション及び洗浄条件下で生じる請求項18の単離された核酸分子。

【請求項20】 PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドが含まれると思われる試料より、前記ポリペプチドの存在を確定する方法であって、この試料を抗-PRO5800, 抗-PRO6000, 抗-PRO6016, 抗-PRO6018, 抗-PRO6496, 抗-PRO7154, 抗-PRO7170, 抗-PRO7422, 抗-PRO7431, 又は抗-PRO7476抗体へ曝露し、前記試料における前記抗体の前記ポリペプチドへの結合を確定することを含んでなる方法。

【請求項21】 前記試料がPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドを含むと思われる細胞を含む、請求項20の方法。

【請求項22】 前記細胞が癌細胞である、請求項21の方法。

【請求項23】 (a) 哺乳類から得た組織細胞の試験試料、及び(b) 同細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料から、PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを検出することを含んでなり、コントロール試料と比較して試験試料でのより高い発現レベルが試験組織細胞が得られた哺乳類における腫瘍の存在を示す、哺乳類における腫瘍を診断する方法。

【請求項24】 (a) 抗-PRO5800, 抗-PRO6000, 抗-PRO

6016, 抗-PRO6018, 抗-PRO6496, 抗-PRO7154, 抗-PRO7170, 抗-PRO7422, 抗-PRO7431, 又は抗-PRO7476抗体を哺乳類から得られた組織細胞の試験試料と接触せしめること、及び(b)試験試料において、前記抗体とPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドの間で形成される複合体を検出することを含んでなり、複合体の形成が前記哺乳類における腫瘍の存在を示す、哺乳類における腫瘍を診断する方法。

【請求項25】 前記抗体が検出可能に標識されている、請求項24の方法

。

【請求項26】 前記試験試料が腫瘍細胞の成長又は増殖があると疑われる個人から得られた、請求項24の方法。

【請求項27】 抗-PRO5800, 抗-PRO6000, 抗-PRO6016, 抗-PRO6018, 抗-PRO6496, 抗-PRO7154, 抗-PRO7170, 抗-PRO7422, 抗-PRO7431, 又は抗-PRO7476抗体及び適切な包装体中の担体を含んでなる癌診断用キット。

【請求項28】 PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドが含まれると思われる試料における、これらポリペプチドの存在を検出するための前記抗体の使用に関する指示書をさらに含んでなる請求項27の癌診断用キット。

【請求項29】 PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドを発現する腫瘍細胞を、これらポリペプチドの生物学的活性を阻害する薬剤の有効量へ曝露することを含んでなり、それによって前記腫瘍細胞の成長が阻害される、腫瘍細胞の成長を阻害する方法。

【請求項30】 同じ組織型の正常細胞と比較して、前記腫瘍細胞が前記ポリペプチドを過剰発現する、請求項29の方法。

【請求項31】 前記薬剤が抗-PRO5800, 抗-PRO6000, 抗-PRO6016, 抗-PRO6018, 抗-PRO6496, 抗-PRO7154, 抗-PRO7170, 抗-PRO7422, 抗-PRO7431, 又は抗-PRO7476抗体である、請求項29の方法。

【請求項32】 前記抗-PRO5800, 抗-PRO6000, 抗-PRO6016, 抗-PRO6018, 抗-PRO6496, 抗-PRO7154, 抗-PRO7170, 抗-PRO7422, 抗-PRO7431, 又は抗-PRO7476抗体が細胞死を誘導する、請求項31の方法。

【請求項33】 前記腫瘍細胞が更に放射線治療、細胞毒性薬剤又は化学療法剤へ曝露される、請求項29の方法。

【請求項34】 PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドを発現する腫瘍細胞を、これらポリペプチドの発現を阻害する薬剤の有効量へ曝露することを含んでなり、それによって前記腫瘍細胞の成長が阻害される、腫瘍細胞の成長を阻害する方法。

【請求項35】 同じ組織型の正常細胞と比較して、前記腫瘍細胞が前記ポリペプチドを過剰発現する、請求項34の方法。

【請求項36】 前記薬剤が、PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチド又はその補体をコードする核酸とハイブリダイゼーションするアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項34の方法。

【請求項37】 前記腫瘍細胞が更に放射線治療、細胞毒性薬剤又は化学療法剤へ曝露される、請求項36の方法。

【請求項38】 組成物は腫瘍細胞の成長の阻害に有効であり、容器上のラベルは組成物が、同じ組織型の正常細胞と比較して前記腫瘍細胞において、PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はP

RO7476ポリペプチドの過剰発現で特徴付けられる症状に対して効果的であることを示す、容器；

前記容器上のラベル；及び

前記容器内に収容された活性薬剤を含む組成物を含んでなる製造物品。

【請求項39】 前記活性薬剤が、PRO5800，PRO6000，PRO6016，PRO6018，PRO6496，PRO7154，PRO7170，PRO7422，PRO7431又はPRO7476ポリペプチドの生物学的活性及び/又は発現を阻害する、請求項38の製造物品。

【請求項40】 前記活性薬剤が、抗-PRO5800，抗-PRO6000，抗-PRO6016，抗-PRO6018，抗-PRO6496，抗-PRO7154，抗-PRO7170，抗-PRO7422，抗-PRO7431，又は抗-PRO7476抗体である、請求項39の製造物品。

【請求項41】 前記活性薬剤がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項39の製造物品。

【請求項42】 候補化合物とPRO5800，PRO6000，PRO6016，PRO6018，PRO6496，PRO7154，PRO7170，PRO7422，PRO7431又はPRO7476ポリペプチドを、両構成物が相互作用できる、及び前記ポリペプチドの生物学的又は免疫学的活性が阻害されるか否かを確定するための条件下及び十分な時間に渡って、候補化合物と前記ポリペプチドを接触せしめることを含んでなる、前記ポリペプチドの生物学的又は免疫学的活性を阻害する化合物を同定する方法。

【請求項43】 前記候補化合物が抗-PRO5800，抗-PRO6000，抗-PRO6016，抗-PRO6018，抗-PRO6496，抗-PRO7154，抗-PRO7170，抗-PRO7422，抗-PRO7431，又は抗-PRO7476抗体である、請求項42の方法。

【請求項44】 前記候補化合物又はPRO5800，PRO6000，PRO6016，PRO6018，PRO6496，PRO7154，PRO7170，PRO7422，PRO7431又はPRO7476ポリペプチドが固体支持体へ固定された、請求項42の方法。

【請求項45】 非固定化構成物が検出可能に標識された、請求項44の方法。

【請求項46】 (a) PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドによって誘導される細胞応答の誘導に適した条件下で、細胞とスクリーニングされるべき候補化合物を前記ポリペプチドの存在下で接触せしめること、及び(b)試験化合物が有効なアンタゴニストであるか否かを確定するために前記細胞応答の誘導を確定することの段階を含んでなり、前記細胞応答の誘導の欠如が前記化合物が有効なアンタゴニストであることを示す、前記ポリペプチドの活性を阻害する化合物を同定する方法。

【請求項47】 PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドを発現する細胞を、前記ポリペプチドの発現を阻害する候補化合物と接触させ、前記ポリペプチドの発現が阻害されるか否かを確定することを含む、前記ポリペプチドを発現する細胞内において前記ポリペプチドの発現を阻害する化合物を同定する方法。

【請求項48】 前記候補化合物がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項47の方法。

【請求項49】 Fig2(配列番号:2), Fig4(配列番号:4), Fig6(配列番号:6), Fig8(配列番号:8), Fig10(配列番号:10), Fig12(配列番号:12), Fig14(配列番号:14), Fig16(配列番号:16), Fig18(配列番号:18), 及びFig20(配列番号:20)に示されたアミノ酸配列によって構成される群より選択された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50】 Fig1(配列番号:1), Fig3(配列番号:3), Fig5(配列番号:5), Fig7(配列番号:7), Fig9(配列番号:9), Fig11(配列番号:11), Fig13(配列番号:13), Fig15(配列番号:15)

, Fig17 (配列番号: 17), 及びFig19 (配列番号: 19) に示されたヌクレオチド配列によって構成される群から選択された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51】 Fig1 (配列番号: 1), Fig3 (配列番号: 3), Fig5 (配列番号: 5), Fig7 (配列番号: 7), Fig9 (配列番号: 9), Fig11 (配列番号: 11), Fig13 (配列番号: 13), Fig15 (配列番号: 15), Fig17 (配列番号: 17), 及びFig19 (配列番号: 19) に示されたヌクレオチド配列の全長コード化配列から構成される群から選択された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52】 ATCC受入番号PTA-124, PTA-383, PTA-553, PTA-481, PTA-520, PTA-548, PTA-552, PTA-551, PTA-619, 又はPTA-612の下へ寄託された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53】 請求項49ないし52のうちの何れかの1項の核酸を含んでなるベクター。

【請求項54】 ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識されるコントロール配列へ作用可能に結合している請求項53のベクター。

【請求項55】 請求項53のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項56】 宿主細胞がCHO細胞である、請求項55の宿主細胞。

【請求項57】 宿主細胞が大腸菌である、請求項55の宿主細胞。

【請求項58】 宿主細胞が酵母細胞である、請求項55の宿主細胞。

【請求項59】 宿主細胞がバキュロウイルス感染昆虫細胞である、請求項55の宿主細胞。

【請求項60】 PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドの発現に適した条件下で請求項55の宿主細胞を培養し、前記ポリペプチドを細胞培養から回収することを含んでなる前記ポリペプチドを生産する工程。

【請求項61】 Fig2（配列番号：2）, Fig4（配列番号：4）, Fig6（配列番号：6）, Fig8（配列番号：8）, Fig10（配列番号：10）, Fig12（配列番号：12）, Fig14（配列番号：14）, Fig16（配列番号：16）, Fig18（配列番号：18）, 及びFig20（配列番号：20）に示されたアミノ酸配列によって構成される群より選択されたアミノ酸配列と、少なくとも80%の核酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

【請求項62】 Fig2（配列番号：2）, Fig4（配列番号：4）, Fig6（配列番号：6）, Fig8（配列番号：8）, Fig10（配列番号：10）, Fig12（配列番号：12）, Fig14（配列番号：14）, Fig16（配列番号：16）, Fig18（配列番号：18）, 及びFig20（配列番号：20）に示されたアミノ酸配列によって構成される群より選択されたアミノ酸配列と比較し、少なくとも80%のポジティブをスコアする単離されたポリペプチド。

【請求項63】 ATCC受入番号PTA-124, PTA-383, PTA-553, PTA-481, PTA-520, PTA-548, PTA-552, PTA-551, PTA-619, 又はPTA-612の下へ寄託されたDNAの全長コード化配列によって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64】 異種アミノ酸配列に融合した請求項61ないし63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65】 前記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列である、請求項64のキメラ分子。

【請求項66】 前記異種アミノ酸配列が免疫グロブリンのFc領域である、請求項64のキメラ分子。

【請求項67】 請求項61ないし63のいずれか1項に記載のポリペプチドへ特異的に結合する抗体。

【請求項68】 前記抗体がモノクローナル抗体、ヒト化抗体又は一本鎖抗体である、請求項67の抗体。

【請求項69】 (a) Fig2（配列番号：2）, Fig4（配列番号：4）, Fig6（配列番号：6）, Fig8（配列番号：8）, Fig10（配列番号：10）

, Fig1 2 (配列番号: 1 2) , Fig1 4 (配列番号: 1 4) , Fig1 6 (配列番号: 1 6) , Fig1 8 (配列番号: 1 8) , 及びFig2 0 (配列番号: 2 0) に示されたポリペプチドをコードし、その結合シグナルペプチドを欠くヌクレオチド配列;

(b) Fig2 (配列番号: 2) , Fig4 (配列番号: 4) , Fig6 (配列番号: 6) , Fig8 (配列番号: 8) , Fig1 0 (配列番号: 1 0) , Fig1 2 (配列番号: 1 2) , Fig1 4 (配列番号: 1 4) , Fig1 6 (配列番号: 1 6) , Fig1 8 (配列番号: 1 8) , 及びFig2 0 (配列番号: 2 0) に示されたポリペプチドの細胞外ドメインをコードし、その結合シグナルペプチドをともなうヌクレオチド配列;又は

(c) Fig2 (配列番号: 2) , Fig4 (配列番号: 4) , Fig6 (配列番号: 6) , Fig8 (配列番号: 8) , Fig1 0 (配列番号: 1 0) , Fig1 2 (配列番号: 1 2) , Fig1 4 (配列番号: 1 4) , Fig1 6 (配列番号: 1 6) , Fig1 8 (配列番号: 1 8) , 及びFig2 0 (配列番号: 2 0) に示されたポリペプチドの細胞外ドメインをコードし、その結合シグナルペプチドを欠くヌクレオチド配列、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70】 (a) Fig2 (配列番号: 2) , Fig4 (配列番号: 4) , Fig6 (配列番号: 6) , Fig8 (配列番号: 8) , Fig1 0 (配列番号: 1 0) , Fig1 2 (配列番号: 1 2) , Fig1 4 (配列番号: 1 4) , Fig1 6 (配列番号: 1 6) , Fig1 8 (配列番号: 1 8) , 及びFig2 0 (配列番号: 2 0) に示されたポリペプチドで、その結合シグナルペプチドを欠くもの;

(b) Fig2 (配列番号: 2) , Fig4 (配列番号: 4) , Fig6 (配列番号: 6) , Fig8 (配列番号: 8) , Fig1 0 (配列番号: 1 0) , Fig1 2 (配列番号: 1 2) , Fig1 4 (配列番号: 1 4) , Fig1 6 (配列番号: 1 6) , Fig1 8 (配列番号: 1 8) , 及びFig2 0 (配列番号: 2 0) に示されたポリペプチドの細胞外ドメインで、その結合シグナルペプチドをともなうポリペプチド;又は

(c) Fig2 (配列番号: 2) , Fig4 (配列番号: 4) , Fig6 (配列番号: 6) , Fig8 (配列番号: 8) , Fig1 0 (配列番号: 1 0) , Fig1 2 (配列番号: 1 2) , Fig1 4 (配列番号: 1 4) , Fig1 6 (配列番号: 1 6) , Fig1 8

(配列番号：18)、及びFig20(配列番号：20)に示されたポリペプチドの細胞外ドメインで、その結合シグナルペプチドを欠くポリペプチド、と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、腫瘍の診断及び治療のための組成物及び方法に関する。

【0002】**(発明の背景)**

悪性腫瘍（癌）は、米国特許において心臓疾患に続き第2の主要な死亡原因である（Boring等，CA Cancer J. Clin.，43: 7 [1993]）。

癌は、正常な組織から誘導されて腫瘍実体を形成する異常な、又は腫瘍形成性の細胞数の増加、これらの腫瘍形成性腫瘍細胞による隣接組織の侵襲、及び最終的に血液やリンパ系を介して局所のリンパ節及び離間部位に拡散（転移）する悪性細胞の生成を特徴とする。癌性状態においては、正常細胞が成長しない条件下で細胞が増殖する。癌自体は、異なる侵襲及び攻撃性の程度で特徴付けられる広範な種々の形態で顕現する。

遺伝子発現の交互変化は制御不能な細胞成長及び脱分化に強く関連しており、全ての癌に共通する特徴である。或る種の良く研究されたゲノムが、通常は腫瘍抑制遺伝子と呼ばれ、正常には悪性細胞成長又は或る種の優性遺伝子、例えば悪性成長を促進するように作用するオンコジーンの過剰発現を防止するように作用する劣性遺伝子発現の現象を示すことが見出された。これらの遺伝子変化は、凝集して十分な腫瘍形成性フェノタイプを示す形質の幾つかが移入される原因であることが明らかとなった（Hunter，Cell 64: 1129 [1991]；Bishop，Cell 64: 235-248 [1991]）。

【0003】

癌細胞における良く知られた遺伝子（例えばオンコジーン）の過剰発現のメカニズムは遺伝子増幅である。これは、祖先細胞の染色体において特定遺伝子の多重コピーが生成されるプロセスである。このプロセスは、遺伝子を含む染色体の領域の計画性のない複製、次いで複製されたセグメントが染色体へ戻る再組換えを含む（Alitalo等，Adv. Cancer Res. 47: 235-281 [1986]）。遺伝子増幅に平行する遺伝子の過剰発現は、即ち作成されるコピーの数に比例すると考えられて

いる。

成長因子及び成長因子レセプターをコードするプロトオンコジーンは、乳癌を含む様々なヒトの悪性腫瘍の原因に重要な役割を担っていることが確認されている。例えば、表皮成長因子レセプター(EGFR)に関連した185-kdの膜貫通糖タンパク質レセプター(p185^{HER2}、HER2)をコードするヒトErbB2遺伝子(erbB2、her2としても知られている、又はc-erbB-2)は、ヒトの乳癌の約25%~30%で過剰発現されていることが見出されている(Slamon等, Science 235:177-182[1987]; Slamon等, Science 244:707-712[1989])。

【0004】

プロトオンコジーンの遺伝子増幅は、典型的には癌のより悪性の形態に含まれる事象であり、臨床的結果の予言者として作用しうることが報告されている(Scwab等, Genes Chromosomes Cancer 1, 181-193 [1990]; Alitalo等, 上掲)。

即ち、erbB2の過剰発現は、特に腋窩のリンパ節を含む一次疾患を持つ患者において、不完全な予後の前兆と共通して見なされており(Slamon等, [1987]及び[1989], 上掲; Ravdin及びChamness, Gene 159: 19-27 [1995]; 及びHynes及びStern, Biochem Biophys Acta 1198: 165-184 [1994])、ホルモン療法及びCMF(シクロホスファミド、メトトレキセート、及びフルオロウラシル)を含む化学治療薬に対する感受性又は耐性と関連付けられていた(Baselga等, Oncology 11 (3 Suppl 1): 43-48 [1997])。しかしながら、erbB2過剰発現と不完全な予後との関連にも関わらず、HER2-ポジティブな患者のタキサンでの処方に臨床的に反応する可能性は、HER2-ネガティブ患者の3倍も大きかった(上掲)。

組換えヒト化抗-erbB2(抗-HER2)モノクローナル抗体(マウス抗-erbB2抗体4D5のヒト化型、rhumaB HER2又はHerceptin(商品名)と呼ばれる)は、広範な従来の抗癌治療を受けたerbB2を過剰発現する転移性乳癌を持つ患者で臨床的に活性である(Baselga等, J. Clin. Oncol. 14: 737-744[1996])。

上記に照らして、遺伝子増幅に関連する腫瘍の診断及び治療に有用な新規な方法及び組成物を同定することに明らかな興味がある。

【0005】

(発明の概要)

1. 実施態様

本発明は、ヒトを含む哺乳動物における腫瘍細胞成長及び増殖の診断及び治療のための組成物及び方法に関する。本発明は、腫瘍細胞のゲノムにおいて増幅される遺伝子の同定に基づく。このような遺伝子増幅は、遺伝子産物の過剰発現を伴い、腫瘍形成に寄与すると予測される。従って、増幅された遺伝子にコードされるタンパク質は、或る種の癌の診断及び治療（予防を含む）に有用であると考えられ、腫瘍治療の予後の予言者として作用する。

一実施態様では、本発明は、ここでPRポリペプチドと命名されるポリペプチドに結合する単離された抗体に関する。一側面では、単離された抗体は、PROポリペプチドに特異的に結合する。他の側面では、抗体はPROポリペプチドを発現する細胞の死を誘導する。多くの場合、PROポリペプチドを発現する細胞は、当該ポリペプチドを同じ組織型の正常細胞に比較して過剰に発現する腫瘍細胞である。さらに他の側面では、抗体はモノクローナル抗体であり、それは好ましくは非ヒトの相補性決定領域(CDR)及びヒトフレームワーク領域(FR)残基を有する。抗体はラベル化されてもよいし、固体支持体へ固定されてもよい。さらに他の側面では、抗体は抗体断片、一本鎖抗体、又はヒト化抗体であって、好ましくはPROポリペプチドに特異的に結合する。

【0006】

他の実施態様では、本発明は、製薬的に許容される担体と混合された、好ましくはPROポリペプチドに特異的に結合する抗体とを含む物質の組成物に関する。一側面では、この物質の組成物は抗体の治療的有効量を含有する。他の側面では、この組成物は、例えば更なる抗体又は細胞毒性又は化学治療薬であってよい更なる活性成分を含む。好ましくは、この組成物は無菌である。

さらなる実施態様では、本発明は、抗-PRO抗体をコードする単離された核酸分子、及びそのような核酸分子を含むベクター及び組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-PRO187、抗-PRO533、抗-PRO214、抗-PRO240、抗-PRO抗体の製造方法に関し、当該方法

は、その抗体をコードする核酸分子で形質転換した宿主細胞を当該抗体を発現させるのに十分な条件下で培養し、細胞培地から抗体を回収することを含んでなる。

さらに本発明は、PROポリペプチドの生物学的及び/又は免疫学的機能又は活性の一又は複数を阻害するPROポリペプチドのアンタゴニストに関する。

【0007】

さらなる実施態様では、本発明は、PROポリペプチド、又はその補体をコードする核酸配列にハイブリッド形成する単離された核酸分子に関する。単離された核酸分子は、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性ハイブリッド形成及び洗浄条件下で起こる。このような核酸分子は、ここで同定される増幅された遺伝子のアンチセンス分子として作用でき、また翻って各増幅遺伝子の転写及び/又は翻訳の調節において、又は増幅反応におけるアンチセンスプライマーとしての用途が見出される。さらに、このような配列は、リボザイム(ribozyme)及び/又は三重螺旋配列の一部として使用することができ、それは翻って増幅遺伝子の調節に置いて使用してもよい。

他の実施態様では、本発明は、PROポリペプチドを含有すると推測される試料中でPROポリペプチドの存在を測定する方法を提供し、当該方法は、当該試料を抗-PRO抗体に暴露し、当該抗体の試料中のPROポリペプチドへの結合を測定することを含んでなる。他の実施態様では、本発明は、細胞中でのPROポリペプチドの存在を測定する方法を提供し、当該方法は、当該細胞を抗-PRO抗体に曝露し、抗体の細胞への結合を測定することを含む。

【0008】

さらに他の実施態様では、本発明は、哺乳動物において腫瘍を診断する方法に関し、(a)哺乳動物から得た組織細胞の試験試料中、及び(b)同じ細胞型の知られた正常組織細胞の対照試料中における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んでなり、対照試料に比較した試験試料における高いレベルが、当該試験組織細胞を得た哺乳動物における腫瘍の存在を示す。

他の実施態様では、本発明は、哺乳動物において腫瘍を診断する方法に関し、

(a) 抗-P R O抗体を哺乳動物から得た組織細胞の試験試料と接触させ、そして(b) 抗-P R O抗体と試験試料中のP R Oポリペプチドとの間の複合体の形成を検出することを含んでなり、複合体の形成が前記哺乳動物における腫瘍の存在を示す。測定は定性的でも定量的でもよく、同じ細胞型の知られた正常組織細胞の対照試料における複合体形成の監視と比較して実施してもよい。試験試料中の複合体形成量の増加が、試験試料を得た哺乳動物における腫瘍の存在を示す。抗体は、好ましくは検出可能な標識を担持する。複合体形成は、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、又はこの分野で公知の他の技術によって監視できる。

試験試料は通常、腫瘍性細胞成長又は増殖(例えば癌性細胞)を有すると推測される個体から得る。

【0009】

他の実施態様では、本発明は、抗-P R O抗体及び担体(例えば緩衝液)を適切な包装内に含んでなる癌診断用キットに関する。このキットは、好ましくは当該抗体が、P R Oポリペプチドを含有することが推測される試料中のそれらの存在を検出するために用いられるという説明書を具備する。

さらに他の実施態様では、本発明は腫瘍細胞の成長を阻害する方法に関し、P R Oポリペプチドを発現する腫瘍細胞を、P R Oポリペプチドの生物学的及び/又は免疫学的活性及び/又は発現を阻害する薬剤の有効量に暴露することを含んでなり、それにより当該腫瘍細胞の成長が阻害される。この薬剤は、好ましくは抗-P R O抗体、小さな有機及び無機分子、ペプチド、リンペプチド、アンチセンス又はリボザイム分子、又は三重螺旋分子である。特別な態様では、薬剤、例えば抗-P R O抗体は細胞死を誘発する。さらなる態様では、腫瘍細胞には、放射線処理、細胞毒性薬又は化学治療薬がさらに施される。

さらなる実施態様では、本発明は、

容器；

当該容器上のラベル；及び

当該容器内に収容された活性剤を含有する組成物とを具備し、当該組成物が腫瘍細胞の成長を阻害するのに有効であり、容器上のラベルが当該組成物は前記腫

瘍細胞中で同じ組織型の正常細胞に比較してPROポリペプチドの過剰発現を特徴とする状態の治療に有効であることを表示する製造品に関する。特別な側面では、組成物中の活性剤は、PROポリペプチドの活性及び/又は発現を阻害する薬剤である。好ましい側面では、活性剤は抗-PRO抗体又はアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0010】

また本発明は、PRO1ポリペプチドの生物学的又は免疫学的活性を阻害する化合物を同定する方法を提供し、候補化合物をPROポリペプチドと、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、前記PROポリペプチドの生物学的及び/又は免疫学的活性が阻害されるか否かを測定することを含んでなる。他の態様では、非固定化成分が検出可能な標識を担持している。好ましい態様では、この方法は、(a)細胞とスクリーニングすべき候補化合物とを、PROポリペプチドの存在下で、PROポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ、そして(b)前記細胞性反応の誘発を測定して試験化合物が有効なアンタゴニストか否かを決定することを含んでなる。

他の実施態様では、本発明はPROポリペプチドを発現する細胞で前記ポリペプチドの発現を阻害する化合物を同定する方法を提供し、当該細胞を化合物と接触させ、前記PROポリペプチドの発現が阻害されるか否かを測定することを含んでなる。好ましい側面では、この方法は、(a)細胞とスクリーニングすべき候補化合物とを、PROポリペプチドの発現に適した条件下で接触させ、(b)前記ポリペプチド発現の阻害を測定する工程を具備する。

【0011】

B. 更なる実施態様

本発明の他の実施態様では、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んでなる単離された核酸分子を提供する。

一側面では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示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、ここに開示した膜貫通タンパク質の細胞外ドメインでシグナルペプチドを共なう又は共なわな

いもの、ここに開示した全長アミノ酸配列の任意の特異的に定義された断片、又は又は(b)(a)のDNA分子の補体に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、更により好ましくは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含んでなる。

【0012】

他の側面では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示された全長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全長PROポリペプチドcDNAのコード配列、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でシグナルペプチドを共なう又は共なわないもの、又はここに開示した全長アミノ酸配列の任意の特異的に定義された断片のコード化配列、又は(b)(a)のDNA分子の補体に対して、少なくとも約80%の配列同一性、あるいは少なくとも約81%の配列同一性、あるいは少なくとも約82%の配列同一性、あるいは少なくとも約83%の配列同一性、あるいは少なくとも約84%の配列同一性、あるいは少なくとも約85%の配列同一性、あるいは少なくとも約86%の配列同一性、あるいは少なくとも約87%の配列同一性、あるいは少なくとも約88%の配列同一性、あるいは少なくとも約89%の配列同一性、あるいは少なくとも約90%の配列同一性、あるいは少なくとも約91%の配列同一性、あるいは少なくとも約92%の配列同一性、

あるいは少なくとも約93%の配列同一性、あるいは少なくとも約94%の配列同一性、あるいは少なくとも約95%の配列同一性、あるいは少なくとも約96%の配列同一性、あるいは少なくとも約97%の配列同一性、あるいは少なくとも約98%の配列同一性、あるいは少なくとも約99%の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。

【0013】

さらなる側面では、本発明は、(a)ATCCへ寄託された任意のヒトタンパク質cDNAに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%の配列同一性、あるいは少なくとも約81%の配列同一性、あるいは少なくとも約82%の配列同一性、あるいは少なくとも約83%の配列同一性、あるいは少なくとも約84%の配列同一性、あるいは少なくとも約85%の配列同一性、あるいは少なくとも約86%の配列同一性、あるいは少なくとも約87%の配列同一性、あるいは少なくとも約88%の配列同一性、あるいは少なくとも約89%の配列同一性、あるいは少なくとも約90%の酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の配列同一性、あるいは少なくとも約92%の配列同一性、あるいは少なくとも約93%の配列同一性、あるいは少なくとも約94%の配列同一性、あるいは少なくとも約95%の配列同一性、あるいは少なくとも約96%の配列同一性、あるいは少なくとも約97%の配列同一性、あるいは少なくとも約98%の配列同一性、あるいは少なくとも約99%の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。

【0014】

その他の側面では、本発明は、膜貫通ドメイン欠損或いは膜貫通ドメイン不活化のどちらか、又はそのようなコード化配列へ相補的なPRO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、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ている。従って、ここにおいて記載されるPROポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考慮されている。

【0015】

その他の実施態様では、例えば、抗-PRO抗体の結合部位を含むポリペプチ

ドを選択的にコードするPROポリペプチドのコード化断片のためのハイブリダイゼーションプローブ、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使用を見出すことができるPROポリペプチドコード化配列の断片、又はその補体について向けられている。そのような核酸断片は、通常少なくとも約20ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約30ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約40ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約50ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約60ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約70ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約80ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約90ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約100ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約110ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約120ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約130ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約140ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約150ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約160ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約170ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約180ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約190ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約200ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約250ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約300ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約350ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約400ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約450ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約500ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約600ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約700ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約800ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約900ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約1000ヌクレオチド長であり、この文脈において「約」という語句は、引用されているヌクレオチド配列の長さのプラス又はマイナス10%を意味してゐる。PROポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規の断片は、任意の良く知られた配列アライメントプログラムを使用し、PROポリペプチドコード化ヌクレオチド配列と他の既知のヌクレオチド配列を整列させ、どのPROポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるのかを決定することによる日常的方法によって決定が可能であることは注目される。全てのそのようなPROポリペプチドコード化配列はが、本出願において検討される。さらに、検討されるのは、これらヌクレオチド配列断片によ

ってコードされているPROポリペプチド、好ましくは抗-PRO抗体の結合部位を含むこれらPROポリペプチド断片である。

【0016】

その他の実施態様では、本発明は、上文において特定された全ての単離された核酸配列によってコードされている単離されたPROポリペプチドを提供する。

ある側面においては、本発明は、ここに開示されている全長アミノ酸配列を有する全長PROポリペプチド、ここに開示されているシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示されているシグナルペプチドを伴う又は伴わない膜貫通PROポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示されている全長アミノ酸配列の全ての特異的に定義された断片に対して少なくとも約80%配列同一性、あるいは少なくとも約81%の配列同一性、あるいは少なくとも約82%配列同一性、あるいは少なくとも83%の配列同一性、あるいは少なくとも84%の配列同一性、あるいは少なくとも85%の配列同一性、あるいは少なくとも86%の配列同一性、あるいは少なくとも87%の配列同一性、あるいは少なくとも88%の配列同一性、あるいは少なくとも89%の配列同一性、あるいは少なくとも90%の配列同一性、あるいは少なくとも91%の配列同一性、あるいは少なくとも92%の配列同一性、あるいは少なくとも93%の配列同一性、あるいは少なくとも94%の配列同一性、あるいは少なくとも95%の配列同一性、あるいは少なくとも96%の配列同一性、あるいは少なくとも97%の配列同一性、あるいは少なくとも98%の配列同一性、あるいは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたPROポリペプチドに関する。

【0017】

さらなる側面においては、本発明は、ここに開示されたATCCへ寄託された全てのヒトタンパク質cDNAによってコードされているアミノ酸配列に対して少なくとも約80%配列同一性、あるいは少なくとも約81%の配列同一性、あるいは少なくとも約82%配列同一性、あるいは少なくとも83%の配列同一性、あるいは少なくとも84%の配列同一性、あるいは少なくとも85%の配列同一性、あるいは少なくとも86%の配列同一性、あるいは少なくとも87%の配列同一性、あるいは少なくとも88%の配列同一性、あるいは少なくとも89%

の配列同一性、あるいは少なくとも90%の配列同一性、あるいは少なくとも91%の配列同一性、あるいは少なくとも92%の配列同一性、あるいは少なくとも93%の配列同一性、あるいは少なくとも94%の配列同一性、あるいは少なくとも95%の配列同一性、あるいは少なくとも96%の配列同一性、あるいは少なくとも97%の配列同一性、あるいは少なくとも98%の配列同一性、あるいは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたPROポリペプチドに関する。

【0018】

さらなる側面においては、本発明は、ここに開示されている全長アミノ酸配列を有するPROポリペプチドのアミノ酸配列、ここに開示されているシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示されているシグナルペプチドを伴う又は伴わない膜貫通PROポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示されている全長アミノ酸配列の全ての特異的に定義された断片と比較して、少なくとも約80%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも約81%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも約82%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも83%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも84%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも85%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも86%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも87%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも88%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも89%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも90%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも91%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも92%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも93%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも94%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも95%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも96%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも97%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも98%の陽性(ポジティブ)、あるいは少なくとも99%の陽性(ポジティブ)のスコアのアミノ酸配列を含む単離されたPROポリペプチドに関する。

【0019】

特別な側面においては、本発明は、N-末端シグナル配列及び/又は開始メチ

オニンを含まず、前記に記載したようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされている単離されたPROポリペプチドを提供する。PROポリペプチドの発現に適した条件下にある適切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の培養、及びPROポリペプチドを培養細胞から回収することを含む工程である、単離されたPROポリペプチドを生産する工程が同じくここに開示されている。

その他の側面においては、本発明は、膜貫通ドメイン欠損又は膜貫通ドメイン不活性の単離されたPROポリペプチドを提供する。PROポリペプチドの発現に適した条件下にある適切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の培養、及びPROポリペプチドを培養細胞から回収することを含む工程である、単離されたPROポリペプチドを生産する工程が同じくここに開示されている。

【0020】

さらなるその他の実施態様においては、ここにおいて開示される天然PROポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストに関する。特別な実施態様においては、アゴニスト又はアンタゴニストは、抗-PRO抗体又は小分子である。

さらなる実施態様においては、PROポリペプチドを候補化合物と接触せしめ、そして前記PROポリペプチドによって仲介される生物活性を監視することを、含むPROポリペプチドに対するアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法に関する。好ましくは、PROポリペプチドは天然PROポリペプチドである。

さらにさらなる実施態様においては、本発明は、PROポリペプチド、又はここに開示されるPROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、抗-PRO抗体を含んでなる製造品で容器との組合せに関する。場合によっては、容器は、製薬的に許容しうるものである。

本発明のその他の実施態様は、PROポリペプチドの使用、又はPROポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニスト或いは抗-PRO抗体に対して反応性のある条件の治療に有効な薬剤の調製のための前文に記載したようなPROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-PRO抗体を対象としている。

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

【0021】

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

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

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

【0022】

(発明の詳細な説明)

I. 定義

「遺伝子増幅」及び「遺伝子複製」なる語句は交換可能に用いられ、遺伝子又は遺伝子断片の複数のコピーが特定の細胞又は細胞系で生成されるプロセスを意味する。複製された領域(増幅されたDNAの伸展)は、しばしば「単位複製配列」と呼ばれる。通常は、生成されるメッセンジャーRNA(mRNA)の量、即ち遺伝子発現レベルも、発現された特定遺伝子の作成されたコピー数に比例して増加する。

ここで用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍形成細胞

成長及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、腺癌、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより特定の例には、乳癌、前立腺癌、結腸癌、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸管癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、結腸直腸癌、子宮体癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝癌及び様々な種類の頭部及び頸部の癌が含まれる。

【0023】

「治療」とは、疾患の病理の進展阻止又は変更の本発明で実施される介入である。従って、「治療」は治療的処置及び予防的又は保護的手段の両方を指す。治療が必要なものは、既に疾患に罹っているもの並びに疾患が防止されるべきものを含む。腫瘍（例えば、癌）治療では、治療薬は直接的に腫瘍細胞の病理を低下させてもよいし、又は腫瘍細胞を他の治療媒介物、例えば放射線及び/又は化学治療に対してより敏感にしてもよい。

癌の「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、転移、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などを含む。

【0024】

治療の目的とされる「哺乳動物」は、哺乳類に分類される任意の動物を意味し、ヒト、家畜用及び農場用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジなどを含む。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

ここで用いられる「担体」は製薬的に許容される担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、それらは、用いられる用量及び濃度でそれ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る担体は、pH緩衝水溶液であることが多い。生理学的に許容される担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他

の有機酸バッファー；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）のポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；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、アルギニン又はリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノース又はデキストラン等の単糖類、二糖類及び他の炭水化物；EDTA等のキレート化剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の自己形成対イオン；及び/又はTWEEN(商品名)、ポリエチレングリコール(PEG)、及びPLURONICS(商品名)等の非イオン性界面活性剤を含む。

一又は複数のさらなる治療薬「と組み合わせて」の投与は、同時（一時）及び任意の順序での連続投与を含む。

ここで用いられる「細胞毒性薬」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意味する。この用語は、放射性同位体（例えば、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 及び Re^{186} ）、化学治療薬、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。

【0025】

「化学治療薬」は、癌の治療に有用な化合物である。化学治療薬の例は、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、例えばパクリタキセル（Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ）及びドキシセタキセル（Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）、トキシテール、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、ピンクリスチン、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）、5-FU、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、アクチノマイシンD、VP-16、クロランブシル、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など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。

【0026】

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意味する。即ち、成長阻害剤は、S期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、細胞周期を（S期以外の位置で）阻害する薬剤、例えばG1期停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ビンカス（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキソール、及びトポII阻害剤、例えばドキソルビシン、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期停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも溢流し、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、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、及びara-Cである。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, 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。

「ドキソルビシン」はアントラサイクリン抗生物質である。ドキソルビシンの完全な化学名は、(8S-シス)-10-[(3-アミノ-2,3,6-トリデオキシ-L-リキソヘキサピラノシル)オキシ]-7,8,9,10-テトラヒドロ-6,8,11-トリヒドロキシ-8-(ヒドロキシアセチル)-1-メトキシ-5,12-ナフトセンジオンである。

【0027】

「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、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- 及び- ；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- 等の神経成長因子；血小板成長因子；TGF- 及びTGF- 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- 、 - 、及び- 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、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- 及びTNF- ；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。

【0028】

本出願で使用される「プロドラッグ」という用語は、親薬物に比べて、腫瘍細胞に対する細胞毒性が低く、より活性な親形態に、酵素的に活性化又は転換され得る製薬的に活性な物質の先駆体又は誘導体形態を意味する。例えば、Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」, Biochemical Society Transactions, 14, pp.375-382, 615th Meeting Belfast(1986)及びStellaら, 「Prodrugs:A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」, Directed Drug Delivery, Borchardtら,(編), pp.247-267, Humana Press(1985)を参照。限定するものではないが、本発明のプロドラッグには、ホスファート含有プロドラッグ、チオホスファート含有プロドラッグ、スルファート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸変性プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、ラクタム含有プロドラッグ、任意に置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ

又は任意に置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、より活性のある細胞毒のない薬剤に転換可能な5-フルオロシトシン及び他の5-フルオロウリジンプロドラッグが含まれる。限定するものではないが、本発明で使用されるプロドラッグ形態に誘導体化可能な細胞障害剤の例には、前掲の化学療法剤が含まれる。

【0029】

ここに開示されるポリペプチド又はそのアゴニストの「有効量」とは、腫瘍性細胞成長、腫瘍成長に関しては、標的細胞の成長を或る程度阻害できる量である。この用語は、標的細胞の成長阻害、細胞分裂停止及び/又は細胞毒性効果及び/又はアポトーシスを誘起することのできる量を含む。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のためのPROポリペプチド又はそのアゴニストの「有効量」は、経験的に日常的手法で決定できる。

「治療的有效量」は、腫瘍の治療に関しては、次の効果：(1)遅延化及び完全な成長停止を含む、腫瘍成長の或る程度の阻害；(2)腫瘍細胞数の減少；(3)腫瘍サイズの縮小；(4)腫瘍細胞の末梢器官への浸潤の阻害(即ち、減少、遅延化又は完全な停止)；(5)転移の阻害(即ち、減少、遅延化又は完全な停止)；(6)抗腫瘍免疫反応の促進、これは、腫瘍の退行又は拒絶をもたらしてもよいが、必ずしも必要ではない；及び/又は(7)疾患に伴う徴候の1つ又は複数の或る程度の軽減の1つ又は複数誘起することのできる量を意味する。腫瘍の治療の目的のためのPROポリペプチド又はそのアゴニストの「治療的有效量」は、経験的に日常的手法で決定できる。

【0030】

PROポリペプチド又はそのアゴニストの「成長阻害量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の成長をインビトロ又はインビボで阻害できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のためのPROポリペプチド又はそのアゴニストの「成長阻害量」は、経験的に日常的手法で決定できる。

PROポリペプチド又はそのアゴニストの「細胞毒性量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞をインビトロ又はインビボで破壊できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のためのPROポリペプチド又はそのアゴニストの「細胞毒性量

」は、経験的に日常的手法で決定できる。

ここで使用される際の「PROポリペプチド」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）は、ここに記載する特定のポリペプチド配列を意味する。ここで使用される「PRO/数字ポリペプチド」及び「PRO/数字」は、天然配列ポリペプチド及び変異体（ここで更に詳細に定義する）を含む。この記載されるPROポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、組換え又は合成方法によって調製してもよい。

【0031】

「天然配列PROポリペプチド」は、天然由来の対応するPROポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでいる。このような天然配列PROポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生産することもできる。「天然配列PROポリペプチド」という用語には、特に、特定のPROポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。

本発明の種々の実施態様において、ここに開示されている天然配列PROポリペプチドは、添付の図面に示されている全長アミノ酸配列を含んでなる成熟又は全長天然配列ポリペプチドである。開始及び終止コドンは、図面に太字及び下線部で示されている。添付されている図面に開示されているPROポリペプチドは、図面のアミノ酸位置1と命名されているメチオニン残基から開始することが示されているが、図面のアミノ酸位置1より上流又は下流のどちらかに位置する他のメチオニン残基がPROポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いられてもよい。

【0032】

PROポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ECD」は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しないPROポリペプチドの形態を意味する。通常、PROポリペプチドECDは、それらの膜貫通及び/又は細胞質ドメインを1%未満

、好ましくはそのようなドメインを0.5%未満しか持たない。本発明のPROポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインのいずれかの末端から約5アミノ酸を越えない可能性が高い。従って、PROポリペプチド細胞外ドメインは、場合によっては、実施例又は明細書で同定されるように膜貫通ドメイン及び/又は細胞外ドメインの境界のいずれかの側から約5を越えないアミノ酸を含んでもよく、シグナルペプチドを伴う又は伴わない、それらのポリペプチド及びそれらをコードする核酸は、本発明で考慮される。

ここに開示する種々のPROポリペプチドの「シグナルペプチド」のおおよその位置は、添付の図面に示されている。しかし、注記するように、シグナルペプチドのC-末端境界は変化しうるが、ここで最初に定義したようにシグナルペプチドC-末端境界のいずれかの側で約5アミノ酸未満である可能性が最も高く、シグナルペプチドのC-末端境界は、そのような型のアミノ酸配列成分を同定するのに日常的に使用される基準に従って同定しうる(例えば、Nielsen等, *Prot. Eng.* 10: 1-6 (1997)及びvon Heinje等, *Nucl. Acids. Res.* 14: 4683-4690 (1986))。さらに、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナルペプチドの切断は完全に均一ではなく、一以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここに定義されるシグナルペプチドのC-末端境界の何れかの側の約5アミノ酸未満内で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

【0033】

「PROポリペプチド変異体」とは、上記又は下記に定義されるように、ここに開示される全長天然配列PROポリペプチド、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く全長天然配列PROポリペプチド配列、シグナルペプチド有無のここに開示されたPROの細胞外ドメイン又はここに開示された全長PROポリペプチドの他の断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する活性PROポリペプチドを意味する。このようなPROポリペプチド変異体には、例えば

、全長天然アミノ酸配列のN-又はC-末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたPROポリペプチドが含まれる。通常、PROポリペプチド変異体は、ここに開示される全長天然アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く全長天然配列PROポリペプチド配列、シグナルペプチド有無のここに開示されたPROの細胞外ドメイン又はここに開示された全長PROポリペプチドの他の断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有している。通常は、PRO変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、あるいは少なくとも約20アミノ酸長、あるいは少なくとも約30アミノ酸長、あるいは少なくとも約40アミノ酸長、あるいは少なくとも約50アミノ酸長、あるいは少なくとも約60アミノ酸長、あるいは少なくとも約70アミノ酸長、あるいは少なくとも約80アミノ酸長、あるいは少なくとも約90アミノ酸長、あるいは少なくとも約100アミノ酸長、あるいは少なくとも約150アミノ酸長、あるいは少なくとも約200アミノ酸長、あるいは少なくとも約300アミノ酸長、又はそれ以上である。

【0034】

ここに定義されるPROポリペプチドに対してここで同定されている「パーセ

ント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、PROポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegaAlign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて発生させ、ここでALIGN-2プログラムに対する完全なソースコードは以下の表1に提供される。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り作成され、以下の表1に示されたソースコードは、米国著作権庁、Washington D.C., 20559にユーザー資料と共に提出されており、米国著作権登録番号TXU510087で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社(South San Francisco, California)を通じて公的に利用でき、以下の表1に提供されるソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2プログラムはUNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされなければならない。全ての配列比較パラメータはALIGN-2プログラムにより設定され、変動しない。

【0035】

この目的において、付与されたアミノ酸配列Bに対する、Bとの、又はBに対抗する付与されたアミノ酸配列Aの%アミノ酸配列同一性(別に、付与されたアミノ酸配列Aが、付与されたアミノ酸配列Bに対する、Bとの、又はBに対抗する所定の%アミノ酸配列を有するか、又はこれを含むものとしても呼称することができる)は、次の式：

$$\text{分率 } X / Y \text{ の } 100 \text{ 倍}$$

により算出され、ここで、Xは、A及びBのプログラム整列において、配列整列

プログラムALIGN-2に同一符合するとスコアされたアミノ酸残基の数であり、YはBのアミノ酸残基の全数である。アミノ酸配列Aの長さはアミノ酸配列Bの長さとは等しくなく、Bに対するAの%アミノ酸配列同一性は、Aに対するBの%アミノ酸配列同一性とは等しくないと認識されるであろう。%アミノ酸配列同一性の算出例としては、図2A-2Bには、「PRO」と称されるアミノ酸配列に対する、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の%アミノ酸配列同一性の算出方法を示している。

特に記載しない場合は、ここで使用される全%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを使用して上述したようにして得られる。しかしながら、%アミノ酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschulら, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402(1997))を使用して決定することもできる。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードすることができる。NCBI-BLAST2はいくつかのサーチプログラムを使用しており、その全てのサーチパラメータは、例えばアンマスク=yes、ストランド=all、予測発生値=10、最低複雑長さ=15/5、マルチパス e値=0.01、マルチパス定数=25、最終間隙アラインメントのドロップオフ=25、スコアリングマトリクス=BLOSUM62を含むデフォルト値に設定される。

【0036】

アミノ酸配列比較においてNCBI-BLAST2が使用される状況では、付与されたアミノ酸配列Bに対する、Bとの、又はBに対抗する付与されたアミノ酸配列Aの%アミノ酸配列同一性(別に、付与されたアミノ酸配列Aが、付与されたアミノ酸配列Bに対する、Bとの、又はBに対抗する所定の%アミノ酸配列を有するか、又はこれを含むものとしても呼称することができる)は、次の式：

フラクシオンX/Yの100倍

により算出され、ここで、Xは、A及びBのプログラム整列において、配列整列プログラムNCBI-BLAST2に同一符合するとスコアされたアミノ酸残基の数であり、YはBのアミノ酸残基の全数である。アミノ酸配列Aの長さはアミノ酸配列Bの長さとは等しくなく、Bに対するAの%アミノ酸配列同一性は、Aに対するBの%アミノ酸配列同一性とは等しくないと認識されるであろう。

【0037】

さらに、%アミノ酸配列同一性はWU-BLAST-2コンピュータプログラム (Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)) を使用して決定することもできる。殆どのWU-BLAST-2サーチパラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する: オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値 (T) = 11、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62。ここでの目的のために、%アミノ酸配列同一性値は、(a) 天然PROポリペプチドから誘導された配列を有する関心ある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、関心あるPROポリペプチドが比較されるPROポリペプチド変異体であってもよい配列) との間の、WU-BLAST-2で決定された一致する同一アミノ酸残基の数を、(b) 関心あるPROポリペプチドの残基の総数で割ることにより決定される。例えば、「アミノ酸配列Bに対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する又は有しているアミノ酸配Aを含有するポリペプチド」という表示は、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。

【0038】

「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あり、ここに開示する全長天然配列PROポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた全長天然配列PROポリペプチド配列、シグナルペプチド有無のここに開示するPROポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する全長PROポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有する。通常は、PRO変異体ポリペプチドヌクレオチドは、ここに開示する全長天然配列PROポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた全長天然配列PROポリペプチド配列、シグナルペプチドを伴う又は伴わないここに開示するPROポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する全長PROポリペプチドの他の任意の断片をコードする核酸配列と、少なくとも約80%の核酸配列同一性、好ましくはあるいは少なくとも約81%

の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。

【0039】

通常は、PRO変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約30ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約60ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約90ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約120ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約150ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約180ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約210ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約240ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約270ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約300ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約450ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約600ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約900ヌクレオチド長、又はそれ以上である。

【0040】

ここで同定されるPRO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、PRO配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAS

T、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。しかしながら、ここにおける目的のために、パーセント(%)核酸配列同一性値は、下記に示されているように配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することで得られ、ALIGN-2プログラムのための完全なソースコードは表1に提供されている。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、表1に示したソースコードは米国著作権事務所、Washington D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下へ登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、South San Francisco, Californiaから好適に入手可能であり、また表1に与えたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0041】

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

分率 W/Z の100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチド数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた%核酸配列同一性の計算の例として、表2C-2Dは、「比較DNA」と称される核酸配列の「PRO-DNA」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法を示す。

【0042】

特に断らない限りは、ここでの全ての%核酸配列同一性値は上記のようにALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%核酸

配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2 (Altschul等, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)) を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードできる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパス e-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62を含む。

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

分率W / Zの100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチド数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

【0043】

さらに、%核酸配列同一性値は、WU-BLAST-2コンピュータプログラム (Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)) を用いて決定してもよい。殆どのWU-BLAST-2検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する: オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値 (T) = 11、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62。ここでの目的のために、%核酸配列同一性値は、(a)天然配列PROポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有する対象とするPROポリペプチドコード化配列の核酸配列と、対象とする比較核酸分子(即ち、対象とするPROポリペプチドコード化核酸分子の配列が比較される変異体ポリヌクレオチドであってもよい配列)との間の、WU-BLAST-2によ

って決定した一致する同一ヌクレオチドの数を、(b)対象とするPROポリペプチドコード化核酸のヌクレオチドの総数で除した商によって決定される。例えば、「核酸配列Bに対して少なくとも80%の核酸配列同一性を持つ又は持っている核酸配列Aを含んでなる単離された核酸分子」という表現では、核酸配列Aが対象とする比較核酸配列であり、核酸配列Bが対象とするPROポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

【0044】

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する核酸分子であり、好ましくは緊縮性ハイブリッド形成及び洗浄条件下で、添付している図面(figure)に示す全長PROポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリッド形成できる。PRO変異体ポリペプチドは、PRO変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

「陽性(ポジティブ)」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を含む。対象とするアミノ酸残基に対してポジティブ値のスコアとされるアミノ酸残基は、対象とするアミノ酸残基と同一であるか、又は対象とするアミノ酸残基の(下記の表3で特定するように)好ましい置換とされるものである。

【0045】

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

分率 X/Y の100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのアラインメントによってポジティブであるとのスコアのアミノ酸残基数であり、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%ポジティブは、BのAに対する%ポジティブとは異なることは理解されるであろう。

【0046】

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために使用するとき、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、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のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基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による均一性が得られるように十分なほど精製される。PROの自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、単離されたポリペプチドには、組換え細胞内のインサイト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。

【0047】

PROポリペプチドをコードしている「単離された」核酸分子、又は抗PRO抗体をコードしている「単離された」核酸分子は、同定され、ポリペプチド核酸の天然供給源に通常付随している少なくとも1つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。好ましくは、天然に付随するすべての組成物が無いものである。単離されたPROコード化核酸分子又は抗PROコード化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。従って、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在するPROコード化核酸分子又は抗PROコード化核酸分子とは区別される。しかし、PROポリペプチドをコードしている単離された核酸分子、又は抗PRO抗体をコードしている単離された核酸分子は、通常はPROポリペプチド又は抗PRO抗体を発現する細胞に包含されているPRO核酸分子又は抗PRO核酸分子を含み、その核酸分子は、例えば、核酸分子が天然の細胞のものとは異なった染色体位置にある。

【0048】

「コントロール配列」という表現は、特定の宿主生物において作用可能に結合されたコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に

好適な対照配列は、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「作用可能に結合され」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に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DNAに作用可能に結合されている；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されている；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されている。一般的に、「作用可能に結合される」とは、結合されたDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにある。しかし、エンハンサーは必ずしも近接しているわけではない。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、通常の手法にしたがって、合成された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。

【0049】

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、特に単一の抗PRO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)、及び多エピトープ特異性を持つ抗PRO抗体組成物を包含している。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称する、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量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。

ハイブリッド形成反応の「緊縮性」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度は低くなる。ハイブリッド形成は、一般的に、相補的鎖がその融点に近いがそれより低い環境に存在する場合における変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリッド形成可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い

相対温度は、反応条件をより緊縮性にするが、低い温度は緊縮性を低下させる。さらに、緊縮性は塩濃度に逆比例する。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ら、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

【0050】

ここで定義される「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0.015 Mの塩化ナトリウム/0.0015 Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2) ハイブリ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% (vol/vol) ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50 mMのpH 6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750 mMの塩化ナトリウム、75 mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；(3) 42 における50%ホルムアミド、5x SSC (0.75 MのNaCl、0.075 Mのクエン酸ナトリウム)、50 mMのリン酸ナトリウム (pH 6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5x デンハード液、超音波処理サケ精子DNA (50 µg/ml)、0.1% SDS、及び10%のデキストラン硫酸と、42 における0.2x SSC (塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム) 中の洗浄及び55 でのホルムアミド、次いで55 におけるEDTAを含む0.1x SSCからなる高緊縮性洗浄を用いるものによって同定される。

「中程度の緊縮性条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されているように同定され、上記の緊縮性より低い洗浄溶液及びハイブリッド形成条件 (例えば、温度、イオン強度及び% SDS) の使用を含む。中程度の緊縮性条件は、20%ホルムアミド、5x SSC (150 mMのNaCl、15 mMのクエン酸三ナトリウム)、50 mMリン酸ナトリウム (pH 7.6)、5x デンハード液、10%デキストラン硫酸、及び20 mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の37 での終夜インキュベーション、次いで1x SSC中37-50 でのフィルター洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長

などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識するであろう。

【0051】

「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、又はそれらのドメイン配列を含んでなるキメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープ、又は幾つかの他の試薬によって同定でき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、その長さは対象とする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の残基)を有する。

ここで意図している「活性な」及び「活性」とは、天然又は天然発生PROポリペプチドの生物学的及び/又は免疫学的活性を保持するPROの形態を意味し、「生物学的」活性とは、天然又は天然発生PROによって生ずる(阻害性又は刺激性の)生物学的機能であって、天然又は天然発生PROが有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力を除くものを意味し、「免疫学的」活性とは、天然又は天然発生PROが有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力を意味する。

【0052】

ここに開示されるスクリーニングアッセイによって同定できる抗体又は他のアンタゴニスト分子(例えば、有機又は無機小分子、ペプチド等)の文脈における「生物学的活性」は、それらの分子がここに同定される増幅された遺伝子にコードされるペプチドと結合又は複合体形成する能力、又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妨害する能力、又はPROポリペプチドの転写又は翻訳を妨害する能力を指す。好ましい生物学的活性は、標的細胞の成長阻害である。他の好ましい生物学的活性は、標的腫瘍細胞の死をもたらす細胞毒性活性である。

PROポリペプチドの文脈における「生物学的活性」という用語は、PROポ

リペプチドが腫瘍形成細胞成長又は制御されない細胞成長を誘発する能力を意味する。

【0053】

「免疫学的活性」という語は、PROポリペプチドの少なくとも1つのエピトープとの免疫学的交差反応性を意味する。

ここで用いられる「免疫学的交差反応性」とは、候補ポリペプチドが、この活性を持つPROポリペプチドの定性的生物学的活性を、周知の活性PROポリペプチドに対して生じたポリクローナル抗血清と競合的に阻害できることを意味する。そのような抗血清は、例えばヤギ又はウサギに、完全フロイントアジュバント中の周知の活性類似物を皮下注射し、次いで不完全フロイント中で腹膜内又は皮下に追加免疫することにより従来の方法で調製される。免疫学的交差反応性は好ましくは「特異的」であり、これは同定される免疫学的交差反応性分子（例えば抗体）の対応するPROポリペプチドに対する結合親和性が、その分子の他の任意の知られた天然ポリペプチドに対する結合親和性より有意に高い（好ましくは少なくとも約2倍、より好ましくは少なくとも約4倍、さらにより好ましくは少なくとも約8倍、最も好ましくは少なくとも約10倍高い）ことを意味する。

【0054】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然PROポリペプチドの生物学的活性又はその転写又は翻訳を全体的又は部分的に阻止、阻害、又は中和する任意の分子を含む。好適なアンタゴニスト分子は特に、アンタゴニスト抗体又は抗体断片、断片、ペプチド、有機小分子、アンチセンス核酸などを含む。PROポリペプチドのアンタゴニストの同定方法は、候補アンタ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。

「小分子」は、ここで約500ダルトン未満の分子量を有すると定義される。

「抗体」(Abs)及び「免疫グロブリン」(Igs)は同じ構造的特徴を持つ糖タンパク質である。抗体は特定の抗原に対する特異性を示すが、免疫グロブリンは抗体及び抗原特異性を持たない他の抗体様分子の両方を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えば、リンパ系によって低レベルで、ミエローマによって

向上したレベルで生産される。「抗体」という用語は最も広い意味で使用され、限定されることなく、無傷のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷の抗体から形成される多重特異的抗体（例えば二重特異的抗体）、及びそれらが所望の生物学的活性を有している限り抗体断片を包含する。

【0055】

「天然抗体」及び「天然免疫グロブリン」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖からなる、約150,000ダルトンの異種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架橋を有している。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。

【0056】

「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意味する。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(CDRs)と呼ばれる3つ又は4つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、CDRにより連結されたシート配置を主にとる4つ又5つのFR領域をそれぞれ含んでいる。各鎖のCDRは、FRにより近接して結合せしめられ、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabatら, NIH Publ. No.91-3242, Vol.1, 647-669頁[1991]を参照のこと)。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存

性細胞毒性活性への抗体の関与を示す。

【0057】

ここで使用される場合、「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合性を生じる抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)及び重鎖可変ドメインの31-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3); Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))又は「高頻度可変ループ」からの残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)及び重鎖可変ドメインの残基26-32(H1)、53-55(L2)及び96-101(L3); Chothia及びLesk J.Mol.Biol. 196:901-917 (1987))を含んでなる。「フレームワーク」又は「FR」残基はここに定義した高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0058】

「抗体断片」は、未変性の抗体の一部、好ましくは未変性の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片; ダイアボディ(diabody); 直鎖状抗体(Zapataら, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); 一本鎖抗体分子; 及び抗体断片から形成される多重特異的抗体を含む。

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれ、各々単一の抗原結合部位を持つ2つの同一な抗原結合断片、及び残りの「Fc」断片、その名称は容易に結晶化する能力を反映している、を生成する。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有するが、交差結合抗原であり得るF(ab')₂断片が生成される。

「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、緊密に非共有的に結合した1つの重鎖と1つの軽鎖の二量体からなる。この配置では、V_H-V_L二量体の表面における抗原結合部位を決定するために各可変領域の3つのCDRが相互作用する。正確には、6つのCDRが抗体に抗原結合特異性を与える。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原特異的な3つのC

DRしか含まないFvの半分)でさえも抗原を認識し結合する能力を持つが、結合部位全体よりは親和性が低い。

【0059】

また、Fab断片は軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)も含む。Fab断片は、抗体ヒンジ領域から、の1つ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ル末端における数個の残基の付加によりFab断片と相違する。Fab'-SHは、ここにおいて、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を持つFab'の記号である。F(ab')₂抗体断片は、元々、それら、の間にヒンジシステインを持つFab'断片の対として生成された。抗体断片の他の化学的結合も知ら、れている。

任意の種からの抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ()及びラムダ()と呼ばれる1つ又は2つの明らかに異なる型に分類できる。

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、免疫グロブリンは異なるクラスに分けられる。免疫グロブリンの5つの主要なクラス: IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMがあり、これらの幾つかは、更にサブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及びIgA2に分けられる。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、各々、 、 、 、及びμと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元配置は良く知られている。

【0060】

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意味する、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量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応する。更に、異なる決定基(エピトープ)に対応する異なる抗体を典型的に含む通常の(ポリクローナル)抗体とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原の単一の決定基に対応する。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優れている。「モノクローナル」

との形容は、実質的に均一な抗体集団から得られたという抗体の性質を示し、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、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、最初にKohler ほかによってネイチャー (256:495 (1975)) に掲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(例えば米国特許第4,816,567号を参照のこと)によって作ることができる。「モノクローナル抗体」は例えばClackson ら, (624-628 (1991)) 及びMarksら, (J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)) に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリから単離してもよい。

【0061】

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、鎖の残りの部分は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(Cabilly ら, 前掲; Morrison ほか, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984))。

【0062】

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断片(例えばF_v、F_ab、F_ab'、F_(a b')₂あるいは抗体の他の抗原結合配列)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(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(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのF_vフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでもよい。これらの変更は抗体の特性を更に洗練し、最適化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対

応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる。更なる詳細については、Jones ほか, Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann ら, Nature, 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992)を参照されたい。ヒト化抗体は、抗体の抗原結合領域が対象抗体でマカクザルを免疫化することにより生産された抗体から由来するプリマタイズしたPrimatized (商品名)抗体を含む。

【0063】

「一本鎖Fv」又は「sFv」抗体断片は抗体のV_H及びV_Lドメインを含み、これらのドメインは一本鎖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_H及びV_Lドメインの間にポリペプチドリンカーを更に含み、sFvを結合させて抗原結合に望ましい構造を形成してもよい。sFvの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol.113, Rosenberg and Mooreeds., Spring-Verlag, New York, pp.269-315 (1994)のPluckthunを参照されたい。

「ダイアボディ」なる用語は、2つの抗原結合部位を持つ小さな抗体断片を意味し、これらの断片は同じポリペプチド鎖中に軽鎖可変ドメイン(V_L)に結合した重鎖可変領域(V_H)を含む(V_H-V_L)。同じ鎖における2つのドメイン間に対を形成するには短すぎるリンカーを用いると、ドメインは他の鎖の相補的ドメインと強制的に対をなし、2つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディは、例えばEP404,097; WO 93/11161; 及び Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により完全に記載されている。

【0064】

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他の非タンパク質様物質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、(1)ローリー(Lowry)法に

よって決定した場合95重量%以上の、最も好ましくは99重量%の抗体まで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

【0065】

「標識」という語は、ここで用いられる場合、抗体に直接的又は間接的に結合して「標識化」抗体を生成する検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自身によって検出可能でもよく(例えば、放射性同位体標識又は蛍光標識)、あるいは、酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的変換を触媒してもよい。検出可能な標識として機能する放射性核種は、例えば、I-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、Re-186、At-211、Cu-67、Bi-212、及びPd-109を含む。また、標識は、毒素のような非検出可能な物質でも良い。

「固相」とは、本発明の抗体が接着できる非水性マトリクスを意味する。ここに包含される固相の例は、部分的又は全体的にガラス(例えば、孔の制御されたガラス)、ポリサッカリド(例えばアガロース)、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンで形成されたものを含む。或る実施態様では、前後関係に応じて、固相はアッセイ用プレートのウェル;その他では精製用カラム(例えばアフィニティクロマトグラフィカラム)を含むことができる。また、この用語は、米国特許第4,275,149号に記載されたような別々の粒子の不連続な固体相も含む。

【0066】

「リポソーム」は、哺乳動物への薬物(PROポリペプチド又はそれらに対する抗体、場合によっては化学治療薬)の送達に有用な、脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤を含む種々の型の小さな小胞である。リポソームの成分は、通常は

生物学的メンバーの脂質配列に類似した2層構造に配列される。

ここで用いるように、「イムノアドヘシン」という用語は、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能を持つ異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性を付与した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは抗体の抗原認識及び結合部位以外の所望の結合特異性を持つアミノ酸配列（即ち「異種」）と免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物である。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む近接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3、又はIgG-4サブタイプ、IgA（IgA-1及びIgA-2を含む）、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

【0067】

下記に示すように、表1はALIGN-2配列比較コンピュータープログラムのための完全なソースコードを提供する。このソースコードは、ALIGN-2配列比較コンピュータープログラムを提供するために、UNIXオペレーティングシステムでの利用のため日常的にコンパイルされても良い。

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

【0068】

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

```

{ 0 0 6 9 }

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             *getseq0, *g_calloc();

```

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 %s\"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

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

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

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

```

【 0 0 7 1 】

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;
        }
    }
}

```

【 0 0 7 2 】

表1(続き)

...NW

```

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

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

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

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

```

【 0 0 7 3 】

表1(続き)

...nW

```

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

```

表1(続き)

```

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

#include "nw.h"

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

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

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

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

```

【 0 0 7 5 】

表1(続き)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
int    lx, ly;                                                /* "core" (minus endgaps) */
int    firstgap, lastgap;                                       /* leading trailing overlap */
{
    int          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, "%f\n");
    fprintf(fx, "< %d match %s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
            nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

【 0 0 7 6 】

表1(続き)

```

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

fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outh, " (%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "":"s");
    fprintf(fx, "%s", outh);
}
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "%n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)%n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "%n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)%n",
        smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s%n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "":"s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "":"s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized%n");
}

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

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

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

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

```

...getmat

pr_align

【 0 0 7 7 】

表1(続き)

```

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

        more++;

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

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

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

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

```

...pr_align

dumpblock

表1(続き)

```

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(poi) != ' ')) {
        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; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

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

```

...dumpblock

nums

putline

【 0 0 7 9 】

表1(続き)

```

int          i;
register char *px;

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

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

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

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

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

```

...putline

stars

【 0 0 8 0 】

表1(続き)

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

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

stripname**【 0 0 8 1 】**

表1(続き)

```

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

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

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

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

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                           getseq
{
    char    *file; /* file name */
    int     *len; /* seq len */

    char    line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int     natgc, tlen;
    FILE    *fp;

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

```

【 0 0 8 2 】

表1(続き)

```

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

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

char *
g_malloc(msg, nx, sz)                                g_malloc
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_malloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

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

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

```

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].jlp, 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].jlp.n[j];
    xx = dx[dmax].jlp.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)                                writejumps
{
    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);
}

```

【 0 0 8 5 】

表2A

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

% アミノ酸配列同一性=

(ALIGN-2によって決定された二つのポリペプチド配列間の同一であるアミノ酸残基数の数) ÷ (PRO
ポリペプチドの全アミノ酸残基数) =

5 ÷ 15 = 33.3%

【 0 0 8 6 】

表2B

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

% アミノ酸配列同一性=

(ALIGN-2によって決定された二つのポリペプチド配列間の同一であるアミノ酸残基数) ÷ (PROポリペプチドの全アミノ酸残基数) =

5 ÷ 10 = 50%

【 0 0 8 7 】

表2C

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

% 核酸配列同一性=

(ALIGN-2によって決定された二つの核酸配列間の同一であるヌクレオチドの数) ÷ (PRO-DNA核酸配列の全ヌクレオチド数) =

6 ÷ 14 = 42.9%

【 0 0 8 8 】

表2D

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

% 核酸配列同一性=

(ALIGN-2によって決定された二つの核酸配列間の同一であるヌクレオチドの数) ÷ (PRO-DNA核酸配列の全ヌクレオチド数) =

4 ÷ 12 = 33.3%

【 0 0 8 9 】

II. 本発明の組成物と方法

A. 全長PROポリペプチド

本発明は、本出願でPROポリペプチドと呼ば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説明するように、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ポリペプチド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」で呼称する。

下記の実施例に開示するように、種々のcDNAクローンがATCCに寄託されている。これらのクローンの正確な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。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PRO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。

【0090】

B. PROポリペプチド変異体

ここに記載した全長天然配列PROポリペプチドに加えて、PRO変異体も調製できると考えられる。PRO変異体は、PROポリペプチドDNAに適当なヌクレオチド変化を導入することにより、あるいは所望のPRO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PROポリペプチドの翻訳後プロセスを変えうることを理解するであろう。

【0091】

天然全長配列PRO又はここに記載したPROポリペプチドの種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第5,364,934号に記載されている保存的及び

非保存的変異についての任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列PROと比較してPROポリペプチドのアミノ酸配列が変化するPROポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも1つのアミノ酸のPROポリペプチドの一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。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、PROポリペプチドの配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸の類似した構造及び/又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては1から5のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、得られた変異体を下記の実施例に記載するインビトロアッセイの任意のもので活性について試験することにより決定される。

【0092】

PRO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、PRO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。

PRO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DNAを消化して所望の断片を単離することによるPRO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(PCR)により、所望のポリペプチド断片をコードするDNA断片を単離し増幅することを含む。DNA断片の所望の末端を決定するオリゴヌクレオチドは、PCRの5'及び3'プライマーで用いられる。好ましくは、PROポリペプチド断片は、ここに開示した天然PRO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、対象とする保存的置換を、好ましい置換を先頭にして表3に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表3に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より置換的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

【0093】

表3

<u>元の残基</u>	<u>例示的置換</u>	<u>好ましい置換</u>
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	ans
Gln(E)	asp	asp
Gly(G)	pro; ala	ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; ルロイソ	leu
Leu(L)	ルロイソ; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe

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

【0094】

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

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

【0095】

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

変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキヤニング、及びPCR突然変異誘発[Carter等, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発[Wells等, Gene, 34: 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発[Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)]等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができ、又は他の知られた技術をクローニングしたDNAに実施してPRO変異体DNAを作成することもできる。

【0096】

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキヤニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキヤニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、

セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham及びWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

【0097】

C . P R Oの修飾

P R Oポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一型は、P R Oポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、P R Oポリペプチドの選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることである。二官能性試薬での誘導体化が、例えばP R Oを水不溶性支持体マトリクスあるいは抗-P R O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-ヒドロキスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸、3, 3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬を含む。

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

【0098】

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、ここで意図されるのは、天然配列PROに見られる1又は複数の炭水化物部分の欠失（存在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び/又は酵素的手段によるグリコシル化の削除のいずれかによる）、及び/又は天然配列PROに存在しない1又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。さらに、この文節は、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化を含む、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。

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、1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。

【0099】

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Aplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

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

リコシダーゼを用いることにより達成される。

本発明の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、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つへの、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。

また、本発明の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PROポリペプチドを含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。

【0100】

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ポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的にはPROポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このような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ポリペプチドを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン（ポリ-His）又はポリ-ヒスチジン-グリシン（poly-his-gly）タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Field等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD) タグ及びその抗体 [Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド [Martin等, Science, 255:192-194 (1992)]；-チューブリンエピトープペプチド [Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)] を含む。

【0101】

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IgG分子のFc領域であり得る。Ig融合体は、好ましくはIg分子内の少なくとも1つの可変領域に換えてPRO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。

【0102】

D. PROの調製

以下の説明は、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。

【0103】

a. PROをコードするDNAの単離

PROをコードするDNAは、PRO mRNAを保有してそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたcDNAライブラリから得ることができる。従って、ヒト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、ゲノムライブラリから又は公知の合成方法(例えば、自動化核酸合成)により得ることもできる。

ライブラリは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ(PROに対する抗体又は少なくとも約20-80塩基のオリゴヌクレオチド等)によってスクリーニングできる。選択されたプローブによるcDNA又はゲノムライブラリのスクリーニングは、例えばSambrook等, 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。所望のPROポリペプチドをコードする遺伝子を単離する他の方法はPCR法を使用するものである[Sambrook等, 上掲; Dieffenbach等, PCR Primer: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

【0104】

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

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

【0105】

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

【0106】

原核生物細胞形質移入及び真核生物細胞形質移入の方法、例えば、 $CaCl_2$ 、 $CaPO_4$ 、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shaw等, Gene, 23:315 (1983)及び1989年6月29日公開のWO 89/05859に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が好ましい。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van solingen等, J. Bact., 130:946 (1977)及びHsiao等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、

エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown等, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990)及び Mansour等, *Nature*, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

【0107】

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294 (ATCC31,446)；大腸菌X1776 (ATCC31,537)；大腸菌株W3110 (ATCC27,325) 及びK5772 (ATCC53,635) である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、*E. coli*、エンテロバクター、エルビニア(*Erwinia*)、クレブシエラ(*Klebsiella*)、プロテウス(*Proteus*)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス(*Serratia marcescans*)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバシリスブチリス(*B. subtilis*)及びバシリリチェニフォルミス(*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行のDD 266,710に記載されたバシリリチェニフォルミス41P)、シュードモナス、例えば緑膿筋及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生産発行のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110は、細胞に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異をするように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型 *tonA ptr3* を有する大腸菌W3110株1A2；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan'* 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 ilvG kan^rを有する大腸菌W3110株37D6; 非カナマイシン耐性degP欠失変異を持つ37D6株である大腸菌W3110株40B4; 及び1990年8月7日発行 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。

【0108】

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ポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセスプロンブ(*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(*Kluveromyces hosts*) (米国特許第4,943,529号; Fleer等, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991))、例えばケーラクチス(*K. lactis*) (MW98-8C, CBS 683, 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. wickeramii*) (ATCC 24,178)、ケーワルチイ(*K. waltii*) (ATCC 56,500)、ケードロソフィラルム(*K. drosophilum*) (ATCC 36,906; Van den Berg等, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990))、ケーテモトレランス(*K. thermotolerans*)及びケーマルキシアナス(*K. marxianus*); ヤロウシア(*yarrowia*) (EP 402,226); ピッチャパストリス(*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sheekrishna等, *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 [1988]); カンジダ; トリコデルマレーシア(*reesia*) (EP 244,234); アカパンカビ (Case等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979]); シュワニオマイセス(*schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス(*occidentalis*) (1990年10月31日発行のEP 394,538); 及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(*Tolyposcladium*) (1991年1月10日発行のWO 91/00357); 及びコウジ菌、例えば偽巢性コウジ菌 (Ballance等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburn等, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton等, Pr

oc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) 及びクロカビ (Kelly及びHynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985]) が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(Hansenula)、カンジダ、クロエケラ(Kloeckera)、ピチア(Pichia)、サッカロミセス、トルロプシス(Torulopsis)、及びロドトルラ(Rhodotorula)からなる属から選択されるメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982)に記載されている。

【0109】

グリコシル化PROの発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエS2及びスポドスペラSf9等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)及びCOS細胞を含む。より詳細な例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); チャイニーズハムスター卵巣細胞/DHFR(CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)) ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065); 及びマウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL51)を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

【0110】

c. 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、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。

【0111】

PROポリペプチド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、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(*Saccharomyces*)及びクレイベロマイシス(*Kluyveromyces*)因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスホターゼリーダー、白体(*C.albicans*)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行のEP362179)、又は1990年11月15日に公開されたWO 90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【0112】

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

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選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。

【0113】

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

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

【0114】

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ [Hitzeman 等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 又は他の糖分解酵素 [Hess 等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900(1987)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

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

【0115】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのPROポリペプチド転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス(1989年7月5日公開のUK2,211,504)、アデノウィルス(例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びサルウィルス40(SV40)のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

より高等の真核生物による所望の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のシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィル

ス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、PRO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。

【0116】

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

組換え脊椎動物細胞培養での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。

【0117】

d. 遺伝子増幅 / 発現の検出

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

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

【0118】

e. ポリペプチドの精製

PROポリペプチドの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-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。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAEによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過；IgGのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラム；及び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キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deucher, *Methodes in Enzymology*, 182 (1990)；Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定のPROの性質に依存する。

【0119】

E. PROポリペプチドをコードする遺伝子の腫瘍組織及び細胞系での増幅

この発明は或る種の癌細胞で増幅される遺伝子の同定及び特徴付けに基づいている。

原核生物及び真核生物ゲノムに2つの見掛け上は矛盾する要件を課した。一方は、遺伝情報としてのDNAのその最初の形態での保存及び繁殖であり、複数の世代を通して安定な遺伝を確保する。他方では、細胞又は生物が最近の環境変化を採用しなければならない。適応メカニズムは遺伝子物質の質的又は量的改変を含みうる。質的改変は、コード化配列が変化して構造的又は機能的に異なるタンパク質を生ずるDNA変異を含む。遺伝子増幅は量的改変であり、それにより実際の完全なコード化配列、即ち遺伝子の数が増加し、転写に利用できるテンプレート数の増加、翻訳可能な転写物の数の増加、及び最終的には増幅された遺伝子にコードされるタンパク質の量の増加をもたらす。

【0120】

遺伝子増幅の現象及びそこにあるメカニズムは、幾つかの原核及び真核生物細胞培養系でインビトロ実験されている。遺伝子増幅の最も特徴づけられた例は、種々の濃度の細胞毒性薬メトトレキセート(MTX)を含有する培地での真核生物細胞の培養を含む。MTXは葉酸類似物であり酵素デヒドロフォレートレダクターゼ(DHFR)のブロックによりDNA合成を妨害する。低濃度のMTXに最初に暴露すると殆どの細胞(99.9%)が死亡する。少量の細胞は生き残り、多量のDHFR-RNA及びタンパク質を生産することによりMTX濃度を増加させても成長できる。この過剰生産の基礎は単一のDHFR遺伝子の増幅である。遺伝子のさらなるコピーは、小さく過剰な染色体(二重微小)の形態で染色体外コピーとして、又は一体化染色体コピーとして見られる。

【0121】

遺伝子増幅は、細胞毒性薬(最近に対する抗生物質及び真核生物に対する化学治療薬)への耐性の進行及び腫瘍形成性形質転換において最も普通に起こる。自発的事象としての又はウイルス又は化学/環境侵襲による真核生物の形質転換は典型的にその細胞の遺伝物質における変化を伴う。ヒト悪性収容で観察される最も通常の変化的変化はp53タンパク質の突然変異である。p53は、定常(G1)から複製(S)相への細胞の転移を制御し、DNA損傷の存在下でこの転移

を防止する。言い換えれば、p53変異不全の主な結果の一つは、DNA損傷の蓄積及び成長、即ち遺伝的变化である。腫瘍形成細胞における遺伝的变化の通常の型は、点変異に加えて、増幅及び全体、構造的改変、例えば転位置である。

【0122】

DNA配列の増幅は、DHFR実験系で例示したように特定の機能的要件を示す。従って、悪性におけるある種のオンコジーンが増幅は悪性形質転換及び形質転換フェノタイプの維持のプロセスにおけるこれらの遺伝子の原因となる役割を示す。この仮説が最近の研究で支持されている。例えば、bc1-2タンパク質はある型の非ホジキンリンパ腫において増幅されることが見いだされた。このタンパク質はアポトーシスを阻害して腫瘍形成細胞の蓄積を進行させる。成長因子レセプターの遺伝子ファミリーのメンバーが種々の型の癌で増幅されることが見いだされ、これらのレセプターの過剰発現が、腫瘍細胞の制限された量の利用可能な成長因子に対する感受性を低下させる。例としては、アンドロゲン欠乏治療の間の再発前立腺癌におけるアンドロゲンレセプターの増幅、及び乳癌における成長因子レセプター相同体ERB2の増幅を含む。最近、細胞間シグナル伝達及び細胞周期進行に含まれる遺伝子が悪性形質転換の間に増幅を受けうる。これは、種々の上皮及びリンパ腫瘍形成におけるbc1-I及びras遺伝子の増幅によって例示される。

これらの初期の研究は、これらの方法が悪性形質転換に重要な遺伝子の同定が可能であるため、腫瘍形成において増幅されたDNA配列の同定の可能性を例示する。ERB2の場合も、形質転換タンパク質が腫瘍治療のための新規で特異的な標的を示すので、治療的立場からの可能性を示す。

【0123】

増幅されたゲノム配列を示すのに幾つかの異なる技術を使用できる。癌細胞から調製した染色体展開の古典的な細胞発生分析は、転位置、欠失及び変換といった全体構造変化を同定するには十分である。増幅ゲノム領域は、それらが高いコピー数を含むか染色体外物質として存在する場合にのみ可視化される。細胞発生は特定の腫瘍形成を持つ特定の染色体変化の一貫した関係を示すための第1の技術だが、管理可能なDNA配列の同定及び単離には不十分である。より最近に開

発された技術の競合ゲノムハイブリッド形成 (CGH) は腫瘍形成におけるゲノム増幅の広範な現象を例示する。腫瘍及び正常DNAは正常細胞の分裂中期に同時にハイブリッド形成し、腫瘍に高頻度で存在するDNA配列についての画像分析で全ゲノムをスクリーニングする (WO 93/18,186; Gray等, Radiation Res. 137: 275-289 [1994])。スクリーニング法として、このタイプの分析は、種々のヒト腫瘍における再発アンプリコン (増幅DNAの伸展) の多数を明らかにした。CGHは古典的細胞発生分析よりDNAの増幅伸展の同定において感度が高いが、それは標準的な遺伝子技術によりアンプリコン内のコード化配列の迅速な同定及び単離ができない。

【0124】

遺伝子増幅の検出に最も感度の良い方法はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) ベースのアッセイである。これらのアッセイは極めて少量の腫瘍DNAを出発材料として用い、精巧で感度が良く、配列決定などの更なる分析に利用できるDNAを提供し、高容量スループット分析に適している。

上記のアッセイは相互に排他的ではなく、腫瘍形成における増幅の同定にしばしば組み合わせて使用される。細胞発生分析及びCGHは増幅領域の全ゲノムの概観のためのスクリーニング法を代表し、PCRベースのアッセイはコード化配列、即ち増幅領域の遺伝子を最終的に同定するのに最も適している。

本発明により、このような遺伝子は定量的PCR (S. Gelmini等, Clin, Chem. 43: 752 [1997]) により、乳、肺、結腸、前立腺、脳、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、精巣、卵巣、子宮など、腫瘍、又は腫瘍細胞系を含む種々の原発腫瘍からのDNAを健常ドナーからのプールしたDNAと比較することにより同定される。定量的PCRは、TaqMan (商品名) 装置 (ABI) を用いて実施された。遺伝子特異的プライマー及び蛍光発生プローブは、DNAのコード化配列に基づいて設計される。

【0125】

ヒト肺癌細胞系は、A549 (SRCC768)、Calu-1 (SRCC769)、Calu-6 (SRCC770)、H157 (SRCC771)、H441 (SRCC772)、H460 (SRCC773)、SKMES-1 (SRCC774)、S

W900(SRCC775)、H522(SRCC832)、及びH810(SRCC833)を含み、全てATCCから入手可能である。原発ヒト肺腫瘍細胞は通常は腺癌、扁平上皮細胞癌、大細胞癌、非-小細胞癌、小細胞癌、及び気管支肺胞癌から誘導され、例えば、SRCC724(「AdenoCa」と略記される腺癌)(LT1)、SRCC725(「SqCCa」と略記される扁平上皮細胞癌)(LT1a)、SRCC725(「NSCCa」と略記される非-小細胞癌)(LT1a)、SRCC726(腺癌)(LT2)、SRCC727(腺癌)(LT3)、SRCC728(腺癌)(LT4)、SRCC729(扁平上皮細胞癌)(LT6)、SRCC730(腺/扁平上皮細胞癌)(LT7)、SRCC825(腺癌)(LT8)、SRCC731(腺癌)(LT9)、SRCC732(扁平上皮細胞癌)(LT10)、SRCC733(扁平上皮細胞癌)(LT11)、SRCC734(腺癌)(LT12)、SRCC735(腺/扁平上皮細胞癌)(LT13)、SRCC736(扁平上皮細胞癌)(LT15)、SRCC737(扁平上皮細胞癌)(LT16)、SRCC738(扁平上皮細胞癌)(LT17)、SRCC739(扁平上皮細胞癌)(LT18)、SRCC740(扁平上皮細胞癌)(LT19)、SRCC741(肺細胞癌、「LCCa」と略記)(LT21)、SRCC811(腺癌)(LT22)、SRCC887(扁平上皮細胞癌)(LT26)、SRCC888(腺-BAC癌)(LT27)、SRCC889(扁平上皮細胞癌)(LT28)、SRCC890(扁平上皮細胞癌)(LT29)、SRCC891(腺癌)(LT30)、SRCC892(扁平上皮細胞癌)(LT31)、SRCC894(腺癌)(LT33)を含む。また、SRCC1125[HF-000631]、SRCC1127[HF-000641]、SRCC1129[HF-000643]、SRCC1133[HF-000840]、SRCC1135[HF-000842]、SRCC1227[HF-001291]、SRCC1229[HF-001293]、SRCC1230[HF-001294]、SRCC1231[HF-001295]、SRCC1232[HF-001296]、SRCC1233[HF-001297]、SRCC1235[HF-001299]、SRCC1236[HF-001300]、SRCC1296[HF-001640]、SRCC1299[HF-001643]、SRCC1300[HF-001644]、SRCC1301[HF-001645]、SRCC1302[HF-001646]、SRCC1303[HF-001647]、及びSRCC1304[HF-001648]と称されるヒト肺腫瘍も含まれる。

【0126】

結腸癌細胞系は、例えば、ATCC細胞系SW480(腺癌、SRCC776)、SW620(結腸腺癌のリンパ節転移、SRC777)、Colo320(癌、SRCC778)、HT29(腺癌、SRCC779)、HCC2998(癌、SRCC830)、HM7(ATCC大腸腺癌細胞系LS174Tの高 Δ シン産生変異体、SRCC780、Robert Warren博士、UCSFから得た)、CaWiDr(腺癌、SRCC781)、HCT116(癌、SRCC782)、SKCO1(腺癌、SRCC783)、SW403(腺癌、SRCC784)、LS174T(癌、SRCC785)、Colo205(癌、SRCC828)、HCT15(癌、SRCC829)、HCC2998(癌、SRCC830)、及びKM12(癌、SRCC831)を含む。原発大腸腫瘍は、CT2(SRCC742)、CT3(SRCC743)、CT8(SRCC744)、CT10(SRCC745)、CT12(SRCC746)、CT14(SRCC747)、CT15(SRCC748)、CT16(SRCC749)、CT17(SRCC750)、CT1(SRCC751)、CT4(SRCC752)、CT5(SRCC753)、CT6(SRCC754)、CT7(SRCC755)、CT9(SRCC756)、CT11(SRCC757)、CT18(SRCC758)、CT19(腺癌、SRCC906)、CT20(腺癌、SRCC907)、CT21(腺癌、SRCC908)、CT22(腺癌、SRCC909)、CT23(腺癌、SRCC910)、CT24(腺癌、SRCC911)、CT25(腺癌、SRCC912)、CT26(腺癌、SRCC913)、CT27(腺癌、SRCC914)、CT28(腺癌、SRCC915)、CT29(腺癌、SRCC916)、CT30(腺癌、SRCC917)、CT31(腺癌、SRCC918)、CT32(腺癌、SRCC919)、CT33(腺癌、SRCC920)、CT35(腺癌、SRCC921)及びCT36(腺癌、SRCC922)と称される大腸腺癌を含む。また、SRCC1051[HF-000499]、SRCC1052[HF-000539]、SRCC1053[HF-000575]、SRCC1054[HF-000698]、SRC1059[HF-000755]、SRCC1060[HF-000756]、SRC1142[HF-000762]、SRCC1144[HF-000789]、SRC1146[HF-000795]及びSRCC1148[HF-000811]

と称されるヒト大腸腫瘍中心も含まれる。

【0127】

ヒト乳癌細胞系は、例えば、HBL100(SRCC759)、MB435s(SRCC760)、T47D(SRCC761)、MB468(SRCC762)、MB175(SRCC763)、MB361(SRCC764)、BT20(SRCC765)、MCF7(SRCC766)、及びSKBR3(SRCC767)、及びSRCC1057[HF-000545]と称されるヒト乳腫瘍中心を含む。また、SRCC1094、SRCC1095、SRCC1096、SRCC1097、SRCC1098、SRCC1099、SRCC1100、SRCC1101と称されるヒト乳腫瘍、及びSRCC893[LT32]と称されるbreast-met-ling-NS腫瘍が含まれる。

ヒト直腸腫瘍はSRCC981[HF-000550]及びSRCC982[HF-000551]を含む。

ヒト腎臓腫瘍中心は、SRCC989[HF-000611]及びSRCC1014[HF-000613]を含む。

ヒト精巣腫瘍中心はSRCC1001[HF-000733]、そして精巣腫瘍辺縁はSRCC999[HF-000716]を含む。

ヒト上皮小体腫瘍はSRCC1002[HF-000831]及びSRCC1003[HF-000832]を含む。

ヒトリンパ節腫瘍はSRCC1004[HF-000854]、SRCC1005[HF-000855]、及びSRCC1006[HF-000856]を含む。

【0128】

F. 組織分布

ここでの遺伝子増幅アッセイの結果は、種々のヒト組織でのmRNA発現の測定などのさらなる実験により確認できる。

上記したように、種々の組織における遺伝子増幅又は遺伝子発現は、mRNAの転写の定量化のための従来のサザンプロット、ノーザンプロット(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 [1980])、ドットプロット(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する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、組織断片及び細胞培地又は体液の免疫組織学的染色などの免疫的方法によっても測定できる。免疫組織学的染色及び/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、又はここに提供するDNA配列に基づく合成ペプチドに対して、又はPRO DNA配列に融合し特異的抗体エピトープをコードする細胞外配列に対して調製される。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プロトコールは以下に提供する。

【0129】

G. 染色体マッピング

与えられた遺伝子の増幅が機能的に関連する場合は、その遺伝子は、腫瘍生存に重要でない隣接ゲノム領域より多く増幅すべきである。これを試験するために、例えば放射性ハイブリッド分析により、遺伝子を特定染色体にマッピングできる。次いで、増幅レベルを特定した位置及び隣接ゲノム領域において測定する。遺伝子がマッピングされたゲノム領域での選択的又は優先的増幅は、観察された遺伝子増幅が腫瘍成長又は生存を促進する可能性と一致する。染色体マッピングはフレームワーク及びエピセンターマッピングの両方を含む。さらなる詳細は、例えば、Stewart等、Genome Research 7, 422-433 (1997)を参照。

【0130】

H. 抗体結合実験

遺伝子増幅実験の結果は、腫瘍(癌)細胞上でのPROポリペプチドの発現を阻害する抗-PRO抗体の能力が試験される抗体結合実験によって更に確認できる。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。

抗体結合実験は、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(腫瘍細胞で増幅された遺伝子にコードされる)標的タンパク質の量は、抗体に結合し始める標準物の量に逆比例する。結合し始め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固定化し、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。

サンドウィッチアッセイは2つの抗体の使用を含み、各々が検出すべき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、腫瘍試料は新鮮でも凍結したものでよく、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。

【0131】

I. 細胞ベースの腫瘍アッセイ

細胞ベースアッセイ及び腫瘍(例えば、癌)の動物モデルを用いて、遺伝子増幅アッセイに発見を確認し、ここでの遺伝子増幅と腫瘍形成細胞成長の進行及び病理との関係をさらに理解することができる。ここで同定する遺伝子産物の腫瘍又は癌の進行及び病理における役割は、ここで遺伝子を増幅すると同定された原発腫瘍細胞又は細胞系を用いて試験することができる。このような細胞は、例えば、上記した乳、大腸及び肺癌細胞及び細胞系を含む。

異なる方法では、特定の腫瘍に含まれることが知られた細胞型の細胞をこの

cDNAで形質移入し、これらのcDNAの過剰成長誘発能力を分析する。適当な細胞は、例えば、B104-1-1 (neuプロトオンコジーンで形質移入された安定なNIH-3T3細胞液) 及びras-形質移入NIH-3T3細胞等の安定な腫瘍細胞系を含み、これらは所望の遺伝子で形質移入し、そして腫瘍形成的成長を監視できる。このような形質移入細胞系は、次いで、形質転換細胞の成長に対する細胞分裂停止又は細胞毒性活性の発揮により、又は抗体依存性細胞性細胞毒性(ADCC)の媒介により、ポリ-又はモノクローナル抗体又は抗体組成物の腫瘍形成細胞成長を阻害する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、癌治療用の候補薬の同定に使用できる。

さらに、(下記のような)トランスジェニック動物の腫瘍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、安定な細胞系が好ましい。トランスジェニック動物から連続細胞系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)。

【0132】

J. 動物モデル

腫瘍の進行及び原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。腫瘍及び癌(例えば、乳癌、結腸癌、前立腺癌、肺癌など)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、又はオルトピン(orthopin)移植、例えば大腸組織に移植された結腸癌細胞により、腫瘍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。)

【0133】

癌遺伝子の研究におそらく最もしばしば用いられる動物種は、免疫不全マウス

、特にヌードマウスである。ハイポ/形成不全を持つヌードマウスがヒト腫瘍異種移植の宿主として行動するという観察は、この目的のための広い用途を導いた。常染色体劣性 *nu* 遺伝子が、例えば、ASW、A/He、AKR、BALB/c、B10.LP、C17、C3H、C57BL、C57、CBA、DBA、DD、I/st、NC、NFR、NFS、NFS/N、NZB、NZC、NZW、P、RIII及びSJLを含むヌードマウスの極めて多数の異なる共通遺伝子系統に導入された。さらに、遺伝的な免疫不全を持つヌードマウス以外の広範な他の動物が生育され、腫瘍異種移植のレシピエントとして用いられた。さらなる詳細については、The Nude Mouse in Oncology Research, E. Boven 及び B. Winograd 編, CRC Press, Inc., 1991を参照。

【0134】

これらの動物に導入される細胞は、周知の腫瘍/癌細胞系、例えば上記列挙した腫瘍細胞系、及び、例えばB104-1-1細胞系(neuプロトオンコジーンで形質移入された安定NIH-3T3細胞系); ras-形質移入NIH-3T3細胞:Caco-2(ATCC HTB-37)、中程度に良く分化したグレードIIヒト大腸腺癌細胞系、HT-29(ATCC HTB-38)から、あるいは腫瘍及び癌から誘導することができる。腫瘍又は癌細胞の試料は、手術を受けている患者から、液体窒素中での凍結及び保存を含む標準的な条件を用いて得ることができる(Karmali等, Br. J. Cancer 48, 689-696 [1983])。

腫瘍細胞は、ヌードマウスなどの動物に、種々の手法によって導入できる。マウスの皮下(s.c.)空間は、腫瘍移植に非常に好ましい。腫瘍は、固体ブロックとして、トロチャー(trochar)を用いてニードル生検として、細胞懸濁物としてs.c.移植できる。固体ブロック又はトロチャー移植のために、適切な大きさの腫瘍組織断片がs.c.空間に導入される。細胞懸濁物は、原発腫瘍又は安定な腫瘍細胞系から新たに調製され、皮下注射される。また腫瘍細胞は、皮下植え込みとして注射することもできる。この位置において、種菌が皮膚結合組織の下層とs.c.組織との間に析出される。Boven及びWinograd(1991), 上掲。

【0135】

乳癌の動物モデルは、例えば、神経芽腫細胞(それからneu癌遺伝子が最初

に単離される)、又はne u形質移入NIH-3T3細胞をヌードマウスに移植することにより、基本的にはDrebin等, PNAS USA 83, 9129-9133 (1986)に記載されているように生成される。

同様に、結腸癌の動物モデルは、結腸癌細胞を動物、例えばヌードマウスに継代し、これらの動物における腫瘍の発現を導くことにより生成される。ヌードマウスにおけるヒト結腸癌の同所性移植モデルは、例えば、Wang等, Cancer Research 54, 4726-4728 (1994)及びToo等, Cancer Research 55, 681-684 (1995)に記載されている。このモデルは、いわゆるAntiCancer, Inc. (SanDiego, California)から市販の「METAMOUSE」に基づく。

動物に生じた腫瘍は、取り出してインビトロで培養することができる。インビトロ培地からの細胞は、次いで動物に継代することができる。これらの腫瘍は、さらなる試験及び薬物スクリーニングの標的として提供され得る。あるいは、継代から得られる腫瘍は単離でき、継代前細胞及び1又はそれ以上の継代後に単離した細胞のRNAを、対象とする遺伝子の識別可能な発現について分析する。このような継代技術は、周知の腫瘍又は癌細胞系で実施することができる。

【0136】

例えば、Meth A、CMS 4、CMS 5、CMS 21、及びWEHI-164がBALB/c雌マウスの線維肉腫に導入され(DeLeo等, J. Exp. Med. 146, 720 [1977])、それは、種々の抗原の抗-腫瘍活性の研究のための高度に制御可能なモデル系を提供する(Palladino等, J. Immunol. 138, 4023-4032 [1987])。簡便には、腫瘍細胞は細胞培地中でインビトロで成長させる。動物に注射する前に、細胞系は洗浄してバッファー中に約 10×10^6 から 10×10^7 細胞/mlの細胞密度で懸濁する。次いで動物を10から100 μ lの細胞懸濁物で皮下感染し、腫瘍が現れるまで1から3週間放置する。

さらに、最も完全に研究された実験的腫瘍の一つであるマウスのルイス肺(3LL)癌腫は、研究用腫瘍モデルとして用いることができる。この腫瘍モデルにおける有効性は、肺の小細胞癌腫(SCCL)と診断されたヒト患者の治療における有利な効果と相関していた。この腫瘍は、影響を受けたマウスからの腫瘍断片又は培地に残った細胞の注射に際して正常マウスに導入でき(Zupi等, Br. J.

Cancer 41, suppl. 4, 309 [1980])、証拠は、腫瘍がたった一つの細胞の注射から開始され、感染した腫瘍細胞の極めて高い集団が生存することを示している。この腫瘍モデルに関する更なる情報については、Zacharski, Haemostasis 16, 300-320 [1986]を参照のこと。

【0137】

移植された腫瘍の動物モデルにおける試験化合物の有効性を評価する一つの方法は、治療前後での腫瘍の大きさを測定することである。伝統的に、移植した腫瘍の大きさは、二又は三次元のスライドキャリパーで測定される。二次元に制限された測定は、腫瘍の大きさを正確に反映せず、従って、通常は数式を用いて対応する容積に換算される。しかしながら、腫瘍の大きさの測定は極めて不正確である。候補薬の治療効果は、治療-誘発性の成長遅延及び特異的な成長遅延としてより良く記述できる。腫瘍成長の記述における他の重要な変数は、腫瘍容積倍加時間である。Rygaard及びSpang-Thomsen, Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals, Wu及びSheng編, Basel, 1989, 301によって報告されたプログラムなどの、腫瘍成長の計算及び記述のためのコンピュータプログラムも利用可能である。しかし、腫瘍に続く壊死及び炎症反応が実際には少なくとも初期に腫瘍の大きさを増大させ得ることを注記しておく。従って、これらの変化は、形態学的方法及びフローサイトメトリー分析を組み合わせ、注意深く監視する必要がある。

【0138】

組換え(トランスジェニック)動物モデルは、ここに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、対象とす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、全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、Van der 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ら, Cell 56, 313-321 [1989]) ; 胚のエレクトロポレーション (Lo, Mol. Cel. Biol. 3, 1803-1814 [1983]) ; 精子媒介遺伝子転移 (Lavitra noら, 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。

【0139】

本発明の目的のために、トランスジェニック動物は、そ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、又は免疫組織化学などの技術を用いて分析できる。動物は、腫瘍又は癌発生の徴候についてさらに試験される。

【0140】

あるいは、動物の胚性細胞に導入されたPROポリペプチドをコードする変更ゲノムDNAと、そのポリペプチドをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、ここに同定するPROポリペプチドをコードする欠陥又は変更遺伝子を有する「ロックアウト」動物を作成することができる。例えば、PROポリペプチドをコードするcDNAは、確立された技術に従い、PRO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。特にPROポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部を欠失したり、組み込みを監視するために使用する選択可能なマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングDNA(5'と3'末端の両方)を数キロベース含む[例えば、相同的組換えベクターについてはThomas and Capecchi, Cell, 51: 503 (1987)を参照のこと]。ベクターは胚性幹細胞に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する[例えば、Li等, Cell, 69:915 (199

2)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、PROポリペプチドが不在であることによるある種の病理的状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。

【0141】

自発的な動物腫瘍の治療におけるここに同定されるポリペプチドに特異的に結合する抗体、及び他の候補薬の有効性も試験できる。このような研究のための適切な標的は、ネコ口腔扁平上皮癌(SCC)である。ネコ口腔SCCは高度に侵襲的な悪性腫瘍で、ネコに最も通常の口腔悪性腫瘍であり、この種に報告される口腔腫瘍の60%以上を占める。それは、離れた部位には殆ど転移しないが、この転移の低い発生率は単にこの腫瘍を持つネコの短い生存期間を反映しているにすぎない。これらの腫瘍は通常手術できないが、主にネコの口腔の解剖学的形状による。現在では、この腫瘍の有効な治療法は存在しない。研究に入る前に、各々のネコに完全な臨床検査、生体組織検査を施し、コンピュータ断層撮影(CT)によりスキャンした。舌下口腔扁平上皮細胞腫瘍を持つと診断されたネコは研究から排除した。舌はこの腫瘍のために麻痺し始め、治療がこの腫瘍を殺した後も、動物は自分で餌を取ることができないであろう。各々のネコを長期に渡って繰り返し治療する。腫瘍の写真を治療期間中の毎日及び引き続く再チェックの時点で撮影した。治療の後、各ねこに再度CTスキャンを施した。CTスキャン及びラジオグラフは、その後8週間ごとに評価した。データは、対照群と比較した生存数、反応性及び毒性における相違について評価した。ポジティブ反応は、腫瘍の縮小、好ましくは生存の質の向上又は生存期間の延長を必要とする。

さらに、他の自発的な動物腫瘍、例えばイヌ、ネコ、及びヒヒの線維肉腫、腺癌、リンパ腫、クロンドローマ(chondroma)、平滑筋肉腫も試験できる。これらの

イヌ及びネコでの乳腺癌は、その発現及び挙動がヒトのものに極めて類似しているため、好ましいモデルである。しかし、このモデルの使用は動物におけるこの型の腫瘍の発生比率によって制限される。

【0142】

K. 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、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。小分子とは、抗体合成有機又は無機化合物を含むと考え、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-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、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る核酸にコードされるポリペプチドと、それら2成分が相互作用するのに十分な時間接触させることで共通している。

【0143】

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のレセプター即ち候補薬が、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。

【0144】

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PROポリペプチドと相互作用するが結合しない場合、その相互作用は、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、Fields及び共同研究者等 [Fields及びSong, Nature(London) 340, 245-246 (1989); Chienら, 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、Chevray及びNathans [Proc.Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)] に開示されているように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、-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、並びにこれら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。

【0145】

ここで同定されるPROのコード化配列と他の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、増幅された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の反応混合物にブ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。

【0146】

アンタゴニストを検定するために、PROポリペプチドを、特定の活性についてスクリーニングする化合物とともに細胞に添加してもよく、PROポリペプチド存在下で対象とする活性を阻害する当該化合物の能力が、当該化合物がPROポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、PROポリペプチド及び潜在的アンタゴニストを、膜結合PROポリペプチドレセプター又は組換えレセプターと、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。PROポリペプチドは、放射活性等で標識でき、レセプターに結合したPROポリペプチド分子の数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパンニング及びFACSソーティングにより同定できる。Coliganら、Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991)。好ましくは発現クローニングが用いられ、そこではポリアデニル化RNAがPROポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このRNAから生成されたcDNAライブラリがプールに分配され、COS細胞又は他のPROポリペプ

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

【0147】

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

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

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンとPROポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリペプチド-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが効果を与えず、よってPROポリペプチドの作用を競合的に阻害するPROポリペプチドの変異形態であってもよい。

【0148】

他の潜在的なPROポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスRNA又はDNA作成物であり、例えば、アンチセン

スRNA又はDNAは、標的mRNAにハイブリッド形成してタンパク質翻訳を妨害することによりmRNAの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、トリプルヘリックス形成又はアンチセンスDNA又はRNAを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法はともに、ポリペプチドヌクレオチドのDNA又はRNAへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟PROポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード化部分は、約10から40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドの設計に使用される。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され(三重螺旋 - Leeら, Nucl, Acid Res., 6: 3073 (1979); Cooneyら, Science, 241: 456 (1988); Dervanら, Science, 251: 1360 (1991)参照)、それによりPROポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはインビボでmRNAにハイブリッド形成してmRNA分子のPROポリペプチドへの翻訳を阻止する(アンチセンス - Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (SRS Press: Boca Raton, FL, 1988))。また上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に輸送され、アンチセンスRNA又はDNAをインビボで発現させて、PROポリペプチドの産生を阻害することもできる。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

【0149】

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

潜在的アンタゴニストは、PROポリペプチドの活性部位、レセプター結合部位、又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それによりPROポリペプチドの正常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び

合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。

【0150】

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

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

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

【0151】

L. 腫瘍治療のための組成物及び方法

ここで同定した遺伝子の増幅を伴う腫瘍の治療に有用な組成物は、限定されないが、抗体、小有機及び無機分子、ペプチド、ホスホペプチド、アンチセンス及びリボザイム分子、三重螺旋分子などを含み、標的遺伝子産物の発現又は活性を阻害するものである。

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防止することによりmRNAの翻訳を直接阻止する。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日発行)を参照。

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一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介する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。

これらの分子は上記のスクリーニングアッセイの任意のもの又は任意の組み合わせにより、又は当業者に知られた他のスクリーニング技術により同定できる。

【0152】

M. 抗体

本発明で最も有望な候補薬剤の幾つかは、ここで同定される増幅遺伝子の生成又は遺伝子産物を阻害する及び/又は遺伝子産物の活性を低下させる抗体及び抗体断片である。

【0153】

1. ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫化剤、及び所望するのであればアジュバントを、一又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫化剤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-

ルは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

【0154】

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、典型的には断片を含むPROポリペプチド、又はそのタンパク質又はその断片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」)が使用されるか、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細胞系と融合させ、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]。不死化細胞系は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髄腫細胞系が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプチリン及びチミジンを含み(「HAT培地」)、この物質がHGPRT欠乏性細胞の増殖を阻止する。

【0155】

好ましい不死化細胞系は、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のものである。より好ましい不死化細胞系はマウス骨髄腫系であり、これは例えば

カリフォルニア州サンディエゴのソーク研究所 (Salk Institute) Cell Distribution Centerやヴァ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 (ATCC) より入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫細胞系も開示されている [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeurら, 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ポリペプチドに対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ (RIA) や酵素結合免疫測定法 (ELISA) 等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980) によるスキッチャード分析法によって測定することができる。

【0156】

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

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

【0157】

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など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[US Patent No.4,816,567; Morrisonら, 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の代わりに置換するか、本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインの代わりに置換し、キメラ性二価抗体を産生することができる。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。

【0158】

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領域の任意のポイントで切断される。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。

【0159】

3. ヒト及びヒト化抗体

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F_v、F_{ab}、F_{ab'}、F_(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体は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F_vフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる [Jonesら, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmannら, Nature, 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]。

【0160】

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ら, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmannら, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyenら, Science, 239:1534-1536 (1988)] の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によ

って置換されたヒト抗体である。

【0161】

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ら, 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ら及びBoernerらの技術も、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ら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss. p.77(1985)及びBoernerら, J. Immunol., 147(1):86-95(1991)]。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、及び次の科学文献：Marksら, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonbergら, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwildら, 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。

【0162】

4. 抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法(ADEPT)

また、本発明の抗体は、プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、W081/01145を参照のこと)を活性化させた抗体をコンジュゲートさせることにより、ADEPTにおいて使用することができる。例えばW088/07378及び米国特許第4,975,278号を参照されたい。

ADEPTに有用な免疫コンジュゲートの酵素成分には、より活性化細胞毒形態に転化するように、プロドラッグに作用し得る任意の酵素が含まれる。

【0163】

限定するものではないが、この発明の方法に有用な酵素には、グリコシダーゼ

、グルコース置きシダーゼ、ヒトリソザイム、ヒトグルコロニダーゼ、ホスファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ；スルファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なアリアルスルファターゼ；非毒性5-フルオロシトシンを抗癌剤5-フルオロウラシルに転化するのに有用なシトシンデアミナーゼ；プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ（例えば、カルボキシペプチダーゼG2及びカルボキシペプチダーゼA）及びカテプシン（例えば、カテプシンB及びL）で、ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なもの；D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグの転化に有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；炭水化物切断酵素、例えばグリコシル化プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なノイラミニダーゼ及びガラクトシダーゼ；ラクタムで誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に転化させるのに有用なラクタマーゼ；及びペニシリンアミダーゼ、例えばそれぞれフェノキシアセチル又はフェニルアセチル基で、それらのアミン性窒素において誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に転化するのに有用なペニシリンVアミダーゼ又はペニシリンGアミダーゼが含まれる。あるいは、「アブザイム」としてもまた公知の酵素活性を有する抗体を、遊離の活性薬剤に本発明のプロドラッグを転化させるために使用することもできる（例えば、Massey, Nature 328:457-458[1987]を参照のこと）。抗体-アブザイムコンジュゲートは、ここで記載されているようにして、腫瘍細胞個体群にアブザイムを送達するために調製することができる。

【0164】

この発明の酵素は、当該分野においてよく知られている技術、例えば上で検討したヘテロ二官能性架橋試薬を使用することにより、抗-PRO抗体に共有的に結合させることができる。あるいは、本発明の抗体の少なくとも結合領域を本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部位に結合せしめてなる融合タンパク質を、当該技術においてよく知られている組換えDNA技術を使用して作成することができる（Neubergerら, Nature 312:604-608[1984]）。

【0165】

5. 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。本発明の場合において、結合特異性の一方はPROポリペプチドに対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づく [Milstein及びCuello, Nature, 305:537-539 (1983)]。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のW093/08829、及びTrauneckerら, EMBO J., 10:3655-3656 (1991)に開示されている。

【0166】

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体をコードする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ら, Methods in Enzymology, 121:210(1986)を参照されたい。

W096/27011に記載された他のアプローチ法によれば、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ヘテロ二量体のパーセント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ドメイン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)と置換される。

大きな側鎖と同じ又はより小さいサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(アラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモ二量体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。

【0167】

二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片(例えば、 $F(a b')$ 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ら, *Science*, 229:81 (1985)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断して $F(a b')$ ₂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 $F a b'$ 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。 $F a b'$ -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 $F a b'$ -チオールに再転換し、他の $F a b'$ -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 $F a b'$ フラグメントを直接回収でき、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ら, *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体 $F(a b')$ ₂分子の製造を記述している。各 $F a b'$ フラグメント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。

【0168】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体フラグメントを作成し分離する様々な方法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る抗体の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フラグメントを作成する別のメカニズムを提供した。フラグメントは、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、一つのフラグメントの V_H 及び V_L ドメインは他のフラグメントの相補的 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フラグメント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。

【0169】

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)。

例示的二重特異性抗体は、ここで与えられるタンパク質上の2つの異なるエピトープに結合しうる。あるいは、抗-ポリペプチドアームは、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FcRI(CD64)、FcRII(CD32)及びFcRIII(CD16)等のIgGのFcレセプター(FcR)に結合するアームに結合し、細胞防御メカニズムを特定のタンパク質発現細胞に集中するようにしてもよい。二重特異性抗体は、特定のポリペプチドを発現する細胞に対する局所的細胞毒性薬として使用してもよい。これらの抗体は、ポリペプチド結合アーム及び細胞毒性薬又はキレート化剤、例えばEOTUBE、DPTA、DOTA、又はTETAに結合するアームを有する。他の対象とする二重特異性抗体は、ポリペプチドに結合し、さらに組織因子(TF)に結合する。

【0170】

6. ヘテロ抱合体抗体

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

【 0 1 7 1 】

7 . エフェクター機能の設計

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えばガンの治療における抗体の効能を増強することが望ましい。例えば、システイン残基をF c領域に導入して、この領域における鎖間ジスルフィド結合を形成させる。このようにして産生されたホモダイマー抗体は改善されたインターナリゼーション能力及び/又は増加した補体媒介細胞死滅及び抗体依存性細胞障害活性(ADCC)を有しうる。Caronら, J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)を参照されたい。抗腫瘍活性が高められたホモダイマー抗体は、Wolffら, Cancer Research 53:2560-2565(1993)に記載されているようなヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製することもできる。あるいは二重F c領域を有し、よって増強された補体溶解及びADCC能を有しうる抗体を設計することができる。Stevensonら, Anti-cancer Drug Design 3:219-230 (1989)を参照。

【 0 1 7 2 】

8 . 免疫複合体

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

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬は上記した。用いることので

きる酵素活性毒素及びその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、コレラ毒素、ボツリヌス毒素、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)を含む。小分子毒素は、例えばカリケアマイシン(calicheamicins)、マイタンシノイド(maytansinoids)、パリトキシン(palytoxin)及びCC1065を含む。様々な放射性ヌクレオチドが放射性抱合抗体の生成に利用可能である。例として、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及び ^{186}Re を含む。

【0173】

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

他の実施態様では、腫瘍の予備標的化で使用するために、抗体は「レセプター

」(ストレプトアビジン等)に抱合されてもよく、抗体-レセプター複合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合複合体を循環から除去し、次に細胞毒性薬(例えば、放射性ヌクレオチド等)に抱合された「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

【0174】

9. 免疫リポソーム

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

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

【0175】

N. 製薬組成物

ここで同定される増幅遺伝子の産物に特異的に結合するアゴニスト抗体、並びに上記に開示したスクリーニングアッセイで同定された他の分子は、癌を含む腫瘍、ウイルス性疾患などの上記で議論した種々の病理学的状態の治療のために、免疫調節剤として、製薬組成物の形態で投与することができる。

増幅された遺伝子にコードされるタンパク質が細胞内であり、全抗体が阻害剤として用いられる場合、内在化抗体が好ましい。しかし、リポフェクション又はリポソームも抗体、又は抗体断片を細胞に導入するのに使用できる。抗体断片

が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が通常は好ましい。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ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 [1993]）。

【0176】

抗体の治療用製剤は、所望される程度の純度を持つ抗体を、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（Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. [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ライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンズエトニウムクロライド；フェノール；ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；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EDTA等のキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）又はトウイーン(TWEEN)（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。

【0177】

本発明のスクリーニングアッセイで同定された非-抗体化合物は、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される。

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に1以上の活性化化合物、

好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的仮性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、細胞毒性薬、サイトカイン又は成長阻害剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系
(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、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。

【0178】

徐放性製剤を調製してもよい。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-グルタミン酸及びγ-エチル-L-グルタメート、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商品名)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドの注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が体内に長時間残ると、それらは37℃の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通した分子間S-S結合形成

であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

【0179】

0. 治療方法

本発明の抗体及び他の抗腫瘍化合物は、ここで同定される増幅遺伝子の過剰発現及び/又は活性化を特徴とするものを含む種々の状態の治療に用いてもよいと考えられる。このような抗体及び、これらに限られないが有機及び無機小分子、ペプチド、アンチセンス分子等を含む他の化合物で治療される状態又は疾患の例としては、良性又は悪性腫瘍（例えば、腎臓(renal)、肝臓、腎臓(kidney)、膀胱、乳房、胃、卵巣、大腸直腸、前立腺、膵臓、肺、外陰部、甲状腺、肝臓の癌；肉腫；膠芽細胞腫；及び種々の頭部及び頸部の腫瘍）；白血病及びリンパ悪性疾患；ニューロン、グリア、星状細胞、視床下部及び他の腺、マクロファージ、上皮、間質及び胞胚腔の疾患；及び炎症、脈管形成及び免疫学的な疾患が含まれる。

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

【0180】

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

トロゲン化合物又はオナプリストンなどの抗プロゲステロン（EP 616812参照）の、それらの分子について知られた用量と組み合わせてもよい。

また、腫瘍関連抗原に対する抗体、例えば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。ときどきは、患者にサイトカインを投与することも有利である。好ましい実施態様では、ここの抗癌剤は、成長阻害剤と同時投与される。例えば、まず成長阻害剤を投与し、続いて本発明の抗癌剤を投与する。しかしながら、同時投与、又は本発明の抗癌剤を最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は現在用いられている量であるが、成長阻害剤とこの抗体との組み合わせ（相乗）効果により減少させ得る。

【0181】

疾患の防止又は治療のための、ここでの抗腫瘍剤の適切な用量は、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薬剤に対する反応、及び主治医の裁量に依存する。薬剤は、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 μ g / k g から15 m g / k g（例えば、0.1 - 20 m g / k g）の抗体が、例えば、1又はそれ以上の別々の投与あるいは連続注入のいずれにしても、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な1日の用量は、上記の要因に応じて、約1 μ g / k g から100 m g / k g 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。

【0182】

P. 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を含む製造品が提供される。この製造品は容器とラベルとを含んでなる。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、ここで同定される遺伝子産物の活性を妨害することのできる抗腫瘍剤、例えば抗体である。容器上又は添付されるラベルは、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。

【0183】

Q．腫瘍の診断及び予知

或る種の腫瘍で過剰発現される成長レセプター等の細胞表面タンパク質は候補薬剤又は腫瘍（例えば、癌）治療の優れた標的であるが、同じタンパク質は腫瘍細胞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腫瘍の診断及び予知に用途が見出される。例えば、腫瘍細胞で増幅された遺伝子のタンパク質産物に対する抗体は腫瘍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、増幅された遺伝子が細胞表面タンパク質、例えば成長因子をコードする場合に特に好ましい。このような結合アッセイは、上記5節に実質的に記載されたように実施される。

【0184】

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、インサイト検出のために広範な組織学的方法が容易に利用できることは明らかであろう。

【0185】

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

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

【0186】

(実施例)

実施例で言及されている全ての他の市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC登録番号により以下の実施例及び明細書全体を通して特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801ユニヴァーシティー・ビルディング、マナッサス、VA 20110-2209である。本出願で言及される全ての元の寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定の下でなされた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、どれが最初であろうとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、35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。

【0187】

特に記さない限り、本発明は上記及び以下の教科書に記載されたもののような組換えDNA技術の標準的な手法を用いた：Sambrookら，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Press N.Y.，1989；Ausubelら，Current Protocols in Molecular Biology，Green Publishing Associates and Wile

y Interscience, N.Y., 1989; Innisら, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., N.Y., 1990; Harlowら, Antibodies : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988; Gait, Oligonucleotide synthesis, IRL Press, Oxford, 1984; R.I. Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coliganら, Current Protocols in Immunology, 1991。

【0188】

実施例1：ヒトPRO5800をコードするcDNAクローンの単離

Swiss-Prot公的データベースからの約950の公知の分泌タンパク質からの細胞外ドメイン(ECD)配列(必要ならば、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)を含んだ。検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2(Altschul及びGish, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて、ECDタンパク質配列のEST配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。公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は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, WA)でクラスター形成してコンセンサスDNA配列に構築した。

コンセンサスDNA配列は他のEST配列に対してphrapを用いて上記のように構築した。このコンセンサス配列を、ここでDNA102836と命名した。幾つかの場合には、コンセンサス配列は中間コンセンサスDNA配列から誘導され、それはBLAST及びphrapの繰り返しサイクルを用いて伸長させ、その中間コンセンサス配列は上記のEST配列の供給源を用いて可能な限り伸長させた。

【0189】

DNA102836コンセンサス配列に基づいて、1)PCRにより対象とする配列を含むcDNAライブラリを同定するため、及び2)PRO5800の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。正方向及び逆方向PCRプライマーは一般的に20~30ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約100-1000bp長のPCR産物

を与えるように設計される。プローブ配列は典型的には40-55bp長である。幾つかの場合には、コンセンサ配列が約1-1.5kbより大きな場合には更なる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を上掲のAusubelら、Current Protocols in Molecular Biologyのように、PCRプライマー対でのPCR増幅によりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いた興味ある遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

【0190】

PCRプライマーの対（正方向及び逆方向）を合成した：

正方向PCRプライマー1：

5'-CAGCGAACCGGGTGCCGGGTC-3'（配列番号：21）

正方向PCRプライマー2：

5'-GAGCGACGAGCGCGCAGCGAAC-3'（配列番号：22）

正方向PCRプライマー3：

5'-ATACTGCGATCGCTAAACCACCATGCGCCGCCGCTGTGGCTG-3'

（配列番号：23）

逆方向PCRプライマー1：

5'-GCCGGCCTCTCAGGGCCTCAG-3'（配列番号：24）

逆方向PCRプライマー2：

5'-CCCACGTGTACAGAGCGGATCTC-3'（配列番号：25）

逆方向PCRプライマー3：

5'-GAGACCAGGACGGGCAGGAAGTG-3'（配列番号：26）

逆方向PCRプライマー4：

5'-CAGGCACCTTGGGGAGCCGCC-3'（配列番号：27）

逆方向PCRプライマー5：

5'-CCCACGTGTACAGAGCGGATCTC-3'（配列番号：28）

逆方向PCRプライマー6：

5'-GAGACCAGGACGGGCAGGAAGTG-3'（配列番号：29）

さらに、次のヌクレオチド配列を持つ合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブをコンセンサスDNA102836配列から構築した：

ハイブリッド形成プローブ：

5'-CTCTACGGGTACTGCAGGTTCCGGGAGCGCATCGAAGAGAACGG-3'

(配列番号：30)

【0191】

cDNAライブラリーの構築のためのRNAをヒト胎児肺組織から単離した。cDNAクローンを単離するために用いたcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的方法によって形成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライムし、SalIヘミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動でおよそそのサイズ分割をし、決められた方向で適当なクローニングベクター(pRKB又はpRKD等；pRK5Bは、SfiI部位を持たないpRK5Dの前駆体である；Holmesら, Science, 253:1278-1280 (1991))に独特のXhoI及びNotI部位においてクローン化した。

上記のように単離されたクローンのDNA配列は、全長PRO5800ポリペプチドについての全長DNA配列(DNA108912-2680と命名する[Fig 1、配列番号：1])及び当該PRO5800ポリペプチドの誘導タンパク質配列を与えた。

【0192】

上記で同定された全長クローンは、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7-9に見かけの翻訳開始部位及びヌクレオチド位置517-519の停止シグナルを有していた(Fig 1；配列番号：1)。予測されるポリペプチド前駆体は170アミノ酸長であり、約19,663ダルトンの計算上の分子量及び約11.81の見積もられたpIを有する。Fig 2(配列番号：2)に示した全長PRO5800の分析は、Fig 2に示したような種々の重要なポリペプチドドメインの存在を明らかにし、ここで重要なポリペプチドドメインに与えた位置は上記のようにおよそのものである。クローンDNA108912-2680は1999年5月25日にATCCに寄

託され、ATCC寄託番号PTA-124が付与されている。

Fig 2 (配列番号: 2) に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース (version 35.45 SwissProt 35) の分析は、PRO5800 アミノ酸配列と以下のDayhoff配列、P_W52595, P_W57313, FGFA_HUMAN, P_W57264, FGFA_RAT, P_W52597, MMU94517_1, FGFA_MOUSE, P_W57306 及びD86333_1との間の配列同一性を明らかにした。

【0193】

実施例2: ヒトPRO6000をコードするcDNAクローンの単離

天然ヒトPRO6000ポリペプチドをコードするcDNAクローン (DNA 102880 - 2689) を、一次cDNAクローンの5'末端を優先的に示すヒト子宮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。

クローンDNA 102880 - 2689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28 - 30に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置580 - 582に見かけの停止コドンを含む (Figure 3 ; 配列番号: 3) 。予測されるポリペプチド前駆体は184アミノ酸長である (Figure 4 ; 配列番号: 4) 。Fig 4に示された全長PRO6000配列は、約21,052ダルトンの見積上の分子量及び約5.01の見積もられたpIを有する。Fig 4 (配列番号: 4) に示した全長PRO6000の分析は、Fig 4に示したような種々の重要なポリペプチドドメインの存在を明らかにし、ここで重要なポリペプチドドメインに与えた位置は上記のようにおよそのものである。クローンDNA 102880 - 2689は1999年7月20日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-383が付与されている。

Fig 4 (配列番号: 4) に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース (version 35.45 SwissProt 35) の分析は、PRO6000 アミノ酸配列と以下のDayhoff配列、SPS_VICFA, ADU85448_1, G64635, AE001516_3, P_W20328, P_W20747, 及びSPS_SPIOLとの間の配列同一性を明らかにした。

【0194】

実施例3：ヒトPRO6016をコードするcDNAクローンの単離

DNA96881-2699は、ジェネンテク、インク（South San Francisco, CA）によって開発された独自の配列発見アルゴリズムを、公的（例えば、GenBank）及び/又は個人的（LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA）データベースからのESTs並びに集団化及び組み立てられたEST断片に適用することにより同定した。シグナル配列アルゴリズムは、考慮している配列又は配列断片の5'-末端の第1の、場合によっては第2のメチオニンコドン（ATG）を取り囲むDNAヌクレオチドの文字に基づく分泌シグナルスコアを計算する。第1のATGに続くヌクレオチドは、停止コドンを持たない少なくとも35の不明瞭でないアミノ酸をコードしなければならない。第1のATGが必要なアミノ酸を有する場合、第2のものは試験しない。何れも要件を満たさない場合、候補配列にスコアをつけない。EST配列が真正のシグナル配列を含むか否かを決定するために、ATGコドンを取り囲むDNA及び対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られた7つのセンサー（評価パラメータ）の組を用いてスコアをつけた。

【0195】

上記に記載したシグナル配列アルゴリズムの使用は、ここで3035248H1と命名されたLIFESEQ(商品名)データベース、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CAからのEST配列の同定を可能にした。次いでこのESTクラスター配列を、公的データベース（例えば、GenBank）及び独自に開発したESTDNAデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（EST）データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul及びGish, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。公知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70（90の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでDNA82389と命名する。

。

DNA 82389 コンセンサス配列とLIFESEQ(商品名)データベースIncyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CAのESTクローン番号3035248H1に含まれるEST配列との間の観察された配列相同性に鑑みて、クローン番号3035248H1を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。この挿入物は全長タンパク質をコードすることがわかった。このcDNA挿入物の配列をFigure 5に示し、ここでDNA 96881-2699と命名する。

【0196】

クローンDNA 96881-2699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60-62に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置1005-1007の停止コドンで終端する(Figure 5; 配列番号: 5)。予測されるポリペプチド前駆体は315アミノ酸長である(Figure 6; 配列番号: 6)。Figure 6に示す全長PRO6016タンパク質は、約35,963ダルトンの見積もられた分子量及び約5.38のpIを有する。Figure 6(配列番号: 6)に示した全長PRO6016配列の分析は、Figure 6に示した種々の重要なポリペプチドドメインの存在を明らかにし、これら重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。クローンDNA 96881-2699は1999年8月17日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-553が付与されている。

Figure 6(配列番号: 6)に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース(version 35.45 SwissProt 35)の分析は、PRO6016アミノ酸配列と以下のDayhoff配列、P_W88499; HGS_RE347; P_W88647; Y087_CAEEL; S44095; P_W03626; P_W03627; IE68_HSVSA; PN0009; RNU51583_1との間の配列同一性を明らかにした。

【0197】

実施例4: ヒトPRO6018をコードするcDNAクローンの単離

DNA 96565-2701は、ジェネンテク, インク(South San Francisco, CA)によって開発された独自の配列発見アルゴリズムを、公的(例えば、GenBank)及び/又は個人的(LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA)データベースからのESTs並びに集団化及び組み立てられた

E S T断片に適用することにより同定した。シグナル配列アルゴリズムは、考慮している配列又は配列断片の5'-末端の第1の、場合によっては第2のメチオニンコドン(A T G)を取り囲むDNAヌクレオチドの文字に基づく分泌シグナルスコアを計算する。第1のA T Gに続くヌクレオチドは、停止コドンを持たない少なくとも35の不明瞭でないアミノ酸をコードしなければならない。第1のA T G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い。E S T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、A T Gコドンを取り囲むDNA及び対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られた7つのセンサー(評価パラメータ)の組を用いてスコアをつけた。

【0198】

上記に記載したシグナル配列アルゴリズムの使用は、ここで745575H1と命名されたLIFESEQ(商品名)(Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)データベースからのE S T配列の同定を可能にした。次いでこのE S Tクラスター配列を、公的データベース(例えば、GenBank)及び独自に開発したE S T DNAデータベース(LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(E S T)データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2(Altschul及びGish, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて実施した。公知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70(90の場合もある)又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでDNA82411と命名する。

DNA82411コンセンサス配列とLIFESEQ(商品名)データベースIncyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CAのE S Tクローン番号745575H1に含まれるE S T配列との間の観察された配列相同性に鑑みて、クローン番号745575H1を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。この挿入物は全長タンパク質をコードすることがわかった。このcDNA挿入物の配列をFigure 7に示

し、ここでDNA 98565 - 2701と命名する。

【0199】

クローンDNA 96565 - 2701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352 - 357に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置3085 - 3087の停止コドンで終端する (Figure 7 ; 配列番号 : 7)。予測されるポリペプチド前駆体は911アミノ酸長である (Figure 8 ; 配列番号 : 8)。Figure 8 に示す全長PRO6018タンパク質は、約99,117ダルトンの見積もられた分子量及び約4.62のpIを有する。Figure 8 (配列番号 : 8) に示した全長PRO6018配列の分析は、Figure 8 に示した種々の重要なポリペプチドドメインの存在を明らかにし、これら重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようによそのものである。クローンDNA 98565 - 2701は1999年8月3日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA - 481が付与されている。

Figure 8 (配列番号 : 8) に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース (version 35.45 SwissProt 35) の分析は、PRO6018アミノ酸配列と以下のDayhoff配列、PGCB_BOVIN; P_R85442; P_R77034; P_R12609; AC003110_2; PGCV_HUMAN; AF116856_1; P_W75099; HGS_A176; A098460_1との間の配列同一性を明らかにした。

【0200】

実施例5 : ヒトPRO6496をコードするcDNAクローンの単離

Swiss-Prot公的データベースからの約950の公知の分泌タンパク質からの細胞外ドメイン (ECD) 配列 (必要ならな、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、自社のEST DNAデータベース (LIFESQ (商品名) 、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto、CA) を含んだ。検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2 (Altschul及びGish, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)) を用いて、ECDタンパク質配列のEST配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。公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は、プログラム「phrap」 (Phil Green, University of Washington, Seattle

、WA) でクラスター形成してコンセンサスDNA配列に構築した。

コンセンサスDNA配列は他のEST配列に対してphrapを用いて上記のように構築した。このコンセンサス配列を、ここでDNA43048と命名した。幾つかの場合には、DNA43048コンセンサス配列は中間コンセンサスDNA配列から誘導され、それはBLAST及びphrapの繰り返しサイクルを用いて伸長させ、その中間コンセンサス配列は上記のEST配列の供給源を用いて可能な限り伸長させた。

【0201】

DNA43048コンセンサス配列に基づいて、そしてDNA43048コンセンサス配列とLIFESEQ(商品名)データベースIncyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CAのESTクローン番号1636952に含まれるEST配列との間の観察された配列相同性に鑑みて、クローン番号1636952を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。この挿入物は全長タンパク質をコードすることがわかった。このcDNA挿入物の配列をFigure9に示し、ここでDNA119302-2737と命名する。

上記にて同定された全長クローンは、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63-65に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置2328-2330の停止コドンで終端する(Figure9; 配列番号: 9)。予測されるポリペプチド前駆体は755アミノ酸長であり、約82,785ダルトンの見積もられた分子量及び約8.71のpIを有する。Figure10(配列番号: 10)に示した全長PRO6496配列の分析は、Figure10に示した種々の重要なポリペプチドドメインの存在を明らかにし、これら重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようによそのものである。クローンDNA119302-2737は1999年8月10日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-520が付与されている。

Figure10(配列番号: 10)に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース(version 35.45 SwissProt 35)の分析は、PRO6496アミノ酸配列と以下のDayhoff配列、P_W81365; NEC3_MOUSE; MUSPRCON14_1; FURI_HUMAN; P_R77540; S71340; P_W73932; DROFUR1ISO_1; GEN12

660; 及びP_R59784との間の配列同一性を明らかにした。

【0202】

実施例6：ヒトPRO7154をコードするcDNAクローンの単離

Swiss-Prot公的データベースからの約950の公知の分泌タンパク質からの細胞外ドメイン(ECD)配列(必要ならな、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、(1)公的ESTデータベース(例えば、Merck/Washington University)、及び(2)自社のEST DNAデータベース(LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA)を含んだ。検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2(Altschul及びGish, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて、ECDタンパク質配列のEST配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。公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は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, WA)でクラスター形成してコンセンサスDNA配列に構築した。

コンセンサスDNA配列は他のEST配列に対してphrapを用いて上記のように構築した。このコンセンサス配列を、ここでDNA38237と命名した。幾つかの場合には、DNA38237コンセンサス配列は中間コンセンサスDNA配列から誘導され、それはBLAST及びphrapの繰り返しサイクルを用いて伸長させ、その中間コンセンサス配列は上記のEST配列の供給源を用いて可能な限り伸長させた。

【0203】

DNA38237コンセンサス配列に基づいて、そしてDNA38237コンセンサス配列とLIFESEQ(商品名)データベースIncyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CAのESTクローン番号1855755に含まれるEST配列との間の観察された配列相同性に鑑みて、クローン番号1855755を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。この挿入物は全長タンパク質をコードすることがわかった。このcDNA挿入物の配列をFigure 11に示し、ここでDNA108760-2740と命名する。

上記にて同定された全長クローンは、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102-104に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置1083-1085の停止コドンで終端する (Figure 1 1 ; 配列番号 : 1 1) 。 予測されるポリペプチド前駆体は327アミノ酸長であり、約34,348ダルトンの見積もられた分子量及び約7.88のpIを有する。Figure 1 2 (配列番号 : 1 2) に示した全長PRO7154配列の分析は、Figure 1 2 に示した種々の重要なポリペプチドドメインの存在を明らかにし、これら重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようによそのものである。クローンDNA108760-2740は1999年8月17日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-548が付与されている。

Figure 1 2 (配列番号 : 1 2) に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース (version 35.45 SwissProt 35) の分析は、PRO7154アミノ酸配列と以下のDayhoff配列、AF061022_1; AF061024_1; HS889N15_1; GGY14064_1; GGY14063_1; AF061023_1; XLU43330_1; GEN14531; MCARH_1; 及びMMU90715_1との間の配列同一性を明らかにした。

【0204】

実施例7：ヒトPRO7170をコードするcDNAクローンの単離

DNA108722-2743は、ジェネンテク、インク (South San Francisco, CA) によって開発された独自の配列発見アルゴリズムを、公的 (例えば、GenBank) 及び/又は個人的 (LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA) データベースからのESTs並びに集団化及び組み立てられたEST断片に適用することにより同定した。シグナル配列アルゴリズムは、考慮している配列又は配列断片の5'-末端の第1の、場合によっては第2のメチオニンコドン (ATG) を取り囲むDNAヌクレオチドの文字に基づく分泌シグナルスコアを計算する。第1のATGに続くヌクレオチドは、停止コドンを持たない少なくとも35の不明瞭でないアミノ酸をコードしなければならない。第1のATGが必要なアミノ酸を有する場合、第2のものは試験しない。何れも要件を満たさない場合、候補配列にスコアをつけない。EST配列が真正のシグナル配列を含むか否かを決定するために、ATGコドンを取り囲むDNA及び対応する

アミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られた7つのセンサー（評価パラメータ）の組を用いてスコアをつけた。

【0205】

上記に記載したシグナル配列アルゴリズムの使用は、ここでCLU57836と命名されたLIFESEQ(商品名)データベース、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CAからのESTクラスター配列の同定を可能にした。次いでこのESTクラスター配列を、公的データベース（例えば、GenBank）及び独自に開発したESTDNAデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（EST）データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul及びGish, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。公知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70（90の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでDNA58756と命名する。

DNA58756コンセンサス配列とLIFESEQ(商品名)データベースIncyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CAのESTクローン番号2251462に含まれるEST配列との間の観察された配列相同性に鑑みて、クローン番号2251462を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。この挿入物は全長タンパク質をコードすることがわかった。このcDNA挿入物の配列をFigure13に示し、ここでDNA108722-2743と命名する。

【0206】

クローンDNA108722-2743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60-62に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置1506-1508の停止コドンで終端する（Figure13；配列番号：13）。予測されるポリペプチド前駆体は482アミノ酸長である（Figure14；配列番号：14）。Figure14に示す全長PRO7170タンパク質は、約49,060ダルトンの見積もられた分子量及び約

4.74のpIを有する。Figure 14 (配列番号: 14) に示した全長PRO7170配列の分析は、Figure 14に示した種々の重要なポリペプチドドメインの存在を明らかにし、これら重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。クローンDNA108722-2743は1999年8月17日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-552が付与されている。

Figure 14 (配列番号: 14) に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース (version 35.45 SwissProt 35) の分析は、PRO7170アミノ酸配列と以下のDayhoff配列、P_Y12291, I47141, D88733_1, DMC56G7_1, P_Y11606, HWP1_CANAL, HSMUC5BEX_1, HSU78550_1, HSU70136_1, HSU70136_1, 及びSGS3_DROMEとの間の配列同一性を明らかにした。

【0207】

実施例8: ヒトPRO7422をコードするcDNAクローンの単離

DNA119536-2752は、ジェネンテク, インク (South San Francisco, CA) によって開発された独自の配列発見アルゴリズムを、公的 (例えば、GenBank) 及び/又は個人的 (LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA) データベースからのESTs並びに集団化及び組み立てられたEST断片に適用することにより同定した。シグナル配列アルゴリズムは、考慮している配列又は配列断片の5'-末端の第1の、場合によっては第2のメチオニンコドン (ATG) を取り囲むDNAヌクレオチドの文字に基づく分泌シグナルスコアを計算する。第1のATGに続くヌクレオチドは、停止コドンを持たない少なくとも35の不明瞭でないアミノ酸をコードしなければならない。第1のATGが必要なアミノ酸を有する場合、第2のものは試験しない。何れも要件を満たさない場合、候補配列にスコアをつけない。EST配列が真正のシグナル配列を含むか否かを決定するために、ATGコドンを取り囲むDNA及び対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られた7つのセンサー (評価パラメータ) の組を用いてスコアをつけた。

【0208】

上記に記載したシグナル配列アルゴリズムの使用は、ここで81575と命名

されたIncyte データベースからのESTクラスター配列の同定を可能にした。次いでこのESTクラスター配列を、公的データベース（例えば、GenBank）及び独自に開発したESTDNAデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（EST）データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul及びGish, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。公知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70（90の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでDNA104391と命名する。

【0209】

DNA104391コンセンサス配列とIncyteデータベースのクローン番号1922888に含まれるEST配列との間の観察された配列相同性に鑑みて、クローン番号1922888を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。この挿入物は全長タンパク質をコードすることがわかった。このcDNA挿入物の配列をFigure15に示し、ここでDNA119536-2752と命名する。

クローンDNA119536-2752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47-49に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置311-313の停止コドンで終端する（Figure15；配列番号：15）。予測されるポリペプチド前駆体は88アミノ酸長である（Figure16）。Figure16に示す全長PRO7422タンパク質は、約9,645ダルトンの見積もられた分子量及び約5.45のpIを有する。Figure16（配列番号：16）に示した全長PRO7422配列の分析は、Figure16に示した種々の重要なポリペプチドドメインの存在を明らかにし、これら重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。クローンDNA119536-2752は1999年8月17日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-551が付与されている。

【0210】

実施例9：ヒトPRO7431をコードするcDNAクローンの単離

DNA119542-2754は、ジェネンテク、インク（South San Francisco, CA）によって開発された独自の配列発見アルゴリズムを、公的（例えば、GenBank）及び/又は個人的（LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA）データベースからのESTs並びに集団化及び組み立てられたEST断片に適用することにより同定した。シグナル配列アルゴリズムは、考慮している配列又は配列断片の5'-末端の第1の、場合によっては第2のメチオニンコドン（ATG）を取り囲むDNAヌクレオチドの文字に基づく分泌シグナルスコアを計算する。第1のATGに続くヌクレオチドは、停止コドンを持たない少なくとも35の不明瞭でないアミノ酸をコードしなければならない。第1のATGが必要なアミノ酸を有する場合、第2のものは試験しない。何れも要件を満たさない場合、候補配列にスコアをつけない。EST配列が真正のシグナル配列を含むか否かを決定するために、ATGコドンを取り囲むDNA及び対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られた7つのセンサー（評価パラメータ）の組を用いてスコアをつけた。

【0211】

上記に記載したシグナル配列アルゴリズムの使用は、ここでクローン番号2201182と命名されたLIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CAデータベースからのESTクラスター配列の同定を可能にした。次いでこのESTクラスター配列を、公的データベース（例えば、GenBank）及び独自に開発したESTDNAデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（EST）データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul及びGish, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。公知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70（90の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでDNA104392と命名する。

DNA 104392 コンセンサス配列と Incyte データベースのクローン番号 2201182 に含まれる EST 配列との間の観察された配列相同性に鑑みて、クローン番号 2201182 を購入し、cDNA 挿入物を得て配列決定した。この挿入物は全長タンパク質をコードすることがわかった。この cDNA 挿入物の配列を Figure 15 に示し、ここで DNA 119542 - 2754 と命名する。

【0212】

クローン DNA 119542 - 2754 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 247 - 249 に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置 838 - 840 の停止コドンで終端する (Figure 17 ; 配列番号 : 17)。予測されるポリペプチド前駆体は 197 アミノ酸長である (Figure 18)。Figure 18 に示す全長 PRO7431 タンパク質は、約 21,992 ダルトンの見積もられた分子量及び約 12.18 の pI を有する。Figure 18 (配列番号 : 18) に示した全長 PRO7431 配列の分析は、Figure 18 に示した種々の重要なポリペプチドドメインの存在を明らかにし、これら重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようによそのものである。クローン DNA 119542 - 2754 は 1999 年 8 月 31 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 PTA - 619 が付与されている。

Figure 18 (配列番号 : 18) に示した全長配列の ALIGN-2 配列アラインメント分析を用いた Dayhoff データベース (version 35.45 SwissProt 35) の分析は、PRO7431 アミノ酸配列と以下の Dayhoff 配列 AF061943_1; RNU08136_1; MAV011838_1; HXAA_HUMAN; Y653_HUMAN; P_R51263; P_R74041; AF101057_1; AF101058; AF101059_1 との間の配列同一性を明らかにした。

【0213】

実施例 10 : ヒト PRO7476 をコードする cDNA クローンの単離

サイトカイン / 成長因子相同体のために、相同体検索をコンピュータプログラム BLAST 又は BLAST2 (Altschul 及び Gish, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)) を用いて実施した。94.5 KB 断片が成長因子をコードするエクソンを含むことが見出されたが、この断片は大きなイントロンによって分割されていた。イントロンは、コンピューターアルゴリズムによって除かれた。DNA 10

2863 コンセンサス配列に基づいて、1) 対象となる配列を含んだ cDNA ライブラリが PCR によって同定されるように、そして 2) PRO7476 の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして利用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。正方向及び逆方向 PCR プライマーは、一般的に 20 ~ 30 ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約 100 - 1000 bp 長の PCR 産物を与えるように設計される。プローブ配列は典型的には 40 - 55 bp 長である。或る場合には、コンセンサス配列が約 1 - 1.5 kb より大きいとき付加的オリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからの DNA を Ausubel ら, Current Protocols in Molecular Biology, のように、PCR プライマー対での PCR 増幅によりスクリーニングした。ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いた対象とする遺伝子クローンの単離に使用した。

【0214】

PCR プライマー (正方向及び逆方向) を合成した:

正方向 PCR プライマー:

5' -ATGCAGCTCCCACTGGCCCTG- 3' (配列番号: 31)

逆方向 PCR プライマー:

5' -CTAGTAGGCGTTCTCCAGCTCGGCCTG- 3'

(配列番号: 32)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブは、以下の核酸配列を持つ DNA 102863 配列から作成した:

ハイブリダイゼーションプローブ:

5' -CTTCCGCTGCATCCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGCGTG- 3' (配列番号: 33)

上記のような単離されたクローンの DNA 配列は、全長 PRO7476 ポリペプチド (ここで DNA 115253 - 2757 [Figure 19, 配列番号: 19] と命名された) の全長 DNA 配列、及びその PRO7476 ポリペプチドの誘導タンパク質配列を与える。

【0215】

上記の同定された全長クローンは、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62 - 64に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置701 - 703の停止コドンで終端する (Figure 19 ; 配列番号 : 19)。予測されるポリペプチド前駆体は213アミノ酸長であり、約24,031ダルトンの計算上の分子量及び約9.59のpIを有する。Figure 20 (配列番号 : 20) に示した全長PRO7476配列の分析は、Figure 20 に示した種々の重要なポリペプチドドメインの存在を明らかにし、これら重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようによそのものである。クローンDNA 115253 - 2757は1999年8月31日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA - 612が付与されている。

Figure 20 (配列番号 : 20) に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース (version 35.45 SwissProt 35) の分析は、PRO7476アミノ酸配列と以下のDayhoff配列、P_W58704; P_W95711; P_W09408; P_Y12009; T08710; P_W44090; P_W27654; P_Y03225; LSHB_MELGA; AB011030_1との間の配列同一性を明らかにした。

【0216】

実施例11：遺伝子増幅

この実施例は、PRO5800 - , PRO6000 - , PRO6016 - , PRO6018 - , PRO6496 - , PRO7154 - , PRO7170 - , PRO7422、PRO7431又はPRO7476コード化遺伝子が或る種のヒト肺、結腸及び/又は乳癌及び/又は細胞系のゲノムで増幅されることを示す。増幅は遺伝子産物の過剰発現を伴い、ポリペプチドが結腸、肺、乳及び他の癌等の或る種の癌において治療的処置の有用な標的であることを示している。治療薬は、PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドのアンタゴニストの形態をとりうることができ、例えばPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドに対するマウス - ヒトキメラ、ヒト化

又はヒト抗体である。

スクリーニングの出発物質は種々の癌から単離したゲノムDNAである。DNAは、定量的、例えば蛍光的に正確である。ネガティブコントロールとして、DNAを10の正常健常個体からDNAを単離し、それをプールして健常個体における遺伝子コピーのアッセイ対照として使用した(示さず)。5'ヌクレアーゼアッセイ(例えばTaqMan(商品名))及び実時間定量的PCR(例えば、ABI Prism 7700 Sequence Detection System(商品名)(Perkin Elmer, applied Biosystems Division, Foster City, CA))を、或る種の癌で潜在的に増幅される遺伝子の発見に使用した。結果は、PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476をコードするDNAがスクリーニングされた原発性肺又は結腸癌又は癌細胞系又は乳癌細胞系の何れかで過剰表現されるか否かを決定するために用いた。原発性肺癌は、表4に示した型及び段階の腫瘍を持つ個体から得た。表4に列挙した原発腫瘍及びこの実施例を通して参照される原発腫瘍及び細胞系の表示に使用した略語の説明は、上文に示されている。

【0217】

TaqMan(商品名)の結果はデルタ()Ct単位で報告した。1単位は1PCRサイクル又は正常に対して約2倍の増幅に相当し、2単位は4倍、3単位は8倍増幅等々に相当する。定量化はプライマー及びPRO5800-, PRO6000-, PRO6016-, PRO6018-, PRO6496-, PRO7154-, PRO7170-, PRO7422、PRO7431又はPRO7476コード化遺伝子から誘導したTaqMan(商品名)蛍光プローブを用いて得た。独特の核酸配列を含む可能性が高く、イントロンをスプライシングしている可能性が少ないと思われるPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476の領域がプライマー及びプローブ誘導に好適であり、例えば3-非翻訳領域である。PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170,

PRO7422, PRO7431又はPRO7476 遺伝子増幅分析に使用した
プライマー及びプローブ(正、逆及びプローブ)の配列は次の通りである:

PRO5800(DNA108912-2680):

108912.tm.f1:

5'-GCGTCGTGGTCATCAAAG-3' (配列番号: 34)

108912.tm.r1:

5'-TGCAGTCCACGGTGTAGAG-3' (配列番号: 35)

108912.tm.p1:

5'-CTTCTACGTGGCCATGAACCGC-3' (配列番号: 36)

108912.tm.f2:

5'-CCTGGAGATCCGCTCTGTA-3' (配列番号: 37)

108912.tm.p2:

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

108912.tm.r2:

5'-ACGTAGAAGCCTGAGGACAC-3' (配列番号: 39)

PRO6000(DNA102880-2689):

102880.tm.f1:

5'-GATGCTCCAGCTGAAATCC-3' (配列番号: 40)

102880.tm.r1:

5'-CACATGGCTGGAAATGATG-3' (配列番号: 41)

102880.tm.p1:

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

PRO6016(DNA96881-2699):

96881.tm.f1:

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

96881.tm.r1:

5'-CACAACCTTTCTGGTCATAT CCAT-3' (配列番号: 44)

96881.tm.p1:

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

PRO6018 (DNA98565-2701)

98565 . tm . f 1 :

5'-CCTGGGCACCAGATCTTC-3' (配列番号: 46)

98565 . tm . r 1 :

5'-AGGGCAGTTGAGGCACTT-3' (配列番号: 47)

98565 . tm . p 1 :

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

PRO6496 (DNA119302-2737) :

119302 . tm . f 1 :

5'-TCCATGGACCTCCCCTATAC-3' (配列番号: 49)

119302 . tm . r 1 :

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

119302 . tm . p 1 :

5'-ACCCCCACCAAACCCCAGGT-3' (配列番号: 51)

PRO7154 (DNA108760-2740) :

108760 . tm . f 1 :

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

108760 . tm . r 1 :

5'-GGCAGACGAGGGTCTTTC-3' (配列番号: 53)

108760 . tm . p 1 :

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

PRO7170 (DNA108722-2743) :

108722 . tm . f 1 :

5'-CCCAGAAGGTTCCCATGA-3' (配列番号: 55)

108722 . tm . r 1 :

5'-GGGCCTGTTGCCACATC-3' (配列番号: 56)

108722 . tm . p 1 :

5'-CAGCATGTCC AAGCCCCTAACCC-3' (配列番号: 57)

PRO7422 (DNA119536-2752) :

119536 . t m . f 1 :

5'-TCTCCCGATTCTCATCTG-3' (配列番号: 58)

119536 . t m . r 1 :

5'-CCCTGAGAGTCCTGCACAT-3' (配列番号: 59)

119536 . t m . p 1 :

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

PRO7431 (DNA119542 - 2754) :

119542 . t m . f 1 :

5'-AGTGAAGTTTCTCCAGTCCCTAGT-3' (配列番号: 61)

119542 . t m . r 1 :

5'-CCTGGGGTAAGTGAGCAAA-3' (配列番号: 62)

119542 . t m . p 1 :

5'-CCTCTCTTTTCACCCACCTTCCTCAG-3' (配列番号: 63)

PRO7476 (DNA115253 - 2757) :

115253 . t m . f 1 :

5'-GGGACTGGTTAAGAAAGTTGGAT-3' (配列番号: 64)

115253 . t m . r 1 :

5'-CGCCTCAGGCTTTCTGAT-3' (配列番号: 65)

115253 . t m . p 1 :

5'-AGATTCCTTGCACCTCGC-3' (配列番号: 66)

【0218】

5'ヌクレアーゼアッセイ反応は蛍光PCRベースの技術であり、実時間での増幅監視のためのTaqDNAポリメラーゼ酵素の5'エキソヌクレアーゼ活性を使用する。PCR反応に典型的な単位複製配列の生成に2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用する。第3のオリゴヌクレオチド、又はプローブは、2つのPCRプライマーの間に位置するヌクレオチド配列を検出するために設計された。プローブはTaqDNAポリメラーゼ酵素により非伸展性であり、レポーター蛍光染料及びクエンチャー蛍光染料で標識される。2つの染料がプローブ上に接近して位置する場合、レポーター染料からのレーザー誘導発光は消光染料によ

って消光される。増幅反応の間、プローブはT A Q DNAポリメラーゼ酵素によりテンプレートに依存する形で切断される。得られたプローブ断片は溶液中に解離し、放出されたレポーター染料からのシグナルは第2のフルオロホアからの消光効果を受けない。レポーター染料の一分子は、新たに合成された各分子に対して遊離せしめられ、非消光レポーター染料の検出がデータの定量的解釈の基礎を提供する。

【0219】

5'ヌクレアーゼ法は、ABI Prism 7700™配列検出などの実時間定量的PCR装置で実施される。系は温度サイクル器、レーザー、電荷結合素子(CCD)カメラ及びコンピュータからなる。系は温度サイクル器上で96-ウェルでの試料を増幅させる。増幅中に、レーザー誘導蛍光シグナルは、実時間で、光ファイバケーブルで96ウェルに集められ、CCDで検出される。系は装置の実行及びデータの分析のためのソフトウェアを含む。

5'ヌクレアーゼアッセイデータは、最初はCt又は境界サイクルで表される。これは、レポーターシグナルが蛍光のバックグラウンドを越えて蓄積されるサイクルとして定義される。正常なヒトDNAの結果を癌DNAの結果と比較する場合に、Ct値を核酸試料における特定の標的配列の出発コピー相対数の定量的尺度として使用した。

【0220】

表4は、本発明のPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476化合物のスクリーニングに用いた種々の原発腫瘍の段階、T段階及びN段階を記載する。

【0221】

表4
 原発肺及び結腸腫瘍一覧表

原発腫瘍		段階	他の段階	Dukes段階	T段階	N段階
ヒト肺腫瘍	AdenoCa (SRCC724) [LT1]	IIA			T1	N1
ヒト肺腫瘍	SqCCa (SRCC725) [LT1a]	IIB			T3	N0
ヒト肺腫瘍	AdenoCa (SRCC726) [LT2]	IB			T2	N0
ヒト肺腫瘍	AdenoCa (SRCC727) [LT3]	IIIA			T1	N2
ヒト肺腫瘍	AdenoCa (SRCC728) [LT4]	IB			T2	N0
ヒト肺腫瘍	SqCCa (SRCC729) [LT6]	IB			T2	N0
ヒト肺腫瘍	Aden/SqCCa (SRCC730) [LT7]	IA			T1	N0
ヒト肺腫瘍	AdenoCa (SRCC731) [LT9]	IB			T2	N0
ヒト肺腫瘍	SqCCa (SRCC732) [LT10]	IIB			T2	N1
ヒト肺腫瘍	SqCCa (SRCC733) [LT11]	IIA			T1	N1
ヒト肺腫瘍	AdenoCa (SRCC734) [LT12]	IV			T2	N0
ヒト肺腫瘍	AdenoSqCCa (SRCC735)[LT13]	IB			T2	N0
ヒト肺腫瘍	SqCCa (SRCC736) [LT15]	IB			T2	N0
ヒト肺腫瘍	SqCCa (SRCC737) [LT16]	IB			T2	N0
ヒト肺腫瘍	SqCCa (SRCC738) [LT17]	IIB			T2	N1
ヒト肺腫瘍	SqCCa (SRCC739) [LT18]	IB			T2	N0
ヒト肺腫瘍	SqCCa (SRCC740) [LT19]	IB			T2	N0
ヒト肺腫瘍	LCCa (SRCC741) [LT21]	IIB			T3	N1
ヒト肺	AdenoCa (SRCC811) [LT22]	1A			T1	N0
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC742) [CT2]		M1	D	pT4	N0
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC743) [CT3]			B	pT3	N0
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC 744) [CT8]			B	T3	N0
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC745) [CT10]			A	pT2	N0
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC746) [CT12]		MO, R1	B	T3	N0
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC747) [CT14]		pMO, RO	B	pT3	pN0
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC748) [CT15]		M1, R2	D	T4	N2
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC749) [CT16]		pMO	B	pT3	pN0
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC750) [CT17]			C1	pT3	pN1
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC751) [CT1]		MO, R1	B	pT3	N0
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC752) [CT4]			B	pT3	M0
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC753) [CT5]		G2	C1	pT3	pN0
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC754) [CT6]		pMO, RO	B	pT3	pN0
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC755) [CT7]		G1	A	pT2	pN0
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC756) [CT9]		G3	D	pT4	pN2
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC757) [CT11]			B	T3	N0
ヒト結腸	AdenoCa (SRCC758) [CT18]		MO, RO	B	pT3	pN0

【0222】

DNA調製：

DNAは培養した細胞系、原発腫瘍、正常ヒト血液から調製した。単離は、全てQuiagenからの、精製キット、バッファーセット及びプロテアーゼを用い、製造者の指示と下記に従って実施した。

【0223】

細胞培養溶解：

細胞を洗浄し、チップ当たり 7.5×10^8 の濃度でトリプシン化し、4で5分間1000rpmで遠心分離してペレット化し、次いで1/2容量のPBS再遠心

で洗浄した。ペレットを3回洗浄し、懸濁細胞を回収して2×PBSで洗浄した。次いで細胞を10mLのPBSに懸濁させた。バッファC1を4で平衡化させた。Quiagenプロテアーゼ#19155を6.25mlの冷ddH₂Oで最終濃度20mg/mlまで希釈して4で平衡化させた。10mLのG2バッファを、QuiagenRNAs eAストック(100mg/ml)を200µg/mlの最終濃度まで希釈して調製した。

バッファC1(10mL、4)及びddH₂O(40mL、4)を、次いで10mlの細胞懸濁物に添加し、反転させて混合し、氷上で10分間インキュベートした。細胞核をBeckmanスイングバケットロータで4において2500rpmで15分間遠心分離することによりペレット化した。上清を捨て、核をボルテックスしながら2mlのバッファC1(4)及び6mlのddH₂Oに懸濁し、4において2500rpmで15分間2回目の遠心分離をした。次いで核を残りのバッファ中にチップ当たり200µlを用いて再懸濁した。G2バッファ(10ml)を懸濁した核に添加しながら緩いボルテックスを適用した。バッファ添加が完了したら、強いボルテックスを30秒間適用した。Quiagenプロテアーゼ(200µl、上記のように調製)を添加し、50で60分間インキュベートした。インキュベーション及び遠心分離を、溶解物が透明になるまで繰り返した(例えば、さらに30-60分間インキュベートし、4で10分間3000×gでペレット化する)。

【0224】

固体ヒト腫瘍試料の調製及び溶解：

腫瘍試料を秤量し50mlのコニカル管に配して氷上に保持した。加工は調製当たり250mgの組織未満に制限した(1チップ/調製)。プロテアーゼ溶液を6.25mlの冷ddH₂O中に最終濃度20mg/mlまで希釈することにより新たに調製して4で貯蔵した。DNAs eAを最終濃度200mg/mlまで希釈することによりG2バッファ(20ml)を調製した(100mg/mlのストックから)。エアロゾルの吸入を避けるために層流TCフード内でポリトロンのかなチップを用いて、腫瘍組織を19mlのG2バッファ中で60秒間均一化し、室温に保持した。試料間で、各々2LのddH₂Oで2×30秒間、次いでG2バッファ

ー (50 ml) でスピンさせることによりポリトロンを清浄化した。組織がジェネレータチップ上に存在する場合は、装置を分解して清浄化した。

Quiagenプロテアーゼ (上記のように調製、1.0 ml) を添加し、次いでボルテックスして50 で3時間インキュベートした。インキュベーション及び遠心分離を、溶解物が透明になるまで繰り返した (例えば、さらに30 - 60分間インキュベートし、4 で10分間3000 xgでペレット化する)。

【0225】

ヒト血液調製及び溶解：

健常なボランティアから標準的な感染薬プロトコールを用いて血液を採りだし、チップ当たり10mlの試料にクエン酸化した。Quiagenプロテアーゼを6.25mlの冷ddH₂O中に最終濃度20mg/mlまで希釈することにより新たに調製して4 で貯蔵した。DNase Aを100mg/mlのストックから最終濃度200mg/mlまで希釈することによりG2バッファー (20ml) を調製した。血液 (10ml) を50mlのコニカル管に配し、10mlのC1バッファー及び30mlのddH₂O (ともに4 で平衡化したもの) を添加し、反転させて混合して氷上に10分間保持した。Beckmanスイングバケットローターで、4 において2500 rpmで15分間核をペレット化し、上清を捨てた。ボルテックスしながら、核を2mlのC1バッファー (4) 及び6mlのddH₂O (4) 中に懸濁させた。ボルテックスはペレットが白くなるまで繰り返した。次いで核を残りのバッファー中に200 µlチップを用いて懸濁させた。G2バッファー (10ml) を懸濁核に添加しながら緩くボルテックスし、次いで30秒間強くボルテックスした。Quiagenプロテアーゼを添加 (200 µl) し、50 で60分間インキュベートした。インキュベーション及び遠心分離を、溶解物が透明になるまで繰り返した (例えば、さらに30 - 60分間インキュベートし、4 で10分間3000 xgでペレット化する)。

【0226】

透明化溶解物の精製：

(1) ゲノムDNAの単離：

ゲノムDNAを10mlのQBTバッファーで平衡化した (最大チップ調製当た

り1試料)。QF溶離バッファを50℃で平衡化した。試料を30秒間ボルテックスし、次いで平衡化チップに負荷して重力により排液した。チップを2×1.5mlのQCバッファで洗浄した。DNAを、30mlのシラン化したオートクレーブ30mlCortex管に1.5mlのQFバッファ(50℃)で溶離した。イソプロパノール(10.5ml)を各試料に添加し、管をパラフィンで被覆し、DNAが沈殿するまで繰り返し反転させて混合した。試料を、SS-34ロータで4℃において15,000rpmで10分間遠心分離してペレット化した。ペレット位置をマークして上清を捨て、10mlの70%エタノール(4℃)を添加した。試料を、SS-34ロータで4℃において10,000rpmで10分間遠心分離して再度ペレット化した。ペレット位置をマークして上清を捨てた。次いで管を乾燥棚の各面に置き、37℃で10分間乾燥させたが、使用の過剰乾燥には注意した。

乾燥後、ペレットを1.0mlのTE(pH8.5)に溶解し、50℃に1-2時間置いた。試料を4℃に終夜保持して溶解を続けた。次いでDNA溶液を、ツベルクリンシリンジ上に26ゲージの針を具備する1.5ml管に移した。DNAを剪断するために移行を5×繰り返した。次いで試料を50℃に1-2時間置いた。

【0227】

(2)ゲノムDNAの定量及び遺伝子増幅アッセイのための調製:

各管のDNAレベルを1:20希釈(5μlDNA+95μlddH₂O)での標準的なA₂₆₀、A₂₈₀スペクトルにより、Beckman DU640分光光度計の0.1ml石英キュベットを用いて定量した。A₂₆₀/A₂₈₀比率は1.8-1.9の範囲であった。次いで各DNA試料をTE(pH8.5)中に約200ng/mlまで希釈した。最初の材料が高濃度(約700ng/μl)である場合、材料を50℃に再懸濁するまで数時間置いた。

次いで、希釈した材料(20-600ng/ml)に対して、製造者の指示を以下のように改変して蛍光DNA定量を実施した。これは、Hoeffer DyNA Quant 200蛍光計を約15分間暖めて実施した。Hoechst染料作業溶液(#H33258、10μl、使用の12時間以内に調製)を100mlの1xTNEバッファに希釈した。2mlキュベットを蛍光計溶液で満たし、機械に配し、機械をゼロ調節した。

。pGEM3Zf(+)(2 μ l、ロット#360851026)を2mlの蛍光計溶液に添加して200単位で校正した。次いで、さらに2 μ lのpGEM3Zf(+)DNAを試験し、400+/-10単位で読みを確認した。次いで各試料を少なくとも3回読んだ。3試料が互いに10%以内であることが見られたとき、それらの平均をとり、この値を定量化値として用いた。

次いで、蛍光測定で決定した濃度を、各試料をddH₂O中に10ng/ μ l μ まで希釈するのに用いた。これは、1回のTaqManプレートアッセイについて全てのテンプレート試料について同時に行い、500-1000アッセイを実施するのに十分な材料で行った。試料は、Taqman(商品名)プライマー及びプローブで3回試験し、B-アクチン及びGAPDHともに正常なヒトDNAを持ちテンプレート対照を持たない単一のプレート上にある。希釈した試料を用いたが、試験DNAから減算した正常ヒトDNAのCT値は+/-1CTであった。希釈した、ロット定性化したゲノムDNAを、1.0mlアリコートで-80において保存した。続いて遺伝子増幅アッセイに使用するアリコートは、4で保存した。各1mlのアリコートは、8-9プレート又は64試験に十分である。

【0228】

遺伝子増幅アッセイ：

本発明のPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476化合物を以下の原発腫瘍でスクリーニングし、得られたCt値を表5に報告する。

【0229】

表5

Primary Tumor	PRO5800	PRO6000	PRO6016	PRO6018	PRO6496	PRO7154	PRO7170	PRO7422	PRO7431	PRO7476
HF-000733									1.81	1.92
HF-000539									4.54	1.25
HF-000575										1.36
HF-000641			2.79							
HF-000840				1.09	1.75					
HF-000842					1.13				1.11	
HF-000762			1.10							
HF-000789			4.10							
HF-000811			2.21	1.03						
HF-001294					1.28					1.06
HF-001295		1.03								
HF-001296					3.54	1.77	1.85		1.75	2.66
HF-001299						1.07				
HF-001644										
HF-001647								1.89		

議論と結論：

PRO5800 (DNA108912 - 2680)：

種々の腫瘍におけるDNA27864-1155についての Ct 値を表5に報告する。Ct > 1は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表5は、原発肺腫瘍：HF - 001644及びHF - 001647で生じたPRO5800をコードする核酸DNA108912 - 2680の有意な増幅を示す。

DNA108912 - 2680の増幅が種々の肺腫瘍で生じるので、それは腫瘍形成又は成長において有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA108912 - 2680にコードされるタンパク質 (PRO5800) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

PRO6000 (DNA102880 - 2689)：

種々の腫瘍におけるDNA102880 - 2689についての Ct 値を表5に報告する。Ct > 1は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表5は、原発肺腫瘍：HF - 001295で生じたPRO6000をコードする核酸DNA102880 - 2689の有意な増幅を示す。

DNA102880 - 2689の増幅が種々の肺腫瘍で生じるので、それは腫瘍形成又は成長において有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA102880 - 2689にコードされるタンパク質 (PRO6000) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0231】

PRO6016 (DNA96881 - 2699)：

種々の腫瘍におけるDNA27864-1155についての Ct 値を表5に報告する。Ct > 1は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表5は(1)原発肺腫瘍HF - 000641；及び(2)原発大腸腫瘍中心：HF - 000641、HF - 000789、及びHF - 000811で生じたPRO6016をコードする核酸DNA96881 - 2699の有意な増幅を示す。

DNA96881 - 2699の増幅が種々の腫瘍で生じるので、それは腫瘍形

成又は成長において有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA96881-2699にコードされるタンパク質(PRO6016)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

PRO6018(DNA98565-2701) :

種々の腫瘍におけるDNA98565-2701についてのCt値を表5に報告する。Ct>1は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表5は(1)原発肺腫瘍HF-000840;及び(2)原発大腸腫瘍中心HF-000811で生じたPRO6018をコードする核酸DNA98565-2701の有意な増幅を示す。

DNA98565-2701の増幅が種々の腫瘍で生じるので、それは腫瘍形成又は成長において有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA98565-2701にコードされるタンパク質(PRO6018)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0232】

PRO6496(DNA119302-2737) :

種々の腫瘍におけるDNA119302-2737についてのCt値を表5に報告する。Ct>1は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表5は、原発肺腫瘍:HF-000842、HF-001294及びHF-001296で生じたPRO6496をコードする核酸DNA119302-2737の有意な増幅を示す。

DNA119302-2737の増幅が種々の肺腫瘍で生じるので、それは腫瘍形成又は成長において有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA119302-2737にコードされるタンパク質(PRO6496)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

PRO7154(DNA108760-2740) :

種々の腫瘍におけるDNA108760-2740についてのCt値を表5に報告する。Ct>1は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表5は、原発肺腫瘍:HF-001296及HF-001299で生じたPRO7154をコードする核酸DNA108760-2740

の有意な増幅を示す。

DNA 108760 - 2740の増幅が種々の肺腫瘍で生じるので、それは腫瘍形成又は成長において有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 108760 - 2740にコードされるタンパク質 (PRO7154) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0233】

PRO7170 (DNA 108722 - 2743) :

種々の腫瘍におけるDNA 108722 - 2743についての Ct 値を表5に報告する。Ct > 1は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表5は、原発肺腫瘍HF - 001296で生じたPRO7170をコードする核酸DNA 108722 - 2743の有意な増幅を示す。

DNA 108722 - 2743の増幅が肺腫瘍で生じるので、それは腫瘍形成又は成長において有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 108722 - 2743にコードされるタンパク質 (PRO7170) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

PRO7422 (DNA 119536 - 2752) :

種々の腫瘍におけるDNA 119536 - 2752についての Ct 値を表5に報告する。Ct > 1は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表5は、原発肺腫瘍：HF - 001647で生じたPRO7422をコードする核酸DNA 119536 - 2752の有意な増幅を示す。

DNA 119536 - 2752の増幅が肺腫瘍で生じるので、それは腫瘍形成又は成長において有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 119536 - 2752にコードされるタンパク質 (PRO7422) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0234】

PRO7431 (DNA 119524 - 2754) :

種々の腫瘍におけるDNA 119524 - 2754についての Ct 値を表5に報告する。Ct > 1は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表5は(1)精巣腫瘍中心HF - 000733 ; 及び(2

) 原発大腸腫瘍中心：HF - 000539；及び(3) 原発肺腫瘍：HF - 000842、及びHF - 001296で生じたPRO7431をコードする核酸DNA119524 - 2754の有意な増幅を示す。

DNA119524 - 2754の増幅が種々の腫瘍で生じるので、それは腫瘍形成又は成長において有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA119524 - 2754にコードされるタンパク質(PRO7431)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

PRO7476 (DNA115253 - 2757)：

種々の腫瘍におけるDNA115253 - 2757についての Ct 値を表5に報告する。Ct > 1は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表5は(1) 精巣腫瘍中心HF - 000733；及び(2) 原発大腸腫瘍中心HF - 000539及びHF - 000575；及び(3) 原発肺癌HF - 001294及びHF - 001296で生じたPRO7476をコードする核酸DNA115253 - 2757の有意な増幅を示す。

DNA115253 - 2757の増幅が種々の腫瘍で生じたので、それは腫瘍形成又は成長において有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA115253 - 2757にコードされるタンパク質(PRO7476)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0235】

実施例12：ハイブリダイゼーションプローブとしてのPRO5800，PRO6000，PRO6016，PRO6018，PRO6496，PRO7154，PRO7170，PRO7422，PRO7431又はPRO7476の利用
以下の方法は、PRO5800，PRO6000，PRO6016，PRO6018，PRO6496，PRO7154，PRO7170，PRO7422，PRO7431又はPRO7476をコードする核酸配列のハイブリダイゼーションプローブとしての使用を記載する。

ここに開示した全長又は成熟「PRO5800」，「PRO6000」，「PRO6016」，「PRO6018」，「PRO6496」，「PRO7154」，「PRO7170」，「PRO7422」，「PRO7431」又は「PR

07476」ポリペプチドのコード化配列を含んでなるDNA及び/又はその断片は、ヒト組織cDNAライブラリー又はヒト組織ゲノムライブラリーにおける相同的なDNA(例えば、PRO7170、PRO7422、PRO7431又はPRO7476)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ーDNAを含むフィルターのハイブリダイゼーション及び洗浄は、以下の高い緊縮条件で実施した。放射標識PRO誘導プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションは、50%ホルムアルデヒド、5xSSC、0.1%SDS、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、2xデンハード溶液、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PRO5800、PRO6000、PRO6016、PRO6018、PRO6496、PRO7154、PRO7170、PRO7422、PRO7431又はPRO7476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。

【0236】

実施例13：大腸菌におけるのPRO5800、PRO6000、PRO6016、PRO6018、PRO6496、PRO7154、PRO7170、PRO7422、PRO7431又はPRO7476発現

この実施例は、大腸菌における組み換え発現による所望のPRO5800、PRO6000、PRO6016、PRO6018、PRO6496、PRO7154、PRO7170、PRO7422、PRO7431又はPRO7476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した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位を持たなければならない。種々の発現ベクターが用いられる。好適なベクターの例は、pBR322(大腸菌由来のもの; Bolivarら, Gene, 2:95 (1977)参照)であり、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性についての遺伝子を含む。ベクターは、制限酵素で消化され、脱リン酸される。PC

R増幅した配列は、次いで、ベクターに結合させる。ベクターは、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、trpプロモーター、ポリ-Hisリーダー（最初の6つのSTIIコドン、ポリ-His配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む）、PRO5800、PRO6000、PRO6016、PRO6018、PRO6496、PRO7154、PRO7170、PRO7422、PRO7431又はPRO7476コードする領域、ラムダ転写ターミネーター、及びargU遺伝子を含む。

【0237】

ライゲーション混合物は、次いで、Sambrookら、上掲に記載された方法を用いた選択した大腸菌の形質転換に使用される。形質転換体は、それらのLBプレートで成長する能力により同定され、次いで抗生物質耐性クローンが選択される。プラスミドDNAが単離され、制限分析及びDNA配列分析で確認される。

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。終夜培地は、続いて大規模培地の播種に用いられる。次に細胞を最適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。

数時間の培養の後、遠心分離による集菌が可能である。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PRO5800、PRO6000、PRO6016、PRO6018、PRO6496、PRO7154、PRO7170、PRO7422、PRO7431又はPRO7476タンパク質を、タンパク質が強く結合する条件下で金属キレート化カラムを用いて精製した。

【0238】

以下の手法を用いて、ポリ-His（ポリ-ヒス）タグ形態でPRO5800、PRO6000、PRO6016、PRO6018、PRO6496、PRO7154、PRO7170、PRO7422、PRO7431又はPRO7476を大腸菌で発現させてもよい。PRO5800、PRO6000、PRO6016、PRO6018、PRO6496、PRO7154、PRO7170、PRO7422、PRO7431又はPRO7476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した。プライマーは、選択された発現ベク

ターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、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 rpoHts(htpRts) cllpP(lacIq)) に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用した。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O.D.600に達するまで成長させた。ついで培地をCRAP培地(3.57gの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.71gのクエン酸ナトリウム $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、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_4 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時間成長させた。試料を取り出してSDS-PAGEにより発現を確認し、バルク培地を遠心分離して細胞のペレットとした。細胞ペレットを精製及び再折りたたみまで凍結させた。

【0239】

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)で再懸濁させた。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で終夜攪拌した。この工程により、すべてのシステイン残基が亜硫酸によりブロックされた変性タンパク質がもたらされた。溶液をBeckman Ultracentrifuge中で40,000rpmで30分間濃縮した。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した。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^{+2} -NTA金属キレートカラムに負荷した。カラムを50mMのイミダゾール(Calbiochem, Utrol grade)を含む添加バッファー、pH7.4で洗浄した。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した。所望のタンパク質を含有する画分をプールし、4で保存した。タンパク質濃度は、そ

のアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて280nmにおけるその吸収により見積もった。

【0240】

試料を、20mMのトリス、pH8.6、0.3MのNaCl、2.5Mの尿素、5mMのシステイン、20mMのグリシン及び1mMのEDTAからなる新たに調製した再生バッファー中に徐々に希釈することによりタンパク質を再生させた。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となるように選択した。リフォールディング溶液を4で12-36時間ゆっくり攪拌した。リフォールディング反応はTFAを採取濃度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0.2μmフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度2-10%で添加した。再生したタンパク質を、Poros R1/H逆相カラムで、0.1%TFAの移動バッファーと10~80%のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかけた。A280吸収を持つ画分のアリコートにSDSポリアクリルアミドゲルで分析し、相同な再生タンパク質を含有する画分をプールした。一般的に、殆どの正しく再生したタンパク質種は、これらの種が最もコンパクトであり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。誤って再生したタンパク質を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。

所望の再生したPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドを含有する画分をプールし、溶液に向けた窒素の弱い気流を用いてアセトニトリルを除去した。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%のマンニトールを含む20mMのHepes、pH6.8に調製した。

【0241】

実施例14：哺乳動物細胞におけるPRO5800, PRO6000, PRO6

016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476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PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476のグリコシル化形態の調製を例示する。

発現ベクターとしてpRK5(1989年3月15日発行のEP307,247参照のこと)を用いた。場合によっては、PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476 DNAを選択した制限酵素を持つpRK5に結合させ、Sambrookら, 上掲に記載されたようなライゲーション方法を用いてPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476 DNAを挿入させる。得られたベクターは、各々pRK5-[PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476]と呼ばれる。

【0242】

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などの媒質中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化した。約10 µgのpRK5-[PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476] DNAを約1 µgのVA RNA遺伝子コード化DNA[Thimmappayaら, Cell, 31:543(1982)]と混合し、500 µlの1 mM トリス-HCl、0.1 mM EDTA、0.227 M CaCl₂に溶解させた。この混合物に、滴状の、500 µlの50 mM HEPES(pH 7.35)、280 mMのNaCl、1.5 mMのNaPO₄を添加し、25 °Cで10分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、

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

形質移入の約24時間後、培養培地を除去し、培養培地(のみ)又は200 μ Ci/ml 35 S - システイン及び200 μ Ci/ml 35 S - メチオニンを含む培養培地で置換した。12時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピフィルターで濃縮し、15% SDSゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドの存在を現すとして選択された時間にわたってフィルムにさらした。形質転換した細胞を含む培地は、更なるインキュベーションを施し(無血清培地で)、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

【0243】

これに換わる技術において、PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476 DNAは、Somparyacら, 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、700 μ gのpRK5 - [PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476] DNAを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄した。DNA - デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートした。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、5 μ g/mlウシインシュリン及び0.1 μ g/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約4日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いで発現されたPRO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した。

他の実施態様では、PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476をCHO細胞で発現させることができる。pRK5-[PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476]ベクターは、CaPO₄又はDEAE-デキストランなどの公知の試薬を用いてCHO細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地(のみ)又は³⁵S-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476ポリペプチドの存在を同定した後、培養培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約6日間インキュベートし、次いで条件培地を収集する。次いで、発現されたPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476を含む培地を濃縮して、選択した方法にとって精製することができる。

【0244】

また、エピトープタグPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476は、宿主CHO細胞において発現させてもよい。PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476は、pRK5ベクターからサブクローニングした。サブクローン挿入物は、次いで、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。ポリ-HisタグPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476挿入物は、次いで、安定なクローンの選択のため

めのDHFR等の選択マーカを含むSV40誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、CHO細胞をSV40誘導ベクターで(上記のように)形質移入した。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-HisタグPROを含む培養培地は、次いで濃縮し、Ni²⁺-キレートアフィニティー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。また、一過性発現法によって、CHO及び/又はCOS細胞の発現を完遂させてもよい。

PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476は、一過性発現法によってCHO細胞において発現させてもよい。CHO細胞における安定な発現は、以下の方法を用いて実施することが可能である。タンパク質を、各タンパク質の可溶形態のコード化配列(例えば、細胞外ドメイン)がIgG1のヒンジ、CH2及びCH2ドメインを含む定常領域配列に融合したIgG作成物(イムノアドヘシン)及び/又はポリ-Hisタグ形態として発現する。

【0245】

PCR増幅に続いて、対応するDNAを、Ausubelら、Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.26, John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いてCHO発現ベクターにサブクローニングした。CHO発現ベクターは、対象とするDNAの5'及び3'に適合する制限部位を有し、cDNAの便利なシャトル化ができるように作成される。ベクターは、Lucasら、Nucleic Acids res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようにCHO細胞での発現を用い、対象とするcDNA及びジヒドロフォレートレダクターゼ(DHFR)の発現の制御にSV40初期プロモーター/エンハンサーを用いる。DHFR発現は、形質移入に続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

所望のプラスミドDNAの12マイクログラムを、市販の形質移入試薬Superfect(登録商標)(Quiagen), Dospers(登録商標)及びFugene(登録商標)(Boehringer Mannheim)約一千万のCHO細胞に導入した。細胞は、上掲のLucasらに記載されているように成長させた。約 3×10^7 細胞を、下記のような更なる成長及び

生産のためにアンプル中で凍結させた。

【0246】

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

【0247】

ポリ-Hisタグ作成物について、タンパク質はNi²⁺-NTAカラム(Qiagen)を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのNaCl及び5mMイミダゾールを含む20mMのHepes、pH7.4バッファーで平衡化した6mLのNi-NTAカラムに4-5mL/分の流速で4 $^{\circ}$ Cにおいてポンプ供給した。負荷後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのHepes、0

．14 MのNaCl及び4%のマニトールを含む貯蔵バッファー中で25 mlのG25 Superfine (Pharmacia) を用いて脱塩し、-80 で貯蔵した。

イムノアドヘシン (Fc含有) 作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、20 mMのリン酸ナトリウムバッファー、pH 6.8で平衡化した5 mlのプロテインAカラム (Pharmacia) に負荷した。負荷後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、100 mMのクエン酸、pH 3.5で溶離した。溶離したタンパク質は、1 mlの画分を275 µlの1 Mトリスバッファー、pH 9を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-His タグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。均一性はSDS ポリアクリルアミドゲルで試験し、エドマン (Edman) 分解によりN-末端アミノ酸配列決定した。

【0248】

実施例15：酵母菌でのPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476の発現

以下の方法は、酵母菌中でのPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476の組換え発現を記載する。

第1に、ADH2 / GAPDHプロモーターからの PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476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。PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476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 PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476の細胞内発現を指示する。分泌のために、PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO649

6, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476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PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476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分泌シグナル/リーダー配列、及び(必要ならば) PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476の発現のためのリンカー配列とともにクローニングすることができる。

【0249】

酵母菌株AB110等の酵母菌は、次いで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、10%トリクロロ酢酸での沈降及びSDS-PAGEによる分離で分析し、次いでクマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。

続いて組換えPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476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。PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476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。

【0250】

実施例16: バキュロウイルス感染昆虫細胞でのPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476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の組換え発現を示す。 PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018

, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476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た。このようなエピトープタグは、ポリ-Hisタグ及び免疫グロブリンタグ(IgGのFc領域など)を含む。pVL1393(Navogen)などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単には、PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476コード化配列, 又はPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476のコード化配列の所望する部分[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、隣接する(選択された)制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、次いで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

【0251】

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold(商品名)ウイルスDNA(Pharmingen)を、Spodoptera frugiperda(「Sf9」)細胞(ATCC CRL 1711)中にリポフェクチン(GIBCO-BRLから市販)を用いて同時形質移入することにより作成される。28℃で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilleyら, Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施した。

次に、発現されたポリ-HisタグPRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476は、例えばNi²⁺-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される。抽出は、Rupertら, Nature, 362:175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染

した組み換え Sf9 細胞から調製した。簡単には、Sf9 細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー (25 mM の HEPES、pH 7.9 ; 12.5 mM の $MgCl_2$; 0.1 mM EDTA ; 10% グリセロール ; 0.1% の NP-40 ; 0.4 M 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 (50 mM リン酸塩、300 mM の $NaCl$ 、10% グリセロール、pH 7.8) で 50 倍希釈し、0.45 μm フィルターで濾過した。Ni²⁺-NTA アガロースカラム (Qiagen から市販) を 5 mL の総容積で調製し、25 mL の水で洗浄し、25 mL の負荷バッファーで平衡させた。濾過した細胞抽出物は、毎分 0.5 mL でカラムに負荷した。カラムを、分画回収が始まる点である A_{280} のベースラインまで負荷バッファーで洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー (50 mM リン酸塩 ; 300 mM の $NaCl$ 、10% グリセロール、pH 6.0) で洗浄した。 A_{280} 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 500 mM イミダゾール勾配で展開した。1 mL の分画を回収し、SDS-PAGE 及び銀染色又はアルカリホスファターゼ (Qiagen) に複合した Ni²⁺-NTA でのウェスタンブロットで分析した。溶離した His₁₀-タグ PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431 又は PRO7476 を含む画分をプールして負荷バッファーで透析した。

【0252】

あるいは、IgG タグ (又は Fc タグ) PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431 又は PRO7476 の精製は、例えば、プロテイン A 又はプロテイン G カラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

PCR 増幅に続いて、各コード化配列をバキュロウィルス発現ベクター (IgG 融合のための pb.PH.IgG 及びポリ-His タグタンパク質のための pb.PH.His.c) 中にサブクローニングし、ベクターと Baculogold (商品名) バキュロウィルス DNA (PharMingen) を 105 の *Spodoptera frugiperda* (「Sf9」) 細胞

(ATCC CRL 1711)中にリポフェクチン(Gibco-BRL)を用いて同時形質移入した。pb.PH. I g G及びpb.PH.Hisは商業的に利用できるバキュロウィルス発現ベクターpVL1393(Pharmingen)の改変物で、His又はFcタグ配列を含む修飾ポリリンカー領域を持つ。10%FBSを補填したHinkのTNM-FH培地(Hyclone)で細胞を増殖させた。細胞を28℃で5日間インキュベートした。上清を収集し、続いて10%FBSを補填したHinkのTNM-FH培地中のSf9細胞を10のおよその感染効率(MOI)で感染させることにより最初のウィルス増幅に使用した。細胞を28℃で3日間インキュベートした。上清を収集し、バキュロウィルス発現ベクター中における作成物の発現を、ヒスチジンタグタンパク質に対して25mLのNi²⁺-NTAビード(QIAGEN)へ、又はIgGタグタンパク質に対してプロテイン-AセファロースCL-4Bビード(Pharmacia)へ1mLの上清をバッチ結合させ、続いてSDS-PAGE分析を行って、クーマシーブルー染色により既知の濃度のタンパク質標準と比較することにより決定した。

【0253】

最初のウィルス増幅上清は、0.1のおよそのMOIでESF-921培地(Expression Systems LLC)中で増殖したSf9細胞の攪拌培養(500mL)を感染させるために使用した。細胞を28℃で3日間インキュベートした。上清を収集し、濾過した。攪拌培養の発現が確認されるまでバッチ結合とSDS-PAGE分析を必要に応じて繰り返した。

【0254】

形質移入細胞からの条件培地(0.5から3L)を遠心分離により収集して細胞を除去し、0.22ミクロンフィルターで濾過した。ポリ-Hisタグ作成物に対しては、Ni²⁺-NTAカラム(Qiagen)を使用してタンパク質作成物を精製した。精製前に、5mMの濃度まで条件培地にイミダゾールを添加した。条件培地を、4℃で4-5ml/minの流量で20mM HEPES、pH7.4、0.3MのNaClと5mMのイミダゾールを含むバッファーで平衡化した6mLのNi²⁺-NTAカラムに汲み上げた。充填後、カラムを更なる平衡化バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mのイミダゾールを含む平衡化バッファーで溶出さ

せた。高度に精製されたタンパク質は続いて25 mlのG25 Superfine (Pharmacia) カラムで10 mM HEPES、0.14 MのNaCl及び4%のマンニトール、pH 6.8を含む貯蔵バッファー中で脱塩し、-80℃で貯蔵した。

タンパク質のイムノアドヘシン (Fc含有) 作成物を次のようにして条件培地から精製した。20 mMのリン酸ナトリウムバッファー、pH 6.8で平衡化された5 mlのプロテインAカラム (Pharmacia) に条件培地を汲み上げた。充填後、100 mMのクエン酸、pH 3.5での溶出前にカラムを平衡化バッファーで十分に平衡化した。溶出したタンパク質を、275 mLの1 M Trisバッファー、pH 9を含むチューブ中に1 mlのフラクションを収集することにより即座に中和させた。高度に精製したタンパク質を上述のようにポリ-His タグタンパク質の貯蔵バッファー中に脱塩した。タンパク質の一様性はSDSポリアクリルアミドゲル (PEG) 電気泳動法とエドマン分解によるN末端アミノ酸配列決定により証明した。

【0255】

あるいは、修飾バキュロウイルス法をhigh5細胞取り込みに使用してもよい。この方法では、所望の配列をコードするDNAは、Pfu (Stratagene) 等の適当な系で増幅されても、又はバキュロウイルス発現ベクターの含まれるエピトープタグの上流 (5' -) に融合させてもよい。このようなエピトープタグは、ポリ-His タグ及び免疫グロブリンタグ (IgGのFc領域等) を含む。種々のプラスミドを用いることができ、pIE-1 (Novagen) 等の市販のプラスミドから誘導されたプラスミドを含む。pIE-1及びpIE-2ベクターは、安定に形質転換された昆虫細胞におけるバキュロウイルスie1プロモーターからの組換えタンパク質の構成的発現のために設計される。このプラスミドは複数のクローニング部位の方向においてのみ相違し、未感染昆虫細胞におけるie1媒介遺伝子発現に重要であることが知られた全てのプロモーター配列並びにhr5エンハンサー成分を含む。pIE-1及びpIE-2はie1翻訳開始部位を含み、融合タンパク質の製造に使用できる。簡単には、PROポリペプチドの所望の部分 (膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列など) を、5' 及び3' 領域に相補的なプライマーでのPCRにより増幅する。5' プライマーは隣接

する（選択された）制限酵素部位を導入してもよい。生成物は、次いで、選択された制限酵素で消化して発現ベクターにサブクローニングされる。例えば、p I E 1 - 1 の誘導体はヒト I g G (pb.PH.IgG) の F c 領域又は N A M E 配列の 8 ヒスチジン (pb.PH.His) タグ下流 (3 ' -) を含むことができる。好ましくは、確認のために、構築ベクターの配列の確認する。

【0256】

High-5細胞は、27℃、CO₂無し、ペン/ストレプト無し条件下で50%の集密度まで成長させた。150mmプレート各々について、30μgのPROポリペプチドを含むp I E ベースベクターを1mlのE x - 細胞培地（媒質：E x - 細胞401 + 1 / 100のL - G l u J R H Biosciences # 14401 - 78P（注：この媒質は軽感受性））と混合し、別の管において、100μlのセルフェクチン（CellFECTIN (Gibco BRL #10362-010)（ボルテックスで混合））を1mlのE x - 細胞培地と混合した。2つの溶液を混合し、室温で15分間インキュベーションした。8mlのE x - 細胞培地を2mlのDNA / セルフェクチン混合物に添加し、E x - 細胞培地で1回洗浄したHi 5細胞上に層形成させた。次いでプレートを暗室温でインキュベートした。次いでDNA / セルフェクチン混合物を吸引し、細胞をE x - 細胞で1回戦乗して過剰のセルフェクチンを除去した。30mlの新鮮なE x - 細胞培地を添加し、細胞を28℃で3日間インキュベートした。上清を回収して、バキュロウイルス感染ベクターでのPROポリペプチドの発現を、1mlの上清の25mLのヒスチジントグタンパク質用のNi - N T A ビーズ (Q I A G E N) 又はI g G タグタンパク質用のプロテインAセファロースC L - 4 B ビーズ (Pharmacia) へのバッチ結合、次いでクマシーブルー染色により周知の濃度のタンパク質標準と比較するS D S - P A G E 分析により測定した。

【0257】

形質移入細胞からの条件培地 (0 . 5 ~ 3 L) を、遠心分離により細胞を除去し0 . 22ミクロンフィルターを通して濾過することにより回収した。ポリ - H i s タグ作成物については、タンパク質作成物をNi - N T A カラム (Qiagen) を用いて精製した。精製前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加

した。条件培地を、0.3 MのNaCl及び5 mMイミダゾールを含む20 mMのHepes, pH 7.4バッファーで平衡化した6 mlのNi-NTAカラムに4-5 ml/分の流速で4 においてポンプ供給した。負荷後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25 Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10 mMのHepes、0.14 MのNaCl及び4%のマニトールを含む貯蔵バッファー、pH 6.8中で25 mlのG25 Superfine (Pharmacia) を用いて脱塩し、-80 で貯蔵した。

タンパク質のイムノアドヘシン (Fc含有) 作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、20 mMのリン酸ナトリウムバッファー, pH 6.8で平衡化した5 mlのプロテインAカラム (Pharmacia) に負荷した。負荷後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、100 mMのクエン酸, pH 3.5で溶離した。溶離したタンパク質は、1 mlの画分を275 mLの1 Mトリリスバッファー, pH 9を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-His タグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。PROポリペプチドの均一性はSDSポリアクリルアミドゲル及びエドマン (Edman) 分解によるN-末端アミノ酸配列決定及び所望又は必要に応じて他の分析手法により評価できる。

PRO6018, PRO7154, PRO7170、及びPRO7476は、上記のhigh-5細胞を用いたバキュウロウイルスの方法によって発現された。

【0258】

実施例17: PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476に結合する抗体の調製

この実施例は、PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476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、精製PRO5800、PRO6000、PRO6016、PRO6018、PRO6496、PRO7154、PRO7170、PRO7422、PRO7431又はPRO7476を含むPRO5800、PRO6000、PRO6016、PRO6018、PRO6496、PRO7154、PRO7170、PRO7422、PRO7431又はPRO7476融合タンパク質、細胞表面に組換えPRO5800、PRO6000、PRO6016、PRO6018、PRO6496、PRO7154、PRO7170、PRO7422、PRO7431又はPRO7476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。

【0259】

Balb/c等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に1-100マイクログラムで注入したPRO免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をMPL-TDMアジュバント(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで10から12日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗PRO5800、抗PRO6000、抗PRO6016、抗PRO6018、抗PRO6496、抗PRO7154、抗PRO7170、抗PRO7422、抗PRO7431、又は抗PRO7476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。

【0260】

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、PRO5800、PRO6000、PRO6016、PRO6018、PRO6496、PRO7154、PRO7170、PRO7422、PRO7431又はPRO7476の静脈内注射の最後の注入を行うことができる。3から4日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出した。次いで脾臓細胞を(35%ポリエチレングリコールを用いて)、ATCCから番号CRL1597で入手可能なP3X

63 AgU . 1等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン）培地を含む96ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

ハイブリドーマ細胞は、PRO5800, PRO6000, PRO6016, PRO6018, PRO6496, PRO7154, PRO7170, PRO7422, PRO7431又はPRO7476に対する反応性についてのELISAでスクリーニングされる。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。

【0261】

陽性ハイブリドーマ細胞を同系のBalb/cマウスに腹腔内注入し、抗PRO5800, 抗PRO6000, 抗PRO6016, 抗PRO6018, 抗PRO6496, 抗PRO7154, 抗PRO7170, 抗PRO7422, 抗PRO7431, 又は抗PRO7476モノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインA又はプロテインGへの親和性に基づくアフィニティクロマトグラフィーを用いることもできる。

【0262】

材料の寄託：

次の材料をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, 10801ユニバーシティ・ブルバード、マナッサス、バージニア20110-2209米国(ATCC)に寄託した：

材料	ATCC寄託番号	寄託日
DNA108912-2680	PTA-124	1999年5月25日
DNA102880-2689	PTA-383	1999年7月20日
DNA96881-2699	PTA-553	1999年8月17日
DNA98565-2701	PTA-481	1999年8月3日

DNA119302-2737	PTA-520	1999年8月10日
DNA108760-2740	PTA-548	1999年8月17日
DNA108722-2743	PTA-552	1999年8月17日
DNA119536-2752	PTA-551	1999年8月17日
DNA119542-2754	PTA-619	1998年8月31日
DNA115253-2757	PTA-612	1998年8月31日

【0263】

これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存培養物が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテク社と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。

【0264】

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

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

ないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に変形することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

【図面の簡単な説明】

【F i g 1】ヌクレオチド配列（配列番号：1）が、ここにおいてDNA 108912-2680と命名されたクローンである、天然配列PRO5800をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：1）。また、太字及び下線部は、それぞれ開始及び終止コドンである。

【F i g 2】F i g 1に示された配列番号：1のコード化配列より誘導された、天然配列PRO5800ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：2）。

【F i g 3】ヌクレオチド配列（配列番号：3）が、ここにおいてDNA 102880-2689と命名されたクローンである、天然配列PRO6000をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：3）。また、太字及び下線部は、それぞれ開始及び終止コドンである。

【F i g 4】F i g 3に示された配列番号：3のコード化配列より誘導された、天然配列PRO6000ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：4）。

【F i g 5】ヌクレオチド配列（配列番号：5）が、ここにおいてDNA 96881-2699と命名されたクローンである、天然配列PRO6016をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：5）。また、太字及び下線部は、それぞれ開始及び終止コドンである。

【F i g 6】F i g 5に示された配列番号：5のコード化配列より誘導された、天然配列PRO6016ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：6）。

【F i g 7】ヌクレオチド配列（配列番号：7）が、ここにおいてDNA 96565-2701と命名されたクローンである、天然配列PRO6018をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：7）。また、太字及び下線部は、それぞれ開始及び終止コドンである。

【F i g 8】F i g 7に示された配列番号：7のコード化配列より誘導された、天然配列PRO6018ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：8）。

【F i g 9】ヌクレオチド配列（配列番号：9）が、ここにおいてDNA 1 1 9 3 0 2 - 2 7 3 7と命名されたクローンである、天然配列PRO 6 4 9 6をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：9）。また、太字及び下線部は、それぞれ開始及び終止コドンである。

【F i g 1 0】 F i g 9に示された配列番号：9のコード化配列より誘導された、天然配列PRO 6 4 9 6ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：10）。

【F i g 1 1】ヌクレオチド配列（配列番号：11）が、ここにおいてDNA 1 0 8 7 6 0 - 2 7 4 0と命名されたクローンである、天然配列PRO 7 1 5 4をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：11）。また、太字及び下線部は、それぞれ開始及び終止コドンである。

【F i g 1 2】 F i g 1 1に示された配列番号：11のコード化配列より誘導された、天然配列PRO 7 1 5 4ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：12）。

【F i g 1 3】ヌクレオチド配列（配列番号：13）が、ここにおいてDNA 1 0 8 7 2 2 - 2 7 4 3と命名されたクローンである、天然配列PRO 7 1 7 0をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：13）。また、太字及び下線部は、それぞれ開始及び終止コドンである。

【F i g 1 4】 F i g 1 3に示された配列番号：13のコード化配列より誘導された、天然配列PRO 7 1 7 0ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：14）。

【F i g 1 5】ヌクレオチド配列（配列番号：15）が、ここにおいてDNA 1 1 9 5 3 6 - 2 7 5 2と命名されたクローンである、天然配列PRO 7 4 2 2をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：15）。また、太字及び下線部は、それぞれ開始及び終止コドンである。

【F i g 1 6】 F i g 1 5に示された配列番号：15のコード化配列より誘導された、天然配列PRO 7 4 2 2ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：16）。

【F i g 1 7】ヌクレオチド配列（配列番号：17）が、ここにおいてDN

A119542-2754と命名されたクローンである、天然配列PRO7431をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列(配列番号:17)。また、太字及び下線部は、それぞれ開始及び終止コドンである。

【Fig18】 Fig17に示された配列番号:17のコード化配列より誘導された、天然配列PRO7431ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:18)。

【Fig19】 ヌクレオチド配列(配列番号:19)が、ここにおいてDNA115253-2757と命名されたクローンである、天然配列PRO7476をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列(配列番号:19)。また、太字及び下線部は、それぞれ開始及び終止コドンである。

【Fig20】 Fig19に示された配列番号:19のコード化配列より誘導された、天然配列PRO7476ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:20)。

【図1】

CGGGTC**ATG**CGCCGCCCTGTGGCTGGGCCTGGCCTGGCTGCTGCTGGCGCGGGCGCCGGACGCCGCGGG
 AACCCCGAGCGCGTCCGCGGGACCGCGCAGCTACCCGCACCTGGAGGGCGACGTGCGCTGGCGGCGCCTCT
 TCTCCTCCACTCACTTCTTCTCCTGCGCGTGGATCCCGCGGGCCCGCTGCAGGGCACCCGCTGGCGCCACGGC
 CAGGACAGCATCCTGGAGATCCGCTCTGTACACGTGGCGTTCGTGGTCATCAAAGCAGTGTCTCAGGCTT
 CTACGTGGCCATGAACCGCGGGGCGCCTCTACGGGTCGCGACTCTACACCGTGGACTGCAGGTTCCGGG
 AGCGCATCGAAGAGAACGGCCACAACACCTACGCCTCACAGCGCTGGCGCCGCCGCGGCCAGCCCATGTTC
 CTGGCGCTGGACAGGAGGGGGGGCCCCGGCCAGGCGGCCGACGCGGGGTACCACCTGTCCGCCACTT
 CCTGCCCGTCTGGTCTCCT**TGAG**

【図2】

MRRRLWLG~~L~~WLLLLARAPDAAGTPSASRGPRSYPHLEGDVRWRR~~L~~FSSTHFFLRVDPGGRVQGTRWRHGQD
 SILEIRSVHVG~~V~~VVIKAVSSGFYVAMNRRGR~~L~~YGSRLYTVD~~C~~RFRERIEENGHN~~T~~YASQRWRRRGQPMFLA
 LDRRGGPRPGGRTRRYHLSAHFLPVLVS

シグナルペプチド: アミノ酸 1-17

N-ミリスチル化部位: アミノ酸 22-28

【図3】

GGATGGGCGAGCAGTCTGAATGCCAGAAATGGGATAACCGTTTTGCTACAGCATTGTGAATTGCTTGTGTGCT
 TAGCCTCATTTCCACCATCTACATGGCAGCCTCCATTGGCACAGACTTCTGGTATGAATATCGAAGTCCAG
 TTCAAGAAAATCCAGTGATTTGAATAAAAGCATCTGGGATGAATTCATTAGTGATGAGGCAGATGAAAAG
 ACTTATAATGATGCACCTTTTCGATAACAATGGCACAGTGGGATTTGTGGAGACGGTGTATCACCATACCCAA
 AAACATGCATTGGTATAGCCCACCAGAAAAGACAGAGTCATTTGATGTGGTCACAAAATGTGTGAGTTTCA
 CACTAACTGAGCAGTTCATGGAGAAAATTTGTTGATCCCGGAAACCACAATAGCGGGATTGATCTCCTTAGG
 ACCTATCTTTGGCGTTGCCAGTTCCTTTTACCTTTTGTGAGTTTAGGTTTGTATGTGCTTTGGGGCTTTGAT
 CGGACTTTGTGCTTGCATTTGCCGAAGCTTATATCCCACCATGGCCACGGGCATTCTCCATCTCCTTGCCAG
 ATACCATGCTGTGAAGTCCAGGCCACATGGAGGTGTCTGTGTAGATGCTCCAGCTGAAATCCCAGCTAA
 GCTCCCAACTGACAGCCAACATCATTTCAGCCATGTGTGGGAGCCATCCTGGATGTCCAGCCTTAACAAG
 CCTTCAGAGGACTTCAGCCACAGCTATTATCTTACTACATCCTTGTGAGACTCTAATAAAGAACCACTAG
 CTGAGCCCAATCAACCTATGGAAGTATAGAAAATAAAATGAATTGTTGTTTTGTGCCGTT

【図4】

MDNRFATAFVIACVLSLISTIYMAASIGTDFWYEYRSPVQENSSDLNKSIEWDEFISDEADEKTYNDALFRY
 NGTVGLWRRICITIPKNMHWSPPERTESFDVVTKCVSFTLTFEQFMEKFPVDPGNHNSGIDLLRITYLWRQCFL
 LPFVSLGLMCFGALIGLCACICRSLYPTIATGILHLLADTML

シグナルペプチド:	アミノ酸 1-20
膜貫通ドメイン:	アミノ酸 142-163
N-グリコシル化部位:	アミノ酸 42-46;47-51;72-76
N-ミリスチル化部位:	アミノ酸 123-129;154-160;158-164
原核生物膜リポタンパク質脂質付着部位:	アミノ酸 152-163

【図5】

GGGCCTGGCGATCCGGATCCCGCAGGCGCGCTGGCTGCGCTGCCGGCTGTCTGTGCTCATGGTGGGGCCC
 TGGGTGTATCTGGTGGCGGCAGTTTTGCTCATCGGCCTGATCCTCTTCCTGACTCGCAGCCGGGGTCGGGC
 GGCAGCAGCTGACGGAGAACCCTGCACAATGAGGAAGAGAGGGCAGGAGCAGGCCAGGTAGGCCGCTCTT
 TGCCCCAGGAGTCTGAAGAACAGAGAAGTGAAGCAGACCCCGGCGTCGGAGGGACTTGGGCAGCCGCTCTA
 CAGGCCAGCGCTCGAGCCAGCGAGTGGCCTGGGAAGACGGGGATGAGAATGTGGGTCAAACCTGTATTTCC
 AGCCAGGAGGAAGAAGGCATTGAGAAGCCAGCAGAAGTTCACCCAACAGGGAAAATTTGGAGCCAAGAAAC
 TACGGAAGCTAGAGGAAAAACAGGCTCGAAAGGCTCAGCGAGAGGCAGAGGAGGCTGAACGTGAAGAACGG
 AAACGCCTAGAGTCCCACGCTGAGGCCGAATGGAAGAAGGAAGGAACGGCTTCGCCTGAAGGAAGAACA
 GAAGGAGGAGGAAGAGAGGAAGGCTCAGGAGGAGCAGGCCCGGCGGGATCACGAGGAGTACCTGAACTGA
 AGGAGGCCTTCGTGGTAGAAGAAGAAGGTGTTAGCGAAACCATGACTGAGGAGCAGTCTCACAGCTTCTCTG
 ACAGAATTCATCAATTACATCAAGAAGTCCAAGTTGTGCTTTTGGAAAGATCTGGCTTTCCAGATGGGCCCT
 AAGGACTCAGGACGCCATAAACCGCATCCAGGACCTGCTGACGGAGGGGACTCTAACAGGTGTGATTGACG
 ACCGGGGCAAGTTTTATCTACATAACCCAGAGGAACGGCTGCCGTGGCCAATTTTCATCCGACAGCGGGGC
 CGGGTGTCCATCACAGAGCTTGCCAGGCCAGCAACTCCCTCATCTCCTGGGGCCAGGACCTCCCTGCCCA
 GGCTTCAGCCTGACTCCAGTCCCTTCCCTTGAGTGTATCCTGTGGCCTACATGTGTCTTCATCTCCCTAAT
 GCCGTCTTGGGGCAGGGATGGAATATGACCAGAAAGTTGTGGATTAAAGGCCTGTGAATACTGAA

【図6】

MVGPWVYLVAAVLLIGLILFLTRSRGAAAADGEPLHNEERAGAGQVGRSLPQEESEEQRTGSRPRRRRDL
GSRLQAQRRAQRVAVEDGDENVGQTVIPAQEEEGIEKPAEVHPTGKIGAKKLRKLEEKQARKAQREAEAE
REERKRLESQREAEWKKEERLRLKEEQKEEERKAQEEQARRDHEEYLKLEAFVVEEGVSETMTEEQS
HSFLTEFINIYIKSKVLLLEDLAFQMGLRTQDAINRIQDLLTEGTLTGVIDDRGKFIYITPEELAAVANFI
RQRGRVSITELAQASNSLISWGQDLPAQASA

シグナルペプチド: アミノ酸 1-26

N-ミリスチル化部位: アミノ酸 203-209;257-263

【図7】

GCTCTATGCCGCCTACCTTGCTCTCGCCGCTGCTGCCGGAGCCGAAGCAGAGAAGGCAGCGGGTCCCGTGA
CCGTCCCGAGAGCCCGCGCTCCCGACCAGGGGGCGGGGGCGCCCCGGGGAGGGCGGGGCAGGGGCGGGG
GGAAGAAAGGGGGTTTTGTGCTGCGCCGGAGGGCCGGCGCCCTCTCCGAATGTCTGCGCCCCAGCCT
CTCCTCAGCCTCGCGCAGTCTCCGCCGAGTCTCAGTGCAGCTGCAGGACTGAGCCGTGACCCCGAGGA
GACCCCGGAGGAGGCGACAAACTTCGAGTCCCGCAGCCCAACCCAGCCCTGGGTAGCCTGCAGCATGG
CCCAGCTGTTCCCGCCCTGCTGGCAGCCCTGGTCTGGCCAGGCTCCTGCAGCTTTAGCAGATGTTCTG
GAAGGAGACAGCTCAGAGGACCGGCTTTTCGCGTGCGCATCGCGGGCGACGCGCCACTGCAGGGCGTGCT
CGGGCGGCCCTACCATCCCTTGCCACGTCCACTACTGCGGCCACCGCCGAGCCCGGGGTGTGCTGG
GCTCTCCGCGGGTCAAGTGGACTTTCTGTCCCGGGGGCGGGAGGCAGAGGTGCTGGTGGCGGGGAGTG
CGCGTCAAGGTGAACGAGGCTACCGGTTCCGCGTGGCACTGCCTGCCTACCCAGCTCGCTCAGCCGACGT
CTCCCTGGCGCTGAGCGAGCTGCGCCCAACGACTCAGGTATCTATCGCTGTGAGGTCCAGCACGGCATCG
ATGACAGCAGCGACGCTGTGGAGGTCAAGGTCAAGGGTCTGCTTTCTTACCAGAGGGCTCTGCCCGC
TATGCTTTCTCTTTCTGGGGCCAGGAGGCTGTGCCCGATTGGAGCCACATCGCCACCCCGGAGCA
GCTCTATGCCGCCTACCTTGCGGGCTATGAGCAATGTGATGCTGGCTGGCTGTGGATCAGACCGTGAGGT
ATCCCATCCAGACCCACGAGAGGCTGTACGGAGACATGGATGGCTTCCCGGGTCCGGAACATATGGT
GTGGTGGACCCGGATGACCTCTATGATGTGTACTGTTATGCTGAAGACCTAAATGGAGAACTGTTCCGG
TGACCCCTCCAGAGAAGCTGACATTGGAGGAAGCACGGGCTACTGCCAGGAGCGGGGTGCAGAGATTGCCA
CCACGGGCAACTGTATGCAGCCTGGGATGGTGGCTGGACCACTGCAGCCAGGGTGGCTAGCTGATGGC
AGTGTGCGCTACCCATCGTCACACCCAGCCAGCGCTGTGGTGGGGGCTTGCCTGGTGTCAAGACTCTCTT
CCTCTTCCCAACCAGACTGGCTTCCCAATAAGCACAGCCGCTTCAACGTCTACTGCTTCCGAGACTCGG
CCCAGCCTTCTGCCATCCCTGAGGCCTCAACCCAGCCTCAACCCAGCCTCTGATGGACTAGAGGCTATC
GTCACAGTGACAGAGACCCCTGGAGGAAGTGCAGTGCCTCAGGAAGCCACAGAGAGTGAATCCCGTGGGC
CATCTACTCCATCCCATCATGGAGGACGGAGGAGGTGGAAGCTCCACTCCAGAAGACCCAGCAGAGGCC
CTAGGACGCTCCTAGAATTTGAAACACAATCCATGGTACCGCCACGGGGTCTCAGAAGAGGAAGGTAAG
GCATTGGAGGAAGAAGAGAAATATGAAGATGAAGAAGAGAAAGAGGAGGAAGAAGAGGAGGAGGTGGA
GGATGAGGCTCTGTGGGCATGGCCAGCGAGCTCAGCAGCCCGGGCCCTGAGGCCTCTCTCCCACTGAGC
CAGCAGCCAGGAGAAGTCACTCTCCAGGCGCCAGCAAGGGCAGTCCCTGCAGCTGGTGCATCACCCTT
CCTGATGGAGAGTCAAGAAGCTTCCAGGCCTCAAGGGTCCATGGACCACCTACTGAGACTTGCCTACTCC
CAGGGAGAGGAACCTAGCATCCCATCACCTTCCACTCTGGTTGAGGCAAGAGAGGTGGGGGAGGCAACTG
GTGGTCTGAGCTATCTGGGGTCCCTCGAGGAGAGAGCGAGGAGACAGGAAGCTCCGAGGGTGCCTTCC
CTGCTTCCAGCCACAGGGCCCTGAGGGTACCAGGGAGCTGGAGGCCCTCTGAAGATAATTTGGAAG
AACTGCCCCAGCAGGGACCTCAGTGCAGGCCAGCCAGTGTGCTGCCACTGACAGCGCCAGCCGAGGTGGAG
TGGCCGTGGTCCCGCATCAGGTGACTGTGTCCCGAGCCCTGCCACAATGGTGGGACATGCTTGGAGGAG
GAGGAAGGGGTCCGCTGCCATGTCTGCCTGGCTATGGGGGGACCTGTGCGATGTTGGCTCCGCTTCTG
CAACCCCGCTGGGACGCCCTCCAGGGCGCTGCTACAAGCACTTTTCCACACGAAGGAGCTGGGAGGAGG
CAGAGACCCAGTGCCGGATGTACGGCGCGCATCTGGCCAGCATCAGCACACCCGAGGAACAGGACTTCATC
AACAAACGGTACCAGGAGTACCAGTGGATCGGACTCAACGACAGGACCATCGAAGGCGACTTCTTGTGGTC
GGATGGCGTCCCCCTGCTCTATGAGAACTGGAACCTGGGCGCCTGACAGCTACTTCTGTCTGGAGAGA
ACTGCGTGGTCACTGGTGTGGCATGATCAGGGACAATGGAGTGACGTGCCCTGCAACTACCACCTGTCTTAC
ACCTGCAAGATGGGGTGGTGTCTGTGGGCCGCCACCGGAGCTGCCCTGGCTCAAGTGTTCGGCCGCC
ACGGCTGCGCTATGAGGTGGACTGTGCTTCGCTACCGGTGCCGGGAAGGACTGGCCAGCGCAATCTGC
CGCTGATCCGATGCCAAGAGAACGGTGGTGGGAGGCCCCAGATCTCTGTGTGCCAGAGACCTGCC
CGAGCTCTGCACCCAGAGGAGGACCCAGAAGGACGTGAGGGGAGGCTACTGGGACGCTGGAAGGCGCTGTT
GATCCCCCTTCCAGCCCATGCCAGGTCCCTTAGGGGGCAAGGCCTTGAACACTGCCGGCCACAGCACTGC
CCTGTCAACCCAAATTTTCCCTCACACCTTGCCTCCCGCCACACAGGAAGTGACAACATGACGAGGGGTG
GTGCTGGAGTCCAGGTGACAGTTCTGAAAGGGGCTTCTGGGAAATACCTAGGAGGCTCCAGCCAGCCAG
GCCCTCTCCCTTACCTGGGCACCAGATCTTCCATCAGGGCCGGAGTAAATCCCTAAGTGCCTCAACTGC
CCTCTCCCTGGCAGCCATCTGTCCCTCTATTCTCTAGGGAGCACTGTGCCACTCTTTCTGGGTTTTTC
CAAGGGAATGGGCTTGCGAGGTGGAGTGTCTGTAATAATCAACAGGAAATAAACTGTGTATGAGCCCA

【図8】

MAQLFLPLLAALVLAQAPAALADVLEGDSSSEDRAFRVRIAGDAPLQGVLGALTI PCHVHYLRPPPSRRAV
 LGSPRVKWTFLSRGREAEVLVARGVRVKVNEAYRFRVALPAYPASLTDVSLALSELRPNDSGIYRCEVQHG
 IDSSDAVEVKVKGVVFLYREGSARYAFSFGAQEACARIGAHIAATPEQLYAAAYLGGYEQCDAGWLSQTV
 RYPIQTPREACYGDMDFPGVRNYGVVDPDDLVDVYCYAEDLNGELFLGDPPEKLTLEEARAYCQERGAEI
 ATTGQLYAAWDGGLDHCSPGWLADGVSRYPIVTPSQRCGGGLPGVKTLFLFPNQTGFPNKHSRPNVYCFRD
 SAQPSAIPASNPASNPASDGLAIVTVTETLEELQLPQEATESESRGAIYSIPIMEDGGGSSSTPEDPAE
 APRTLLEFETQSMVPPTGFSEEEGKALEEEEEKYEDEEEKEEEEEVEDEALWAWPSELSSPGPEASLPT
 EPAAQEKSLSQAPARAVLQPGASPLPDGESEASRPPRVHGPPTETLPTPRERNLASPSPSTLVEAREVGEA
 TGGPELGSVPRGESEETGSSEGAPSLLPATRAPEGTRELEAPSEDNSGRTAPAGTSVQAQPVLPDTSASRG
 GVAVVPASGDCVSPCHNGGTCLEEEEGVRCLCLPGYGGDLCDVGLRFCNPGWDAFQGACYKHFSTRRSWE
 EAETQCRMYGAHLASISTPEEQDFINNRYREYQWIGLNDRTIEGDFLWSDGVPLLYENWNPGQPDYFLSG
 ENCVVMVWHDQGWSDVPCNYHLSYTCMKMLVSCGPPPELPLAQVFGPRRLRYEVDTVLRYRCREGLAQRN
 LPLIRCQENGRWEAPQISCVPRRPARALHPEEDPEGRQGRLLGRWKALLIPPSSMPGP

シグナルペプチド:	アミノ酸 1-15
N-グリコシル化部位:	アミノ酸 130-134;337-341
チロシンキナーゼリン酸化部位:	アミノ酸 128-136;451-460
N-ミリスチル化部位:	アミノ酸 47-53;50-56;133-139; 142-148;174-180;183-189;281-287; 288-294;297-303;324-330;403-409; 414-420;415-421;576-582;586-592; 677-683;684-690;720-726;772-778; 811-817
EGF-様ドメインシステインパターンシグネチャー:	アミノ酸 670-682
C-型レクチンドメインシグネチャー:	アミノ酸 784-809
免疫グロブリン及び主要組織適合複合体タンパク質シグネチャー:	アミノ酸 135-142
リンクドメインタンパク質:	アミノ酸 166-216;264-314
カルシウム結合EGF-様ドメインタンパク質パターンタンパク質:	アミノ酸 655-676
C-型レクチンドメインタンパク質:	アミノ酸 791-800

【図 9】

CCCACTCGGCGGTTTGGCGGGAGGGAGGGGCTTTGCGCAGGCCCCGCTCCCGCCCCGCTCC**ATG**CGGCC
 GCCCCGATTGCGCTGTGGCTGCGCCTGGTCTTGGCCCTGGCCCTTGTCCGCCCCGGGCTGTGGGGTGGGC
 CCCGGTCCGAGCCCCCATCTATGTCAAGCAGCTGGGCCGTCCAGGTGTCCAGGGTAACCGGGAGGTGAGC
 GCCTGGCAGCAAATTCGGCTTCGTCAACCTGGGGCCGATCTTCTCTGACGGGCAGTACTTTCACCTGCGG
 CACCGGGCGTGGTCCAGCAGTCCCTGACCCCGCACTGGGGCCACCGCCTGCACCTGAAGAAAAACCCCAA
 GGTGCAGTGGTCCAGCAGCAGACGCTGCAGCGGGGGTGAAACGCTCTGTCTGGTGGCCACGGACCCCT
 GGTCTCCAAGCAGTGGTACATGAACAGCGAGGCCAACAGACCTGAGCATCCTGCAGGCCTGGAGTCAG
 GGGCTGTCAAGCCAGGGCATCGTGGTCTCTGTGCTGGACGATGGCATCGAGAAGGACCACCCGGACCTCTG
 GGCAACTACGACCCCTGGCCAGCTATGACTTCAATGACTACGACCCGGACCCCGACCCCGCTACACCC
 CCAGCAAAGAGAACCGGCACGGGACCCGCTGTGCTGGGGAGGTGGCCGCGATGGCCACAATGGCTTCTGT
 GGTGTGGGGTTCGCTTTCACGCCCGAATCGGAGGCGTACGGATGCTGGACGGTACCATCACCGATGTCAT
 CGAGGCCAGTTCGCTGAGCCTGCAGCCGACACATCCACATTTACAGCGCCAGCTGGGGTCCCGAGGACG
 ACGGCCGACGGTGGACGGCCCCGGCATCCTCACCCGAGGCGCTTCCGGCGTGGTGTGACCAAGGGCCGC
 GCGGGGCTGGGCACGCTTTCATCTGGGCCTCGGGCAACGGCGGCCTGCACACGAACTGCAACTGCGA
 CGGTACACCAACAGCATCCACACGCTTTCGGTGGGCAGCACCCAGCAGGGCCGCTGCCCTGGTACA
 GCAAGCCTGCGCTCCACCTCACACACCTACAGCAGCGGCGTGGCCACCGACCCCGAGATCGTCACC
 ACGGACCTGCATCACGGGTGCACAGACCAGCACACGGGCACCTCGGCCTCAGCCCCACTGGCGGCCGGCAT
 GATCGCCCTAGCGCTGGAGGCCAACCCGTTCTGACGTGGAGAGACATGCAGCACCTGGTGGTCCGCGCGT
 CCAAGCCGGCGCACCTGCAGGCCGAGGACTGGAGGACCAACGGCGTGGGGCGCCAAGTGAAGCCATCACTAC
 GGATACGGGCTGCTGGACGCCGGGCTGCTGGTGGACACCGCCCGCACCTGGCTGCCACCCAGCCGACAG
 GAAGTGCGCCGTCGGGTCCAGAGCCGCCACCCCATCCTGCCGCTGATCTACATCAGGGAAAACGTAT
 CGGCCTGCGCCGGCTCCACAACCTCCATCCGCTCGCTGGAGCACGTGCAGGCGCAGCTGACGCTGTCTAC
 AGCCGGCGGGAGACCTGGAGATCTCGCTACCAGCCCCATGGGCACGCGCTCCACACTCGTGGCCATACG
 ACCCTTGGACGTGACACTGAAGGCTACAACAACCTGGGTCTTCATGTCCACCCACTTCTGGGATGAGAACC
 CACAGGGCGTGTGGACCTGGGCCTAGAGAACAAGGGCTACTATTTCAACACGGGGACGTTGTACCGCTAC
 ACGCTGCTGCTCTATGGGACGGCCGAGGACATGACAGCGCGGCTACAGGCCCCAGGTGACCAGCAGCGC
 GTGTGTGACGCGGACACAGAGGGGCTGTGCCAGGCGTGTGACGGCCCCGCTACATCCTGGGACAGCTCT
 GCCTGGCCTACTGCCCCCGCGGTTCTTCAACCACACAAGGCTGGTGAACGCTGGGCCACACGGCG
 GCGCCCGCGCTGAGGGTCTGCTCCAGCTGCCATGCCCTCTGCTACACCTGCCGCGGGCGCTCCCCGAGGGA
 CTGCACCTCCTGTCCCCATCCTCCACGCTGGACCAGCAGCAGGGCTCCTGCATGGGACCCACCACCCCG
 ACAGCCGCCCGGGCTTAGAGCTGCCGCTGTCCCCACCACCGCTGCCAGCCTCGGCCATGGTGTGAGC
 CTCCTGGCCGTGACCTCGGAGGCCCCGTCTCTGCGGCATGTCCATGGACCTCCCACTATACGCCTGGCT
 CTCCCGTGCCAGGGCCACCCCAACCAACCCAGGCTGGCTGCCAGCTGGAACCT**TGA**AGTTGTCAGCTCA
 GAAAGCGACCTTGCCCCCGCTGGGTCCCTGACAGGCACTGCTGCCATGCTGCCTCCCGAGGCTGGCCCA
 GAGGAGCGAGCACCAGCACCAGCCTGGCCTGCCAGGATGGGCCCGTGGAAACCCGAAGCCTGGCGG
 GAGAGAGAGAGAGAAGTCTCTCTGCATTTTGGGTTTGGGCAGGAGTGGGCTGGGGGGAGAGGCTGGAG
 CACCCAAAAGCCAGGGGAAAGTGGAGGGAGAGAAACGTGACACTGTCCGTCTCGGGCACCGCGTCCAACC
 TCAGAGTTGCAAATAAGGTTGCTTAGAAGTGAA

【図12】

MAELPGPFLCGALLGFLCLSGLAWEVKVPTEPLSTPLGKTAELTCTYSTSVGDSFALEWSFVQPKPISES
 HPILYFTNGHLYPTGSKSKRVSLQNPPTVGVATLKLTDVHPSDTGTLYLCQVNNPPDFYTNGLGLINLTVL
 VPPSNPLCSQSGQTSVGGSTALRCSSEGAPKPVYNWVRLGTFPTPSPGSMVQDEVSGQLILTNLSLTSSG
 TYRCVATNQMGASCELTLSVTPEPSQGRVAGALIGVLLGVLLLSVAAFCLVRFQKERGKPKETYGGSDLR
 EDIAIPGISEHTCMRADSSKGFLERPSSASTVTTTTKSLPMVV

シグナルペプチド:	アミノ酸 1-20
膜貫通ドメイン:	アミノ酸 242-260
N-グリコシル化部位:	アミノ酸 138-142;206-210
環状AMP-及び環状GMP-依存性タンパク質リン酸化酵素リン酸化部位:	アミノ酸 90-94
N-ミリスチル化部位:	アミノ酸 11-17;117-123;159-165; 213-219;224-230;244-250;248-254
アミド化部位:	アミノ酸 270-274
原核生物膜リポタンパク質脂質付着部位:	アミノ酸 218-229

【図13】

GGAAAAGGTACCCGCGAGAGACAGCCAGCAGTTCTGTGGAGCAGCGGTGGCCGGCTAGGATGGGCTGTCTC
 TGGGGTCTGGCTCTGCCCTTTTCTTCTTCTGCTGGGAGGTGGGGTCTCTGGGAGCTCTGCAGGCCCCAG
 CACCCGAGAGCAGACTGCGATGACAACGGACGACACAGAAGTGCCCGCTATGACTCTAGCACCCGGGCC
 ACGCCGCTCTGGAAACTCAAACGCTGAGCGCTGAGACCTTCTTAGGGCCTCAACCCAGCCGGCCCCATT
 CCAGAAGCAGAGACCAGGGGAGCCAAGAGAAATTTCCCTGCAAGAGAGACCAGGAGTTTCACAAAAACATC
 TCCCAACTTCATGGTGCTGATCGCCACCTCCGTGGAGACATCAGCCGCGAGTGGCAGCCCCGAGGGAGCTG
 GAATGACCACAGTTGACACATCACAGGCAGTGATCCCGAGGAAGCCATCTTTGACACCTTTGCACCGAT
 GACAGCTCTGAAGAGGCAAGACACTCACAATGGACATATGACATTGGCTCACACCTCCACAGAAGCTAA
 GGGCCTGTCTCAGAGAGCAGTGCCCTTCCGACGGCCCCATCCAGTCATCACCCCGTCACGGGCTCAG
 AGAGCAGCGCCTTCCGACGGCCCCATCCAGTCATCACCCCGTCACGGGCTCAGAGAGCAGCGCCTCT
 TCCGACGGCCCCATCCAGTCATCACCCCGTCATGGTCCCGGGATCTGATGTCACCTCTCCCTCGCTGAAGC
 CCTGGTACTGTACAAACATCGAGGTTATTAATTGCAGCATCACAGAAATAGAAACAACAACCTTCCAGCA
 TCCCTGGGGCCTCAGACATAGATCTCATCCCCACGGAAGGGTGAAGGCCTCGTCCACCTCCGATCCACCA
 GCTCTGCCTGACTCCACTGAAGCAAAACACACATCACTGAGGTCACAGCCTCTGCCGAGACCCTGTCCAC
 AGCCGGCACCACAGAGTCAGCTGCACCTCATGCCACGGTTGGGACCCCACTCCCCACTAACAGCGCCACAG
 AAAGAGAAGTGACAGCACCCGGGGCCACGACCTCAGTGGAGCTCTGGTACAGTTAGCAGGAATCCCCTG
 GAAGAAACCTCAGCCCTCTCTGTTGAGACACCAAGTTACGTCAAAGTCTCAGGAGCAGCTCCGGTCTCCAT
 AGAGGCTGGGTGAGCAGTGGGCAAAACAACCTTCTTGTGGGAGCTCTGCTTCCCTCCTACAGCCCCCTCGG
 AAGCCGCCCTCAAGAACTTCAACCCCTCAGAGACACCGACCATGGACATCGCAACCAAGGGGCCCTTCCCC
 ACCAGCAGGGACCCTTTCCTTCTGTCCCTCCGACTACAACCAACAGCAGCCGAGGGACGAACAGCACCTT
 AGCCAAGATCACAACTCAGCGAAGACCAGATGAAGCCCCAACAGCCACGCCACGACTGCCCGGACGAG
 GCCGACCACAGACGTGAGTGCAGGTGAAAATGGAGGTTTCTCTCTCTGCGGCTGAGTGTGGCTTCCCCGG
 AAGACCTCACTGACCCAGAGTGGCAGAAAGGCTGATGCAGCAGCTCCACCGGAACTCCACGCCACGCG
 CCTCACTTCCAGGCTCTCTTACTGCGTGTGAGGAGGCTAACGGACATCAGCTGCAGCCAGGCATGTCCC
 GTATGCCAAAAGAGGGTGTGCCCCTAGCCTGGGCCCCACCGACAGACTGCAGCTGCGTTACTGTGCTGA
 GAGGTACCCAGAAGGTTCCCATGAAGGGCAGCATGTCCAAGCCCCAACCAGATGTGGCAACAGGACCC
 TCGCTCACATCCACCGAGTGTATGTATGGGGAGGGCTTCACTGTTCCAGAGGTGTCTTGGACTCAC
 CTTGGCACATGTTCTGTGTTTCAGTAAAGAGAGACCTGATCACCCATCTGTGTGCTTCCATCTGCATTAA
 AATTCACTCAGTGTGGCCCAAAAAA

【図14】

MGCLWGLALPLFFFCWEVGVSGSSAGPSTRRADTAMTTDDTEVPAMTLAPGHAALETQTLAETSSRASTP
 AGPIPEAETRGAKRISPARETRSFTKTSNFMVLIATSVETSAASGSPEGAGMTTVQITIGSDPEEAFDFT
 LCTDDSSSEEAKTLTMDILTLAHTSTEAKGLSSESSASSDGHVPVITPSRASESSASSDGHVPVITPSRASE
 SSASSDGHVPVITPSWSPGSDVTLLEALVTVTNIEVINCSITEIETTSSIPGASDIDLIPTEGVKASST
 SDPPALPDSTEAKPHITEVTASAETLSTAGTTESAAPHATVGTPLPTNSATEREVTAPGATTLGALVTVS
 RNPLEETSALSVETPSYVKVSGAAPVSI EAGSAVGKTTSFAGSSASSYSPSEAALKNFTPSETPTMDIATK
 GPFPTSRDPLPSVPPPTTNSRGTNSTLAKITTSAKTTMKPQQPRPRLPGRGRPQT

シグナルペプチド： アミノ酸 1-25

N-グリコシル化部位： アミノ酸 252-256;445-449;451-455

環状AMP-及び環状GMP依存性タンパク質リン酸化酵素リン酸化部位：
 アミノ酸 84-88

N-ミリスチル化部位： アミノ酸 2-8;19-25;117-123;
 121-127;232-238;278-284;314-320;
 349-355;386-392;397-403;449-455

ATP/GTP結合部位モチーフA (P-ループ)： アミノ酸 385-393

【図15】

ATGAGGAAGCTCCAGGGCAGGATGGTTTACCTGCCTGGACAGCAAGATGATGGCTACACTAGCCCCATTC
 TCTGGGCGCCTGGATTTGCCACCAGATCTCCTCACCTCTTGCCCTTCACCTCCTGCTGTACCTACAAGGT
 CTCCCCGATTCTCATCTGCCATAATCATGGACACAGCCCCAGGATGTGCAGGACTCTCAGGGACCATCTG
 GAGTTCCAGCTGGAATCTGGGCCTGGTGGAGTGGGAGTGGGCAGGGCCTGCATTGGGCTGACTTAGAGA
 GCACAGTTATTCCATCCATATGGAAATTAACATTTTGGATTTCCTGATC

【図16】

MMATLAPILWAPGFHAISSPLALHLLLYLQGLPDSHLPIMDTAPGCAGLSGTIWSSWNLGLVEWEGR
 GLHWADLESTVPSIWK

シグナル配列： アミノ酸 1-15

N-ミリスチル化部位： アミノ酸 32-38;50-56;53-59;72-78

【図17】

TTTGAGTGGGGTCTCTCTGGCCTCCTGCCCCCTCTGCTGCTGCTGCTGCTTCCATTGCTGGCAGCCCA
 GGGTGGGGGTGGCCTGCAGGCAGCGCTGCTGGCCCTTGAGGTGGGGCTGGTGGGTCTGGGGGCCTCCTACC
 TGCTCCTTTGTACAGCCCTGCACCTGCCCTCCAGTCTTTTCTACTCCTGGCCCAGGGTACCGCACTGGGG
 GCCGTCTGGGCTGAGCTGGCGCCGAGGCCCTCATGGGTGTTCCCTGGGCCTTGGAGCTGCCTGGCTCTT
 AGCTTGGCCAGGCCTAGCTCTACCTCTGGTGGCTATGGCAGCGGGGGCAGATGGGTGCGGCAGCAGGGCC
 CCCGGGTGCGCGGGGCATATCTCGACTCTGGTTGCGGGTCTGCTGCGCCTGTACCCATGGCCTTCCGG
 GCCCTGCAGGGCTGTGGGGCTGTGGGGACCGGGGTCTGTTTGCAGTGTACCCCAAAACCAACAAGGATGG
 CTTCCGCAGCCGCTGCCCGTCCCTGGGCCCGGGCGGCTAATCCCCGCACCACCAACCCATTAGCTC
 TGTGGCAAGGGTCTGGGTCTGTGCAAGGGCTGGAAGTGGCGTCTGGCACGGGCCAGCCAGGGTTTAGCA
 TCCCACTTGGCCCCGTGGGCCATCCACACACTGGCCAGCTGGGGCCTGCTTCGGGGTGAACGGCCACCCG
 AATCCCCGGCTACTACCACGCAGCCAGCGCCAGCTAGGGCCCCCTGCCTCCCGCCAGCCACTGCCAGGGA
 CTCTAGCCGGGGGAGGTCACGCACCCGCCAGTCCCGGGCCCTGCCCCCTGGAGGTAGCTGACTCCAGCC
 CTTCCAGCCAAATCTAGAGCATTGAGCACTTTATCTCCACGACTCAGTGAAGTTTCTCCAGTCCCTAGT
 CCTCTCTTTTACCCACCTTCCTCAGTTTGTCTACTTACCCAGGCCAGCCCTTCGGACCTCTAGACAGG
 CAGCCTCCTCAGCTGTGGAGTCCAGCAGTCACTCTGTGTTCTCCTGGCGCTCCTCCCTAAGTTATTGCTG
 TTCGCCCCGTGTGTGCTCATCCTCACCTCATGACTCAGGCCTGGGGCCAGGGGTGGTGGAGGGTGGG
 AAGAGTCATGTTTTTTTCTCCTCTTTGATTTTGTTTTTTCTGCTCCCTTCCAACCTGTCCCCTCCCCC
 ACCAAAAAAXXX
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図18】

MGVPLGLGAAWLLAWPGLALPLVAMAAGGRWVRQGPVRRGISRLWLRVLLRLSPMAFRALQCGAVGDR
 GLFALYPKTNKDGFRSRLPVPGRRRNPRTTQHPLALLARVWVLCKGWNWRLARASQGLASHLPPWAIHTL
 ASWGLLRGERPTRIPRLLPRSQRLGPPASRQPLPGTLAGRRSRTRQSRALPPWR

シグナルペプチド:

アミノ酸 1-21

N-ミリスチル化部位:

アミノ酸 2-8;6-12;146-152;178-184

アミド化部位:

アミド化 181-185

【図19】

ATCCCTCGACCTCGACCCACGCGTCCGCTGGAAGGTGGCGTGCCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTCC
 CACTGGCCCTGTGTCTCGTCTGCCTGCTGGTACACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAG
 GCGTTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCCCCGAGCTCGGAGAGTACCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGA
 GAACAACAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGCCCTCCCCACCACCCCTTTGAGACCAAGACG
 TGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTTACCCGCTACGTGACCGATGGGCCGTGCCGACGCGCAAG
 CCGGTACCGAGCTGGTGTCTCCGGCCAGTGGCGCCCGCGCGCCTGCTGCCAACGCCATCGGCCGCGG
 CAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCGGACTTCCGCTGCATCCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGGTGCAGC
 TGCTGTGTCCCGGTGGTGAAGCGCCGCGCGCGCAAGTTCGCGCTGGTGGCCTCGTGCAGTGAAGCGC
 CTCACCCGCTTCCACAACCAGTCCGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCCGCTCGGCCGAGAAGGGCCG
 GAAGCCGCGGCCCGCGCCCGGAGCGCCAAAGCCAACCAGGCCGAGCTGGAGAACGCCCTACTAGAGCCCGC
 CCGCGCCCTCCCCACCAGCGGGCGCCCGCCCTGAACCCGCGCCCCACATTTCTGTCTCTGCGCGTGG
 TTTGATTGTTTATATTTTCATTGTAAATGCCTGCAACCCAGGGCAGGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAG
 GAATCCCGGGCGCCGGCAAGGCCCCCTCAGCCCGCCAGCTGAGGGGTCCCACGGGGCAGGGGAGGGAATT
 GAGAGTCACAGACACTGAGCCACGCAGCCCGCCTCTGGGGCCGCTACCTTTGCTGGTCCCACCTTCAGAG
 GAGGCAGAAATGGAAGCATTTTCACCGCCCTGGGGTTTTAAGGGAGCGGTGTGGGAGTGGGAAAGTCCAGG
 GACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGACCTCGCTGCCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGCC
 AGAGCACAAAGACTGGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTAACTTCTGTGTAAC
 CTTGAACTACAAATTTCTCTTCGGGACCTCAATTTCCACTTTGTAATAAGGGTGGAGGTGGGAATAGG
 ATCTCGAGGAGACTATTGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGCAGAGGTGAGAGAGA
 GAGAGAGAAAGAGAGAGAAATGAATGCAGTTGCATTGATTCAGTGCCAAGGTCACTTCCAGAAATTCAGAGTT
 GTGATGCTCTCTTGACAGCCAAAGATGAAAAACAACGAAAAAAAAAAGTAAAGAGTCTATTTATGGC
 TGACATATTTACGGCTGACAACTCCTGGAAGAAGCTATGCTGCTTCCCAGCCTGGCTTCCCCGGATGTTT
 GGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCCATTGGGGTAGAAAAGGAGGGTCCGAGGG
 TGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCAACTTCCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCGACCCATAGCC
 ATGTTTTAAAGTACCTTCCGAAGAGAAGTGAAGGTTCAAGGACTGGCCTTGCAGGCCGAGGGAGCA
 GCCATCACAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTTGGACACCGCCTTCTGCCACCACCTCACGGACACAT
 TTCTGCCTAGAAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAAATATTATTG
 GGGAAAAACTACAAGTGTGTACATATGCTGAGAAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAAAATCTT
 TTTGAAAATCATTTCCAGACAACCTCTTACTTTCTGTGTAGTTTTTAATTGTTAAAAAAAAGTTTTAA
 ACAGAAGCACATGACATATGAAAGCCTGCAGGACTGGTCGTTTTTTTTGGCAATTCTTCCACGTGGGACTTG
 TCCACAAGAATGAAAGTAGTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACATATTTATTTCTCACTTAAGTTATTTAT
 GCAAAAGTTTTTCTTGTAGAGAATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAATTAACAGTCTGTTCTTCCAGAG
 TCCAGAGACATTTGTTAATAAAGACAATGAATCATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図20】

MQLPLALCLVCLLVHTAFRVVEGQGWQAFKNDATEI IPELGEYEPPEPELENNKTMNRAENGRPPHPHFE
 TKDVSEYSRELFHTRYVTDGPCRSAPVTELVCSGQCGPARLLPNAIGRGKWRPSGPDFRCIPDRYRAQ
 RVQLLCPGGEAPRARVRLVASCKKRLTRFHNQSELKDFGTEAARPQKGRKPRPRARSAKANQAELENAV

シグナルペプチド:	アミノ酸 1-16
N-グリコシル化部位:	アミノ酸 53-57;175-179
環状AMP及び環状GMP依存性タンパク質リン酸化酵素リン酸化部位:	アミノ酸 168-172
N-ミリスチル化部位:	アミノ酸 183-189
アミド化部位:	アミド化 191-195

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/13358

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/12 C12N15/11	C07K14/47 C12N15/62
	C07K16/18	G01N33/53
		A61K38/17
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C12N C07K 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)		
EPO-Internal, STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL - EMHUM1 [Online] Entry/Acc.no. Ac004449, 23 March 1998 (1998-03-23) LAMERDIN, J.E. ET AL.: "Homo sapiens chromosome 19, cosmid R33683, complete sequence." XP002146336 nt. 28984-29203, 30242-30332, 32299-32402, 32474-32668, and passages relevant thereto in the header.	18, 19, 49-53, 69
A	WO 94 00503 A (CORDON CARDO CARLOS ;SLOAN KETTERING INST CANCER (US); FINLAY CATH) 6 January 1994 (1994-01-06) the whole document --- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
1 September 2000		04.12.2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5318 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Smalt, R

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 00/13358

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 93 20238 A (UNIV JOHNS HOPKINS) 14 October 1993 (1993-10-14) the whole document ---	
A	COLLINS V: "Gene amplification in human gliomas" GLIA,US,WILEY-LISS, NEW YORK, NY, vol. 15, no. 3, November 1995 (1995-11), pages 289-296, XP002109702 ISSN: 0994-1491 the whole document ---	
P,X	WO 99 37660 A (IRUELA ARISPE LUISA ;RUBEN STEVEN M (US); HASTINGS GREGG A (US)) 29 July 1999 (1999-07-29) see seq.ID.38 and the claims -----	18,19, 49-53,69

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/13358**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 29-37, in as far as they pertain 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. Claims Nos.: 12-15
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. 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.:
1-70 (all partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 12-15

A meaningful search for the full scope of claims 12-17,29,30,33-35,38, and 39 was not possible due to the lack of characterization of the antibody-encoding nucleic acid (claims 12-15), and the antagonist (claims 16 and 17), activity-inhibiting agent (claims 29,30, and 33), and the expression-inhibiting agent (claim 34 and 35) in the description. The search of claims 16,17,29,30,33-35,38, and 39 has been limited to those parts of the claims which are supported by the description, namely antibodies against the defined proteins (claims 16,17,29,30,33,38,39) and antisense molecules, complementary to the nucleic acids encoding said proteins (claims 34,35).

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.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA 210

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

1. Claims: Invention 1: claims 1-70, all partially

An antibody that binds to the protein designated PR05800, represented by seq.ID.2, composition comprising said antibody, nucleic acid sequence that hybridizes to a sequence encoding PR05800, as represented by seq.ID.1, method of determining the presence of said protein by using said antibody, method of diagnosing a tumour through detection of said protein with said antibody, cancer diagnostic kit comprising said antibody, use of said antibody or an antisense sequence to said nucleic acid in a composition for use in inhibiting the growth of tumour cells, kit comprising said antibody or said antisense molecule, method for identifying an inhibitor of an activity or the expression of said protein, isolated nucleic acid with 80% identity to a nucleic acid encoding seq.ID.2, vector comprising it, host comprising said vector, and method for producing said protein using said host, isolated polypeptide having at least 80% identity to seq.ID.2 or the extracellular domain thereof, and chimeric peptide comprising said polypeptide.

2. Claims: Inventions 2-10: claims 1-70, all partially

As invention 1, but limited to each of the following designated proteins, with the corresponding DNA and protein sequences, respectively, indicated between brackets; invention 2 is limited to PR06000 (Seq.ID's 3 and 4), invention 3 is limited to PR06016 (Seq.ID's 5 and 6), invention 4 is limited to PR06018 (Seq.ID's 7 and 8), invention 5 is limited to PR06496 (Seq.ID's 9 and 10), invention 6 is limited to PR07154 (Seq.ID's 11 and 12), invention 7 is limited to PR07170 (Seq.ID's 13 and 14), invention 8 is limited to PR07422 (Seq.ID's 15 and 16), invention 9 is limited to PR07431 (Seq.ID's 17 and 18), and invention 10 is limited to PR07476 (Seq.ID's 19 and 20).

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/13358

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9400603 A	06-01-1994	AU 4544393 A	24-01-1994
		AU 4545193 A	24-01-1994
		CA 2137822 A	06-01-1994
		EP 0654092 A	24-05-1995
		JP 8500729 T	30-01-1996
		WO 9400601 A	06-01-1994
		US 5843684 A	01-12-1998
WO 9320238 A	14-10-1993	US 5411860 A	02-05-1995
		AT 159985 T	15-11-1997
		AU 681851 B	11-09-1997
		AU 4278893 A	08-11-1993
		CA 2133306 A	14-10-1993
		DE 69315068 D	11-12-1997
		DE 69315068 T	09-04-1998
		DK 635068 T	20-04-1998
		EP 0635068 A	25-01-1995
		ES 2110608 T	16-02-1998
		GR 3025961 T	30-04-1998
		JP 7505294 T	15-06-1995
		US 5420263 A	30-05-1995
		US 5550023 A	27-08-1996
		US 5519118 A	21-05-1996
		US 5618921 A	08-04-1997
		US 5756455 A	26-05-1998
		US 5708136 A	13-01-1998
		US 5736338 A	07-04-1998
		US 5606044 A	25-02-1997
US 5702903 A	30-12-1997		
US 5858976 A	12-01-1999		
WO 9937660 A	29-07-1999	AU 2464199 A	09-08-1999
		EP 1049708 A	08-11-2000

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 P	35/00	C 0 7 K	14/47	4 C 0 8 4
C 0 7 K	14/47		16/18	4 C 0 8 5
	16/18		19/00	4 C 0 8 6
	19/00	C 1 2 N	1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/15		1/19	
	1/19		1/21	
	1/21	C 1 2 P	21/02	C
	5/10		21/08	
C 1 2 P	21/02	C 1 2 Q	1/02	
	21/08		1/68	A
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	33/15	Z
	1/68		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	M
	33/50		33/566	
	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/566		5/00	A
				B

- (31)優先権主張番号 6 0 / 1 4 6 , 8 4 3
(32)優先日 平成11年8月3日(1999 . 8 . 3)
(33)優先権主張国 米国 (U S)
- (31)優先権主張番号 6 0 / 1 4 8 , 1 8 8
(32)優先日 平成11年8月10日(1999 . 8 . 10)
(33)優先権主張国 米国 (U S)
- (31)優先権主張番号 6 0 / 1 4 9 , 3 2 0
(32)優先日 平成11年8月17日(1999 . 8 . 17)
(33)優先権主張国 米国 (U S)
- (31)優先権主張番号 6 0 / 1 4 9 , 3 2 7
(32)優先日 平成11年8月17日(1999 . 8 . 17)
(33)優先権主張国 米国 (U S)
- (31)優先権主張番号 6 0 / 1 4 9 , 3 9 6
(32)優先日 平成11年8月17日(1999 . 8 . 17)
(33)優先権主張国 米国 (U S)
- (31)優先権主張番号 6 0 / 1 5 0 , 1 1 4
(32)優先日 平成11年8月20日(1999 . 8 . 20)
(33)優先権主張国 米国 (U S)
- (31)優先権主張番号 6 0 / 1 5 1 , 7 0 0
(32)優先日 平成11年8月31日(1999 . 8 . 31)
(33)優先権主張国 米国 (U S)
- (31)優先権主張番号 6 0 / 1 5 1 , 7 3 4
(32)優先日 平成11年8月31日(1999 . 8 . 31)
(33)優先権主張国 米国 (U S)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ゴッダード, 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 スミス, ヴィクトリア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010,
 バーリングゲーム, ドゥワイト ロード 19

(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 カルフォニア 94010,
 ヒルズバラ, サウスダウン コート 35

Fターム(参考) 2G045 AA26 AA40 BB50 DA13 DA36
FB02

4B024 AA01 AA12 BA44 BA80 CA04
CA07 CA11 DA01 DA02 DA05
DA06 DA11 DA12 EA01 EA02
EA03 EA04 FA02 GA01 GA11
HA01 HA03 HA12 HA15

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ01 QQ13
QQ20 QQ42 QQ52 QQ79 QR08
QR33 QR42 QR48 QR55 QR59
QR62 QR77 QR80 QS05 QS12
QS25 QS33 QS34 QS36 QX02

4B064 AG01 AG27 CA01 CA02 CA06
CA10 CA19 CA20 CC24 DA01
DA14

4B065 AA01X AA26X AA57X AA79X
AA87X AA93Y AB01 AB02
BA01 BA08 CA24 CA25 CA44
CA46

4C084 AA17 MA01 NA14 ZB262

4C085 AA13 AA14 AA16 BB42 CC32
DD62 EE01 GG01

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01
MA03 NA14 ZB26

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
BA41 CA41 DA76 EA22 EA51
FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	用于治疗肿瘤的组合和方法		
公开(公告)号	JP2003501087A	公开(公告)日	2003-01-14
申请号	JP2001502580	申请日	2000-05-15
[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	ボツツタインデーヴィッドエー ゴッダードオードリー ガーニーオースティンエル スミスヴィクトリア ワタナベコリンケー ウッドウイリアムアイ		
发明人	ボツツタイン,デーヴィッド,エー ゴッダード,オードリー ガーニー,オースティン,エル. スミス,ヴィクトリア ワタナベ,コリン,ケー. ウッド,ウイリアム,アイ.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/17 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/42 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/11 C12N15/12 C12N15/13 C12N15/62 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33 /53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P1/00 A61P11/00 C07K14/4748 G01N33/57484		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/AA40 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024 /AA12 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA11 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA01 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024 /EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ01 4B063/QQ13 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063 /QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063 /QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA14 4B065/AA01X 4B065 /AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA79X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065 /BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB42 4C085/CC32 4C085 /DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA03 4C086/NA14 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/BA41 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	60/138385 1999-06-09 US 60/144790 1999-07-20 US 60/146843 1999-08-03 US 60/148188 1999-08-10 US		

