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

特表2003－511028
(P2003－511028A)

(43)公表日 平成15年3月25日(2003.3.25)

(51)Int.Cl.[7]	識別記号	ＦＩ		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/09	ZNA	Ａ６１Ｋ 31/7088		２Ｇ０４５
		39/395	Ｄ	４Ｂ０２４
Ａ６１Ｋ 31/7088			Ｎ	４Ｂ０２９
38/00		45/00		４Ｂ０６３
39/395		48/00		４Ｂ０６４

審査請求　未請求　予備審査請求（全352数）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2001－528585(P2001－528585)

(86)(22)出願日　平成12年10月5日(2000.10.5)
(85)翻訳文提出日　平成14年4月8日(2002.4.8)
(86)国際出願番号　PCT/US00/27512
(87)国際公開番号　WO01/025433
(87)国際公開日　平成13年4月12日(2001.4.12)
(31)優先権主張番号　60/158,587
(32)優先日　平成11年10月7日(1999.10.7)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/162,611
(32)優先日　平成11年10月28日(1999.10.28)
(33)優先権主張国　米国(US)

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

(71)出願人　キュラジェン　コーポレイション
アメリカ合衆国　コネチカット州　06511　ニュー　ヘイブン　ロング　ウォーフ　ドライブ　555

(74)代理人　弁理士　山本　秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規ポリペプチド、その核酸および新脈管形成および血管新生におけるその使用のための方法

(57)【要約】
本発明は、新血管形成および血管新生に重要な新規ポリペプチド、ならびにそ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、本明細書において、それらの核酸配列を含む、ベクターおよび宿主細胞、異種ポリペプチドは胃裂に融合された、本発明のポリペプチドを含むキメラポリペプチド分子、本発明のポリペプチドに結合する抗体が提供され、そして本発明のポリペプチドを生成する方法に関する。哺乳動物（ヒトを含む）における新血管形成および／または新または心血管形成を刺激または阻害するための組成物および方法が開示される。薬学的組成物は、これらの使用の１つ以上のために同定された、ポリペプチドまたはそれに対するアンタゴニストに基づく。本明細書においてこの組成物により診断、予防または処置され得る障害は、創傷のような外傷、種々の癌、および動脈硬化のような血管障害を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項１】　以下：

（ａ）　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドであって、該ポリペプチドは、それぞれ、配列番号２の約１から約５７７、配列番号４の約１から約４７４、配列番号１８の約１から約５０６、配列番号１６の約１から約３４４、または配列番号１４の約１から約６３３のアミノ酸残基の配列を含む、ポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列；または

（ｂ）（ａ）の該ヌクレオチド配列の相補体、

に対して少なくとも約８０％配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項２】　それぞれ、配列番号１の約６６から約１７９６、配列番号３の約４６５から約１８８６、配列番号１７の約２７１から約１７８８、配列番号１５の約２６７から約１２９８、または配列番号１３の約７１から約２０５９のヌクレオチド配列を含む、請求項１に記載の単離された核酸分子。

【請求項３】　それぞれ、配列番号１または配列番号３のヌクレオチド配列を含む、請求項１に記載の単離された核酸分子。

【請求項４】　それぞれ、配列番号２の約１から約５７７、配列番号４の約１から約４７４、配列番号１８の約１から約５０６、配列番号１６の約１から約３４４、または配列番号１４の約１から約６３３のアミノ酸残基の配列をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１に記載の単離された核酸分子。

【請求項５】　以下：

（ａ）ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９９で１９９９年９月２８日に、ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９８で１９９９年９月２８日に、ＡＴＣＣに寄託されたヒトタンパク質ｃＤＮＡによってコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（それぞれ、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．２－１７７６およびＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．１２－１７７６）；または

（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補体、

に対して、少なくとも約８０％配列同一性を含む、ヌクレオチド配列を含む、単

離された核酸分子。

【請求項６】　ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９９で１９９９年9月２８日に、ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９８で１９９９年9月２８日に、ＡＴＣＣに寄託されたヒトタンパク質ｃＤＮＡによってコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（それぞれ、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．２－１７７６およびＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．１２－１７７６）によってコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項５に記載の単離された核酸分子。

【請求項７】　以下：

（ａ）ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９９で１９９９年9月２８日に、ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９８で１９９９年9月２８日に、ＡＴＣＣに寄託されたヒトタンパク質ｃＤＮＡの全長ポリペプチドコード配列（それぞれ、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．２－１７７６およびＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．１２－１７７６）；または

（ｂ）（ａ）のコード配列の相補体、

に対して、少なくとも約８０％配列同一性を含む、ヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項８】　ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９９で１９９９年9月２８日に、ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９８で１９９９年9月２８日に、ＡＴＣＣに寄託されたヒトタンパク質ｃＤＮＡの全長ポリペプチドコード配列（それぞれ、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．２－１７７６およびＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．１２－１７７６）を含む、請求項７に記載の単離された核酸分子。

【請求項９】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドをコードする単離された核酸分子であって、該ポリペプチドは、それぞれ、配列番号２の約１から約５７７、配列番号４の約１から約４７４、配列番号１８の約１から約５０６、配列番号１６の約１から約３４４、または配列番号１４の約１から約６３３のアミノ酸をコードする核酸配列の相補体に対してハイブリダイズする、核酸を含む、単離された核酸分子。

【請求項１０】　それぞれ、配列番号２の約１から約５７７、配列番号４の約１から約４７４、配列番号１８の約１から約５０６、配列番号１６の約１から

約３４４、または配列番号１４の約１から約６３３のアミノ酸をコードする前記核酸は、

それぞれ、配列番号１の約６６から約１７９６、配列番号３の約４６５から約１８８６、配列番号１７の約２７１から約１７８８、配列番号１５の約２６７から約１２９８、または配列番号１３の約７１から約２０５９のヌクレオチドを含む、請求項９に記載の単離された核酸分子。

【請求項１１】　前記ハイブリダイゼーションは、ストリンジェントなハイブリダイゼーションまたは洗浄の条件下で起こる、請求項９に記載の単離された核酸分子。

【請求項１２】　以下：

（ａ）それぞれ、配列番号２の約１から約５７７、配列番号４の約１から約４７４、配列番号１８の約１から約５０６、配列番号１６の約１から約３４４、または配列番号１４の約１から約６３３のアミノ酸配列に比較したときに、少なくとも８０％陽性のスコア付けがされるポリペプチドをコードする核酸配列、または

（ｂ）（ａ）のＤＮＡの相補体、

を含む、単離された核酸分子。

【請求項１３】　それぞれ、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２について、少なくとも約５９６ヌクレオチドまたは１５３５ヌクレオチドを含む、単離された核酸分子であって、該核酸分子は、以下：

（ａ）それぞれ、配列番号２の約１から約５７７、配列番号４の約１から約４７４、配列番号１８の約１から約５０６、配列番号１６の約１から約３４４、または配列番号１４の約１から約６３３のアミノ酸残基の配列を含む、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドをコードするＤＮＡ分子

（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補体、

と、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で試験ＤＮＡ分子とハイ

ブリダイズさせる工程；および
該試験ＤＮＡ分子を単離する工程、
によって生成される、単離された核酸分子。

【請求項１４】　前記（ａ）または（ｂ）に対して少なくとも８０％の配列同一性を有する、請求項１３に記載の単離された核酸分子。

【請求項１５】　請求項１～１４のいずれか１項に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項１６】　前記核酸分子は、前記ベクターによって形質転換される宿主細胞によって認識される、制御配列に対して作動可能に連結される、請求項１５に記載のベクター。

【請求項１７】　ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９９で１９９９年9月２８日に、ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９８で１９９９年9月２８日に、ＡＴＣＣに寄託された、核酸分子（それぞれ、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．２－１７７６およびＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．１２－１７７６）。

【請求項１８】　請求項１５に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項１９】　ＣＨＯ細胞である、請求項１８に記載の宿主細胞。

【請求項２０】　Ｅ．ｃｏｌｉである、請求項１８に記載の宿主細胞。

【請求項２１】　酵母細胞である、請求項１８に記載の宿主細胞。

【請求項２２】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドを生成するためのプロセスであって、該プロセスは、以下の工程：
請求項１８に記載の宿主細胞を、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドの発現に適切な条件下で培養する工程であって、該、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドが生成される、工程、
を包含する、プロセス。

【請求項２３】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ

－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドを、前記細胞培養物から回収する工程をさらに包含する、請求項２２に記載のプロセス。

【請求項２４】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、それぞれ、配列番号２の約１から約５７７、配列番号４の約１から約４７４、配列番号１８の約１から約５０６、配列番号１６の約１から約３４４、または配列番号１４の約１から約６３３のアミノ酸残基の配列に対して少なくとも約８０％配列同一性を含むアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項２５】　それぞれ、配列番号２の約１から約５７７、配列番号４の約１から約４７４、配列番号１８の約１から約５０６、配列番号１６の約１から約３４４、または配列番号１４の約１から約６３３のアミノ酸残基を含む、請求項２４に記載の、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の単離されたポリペプチド。

【請求項２６】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９９で１９９９年9月２８日に、ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９８で１９９９年9月２８日に、ＡＴＣＣに寄託されたベクターのｃＤＮＡ挿入物（それぞれ、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．２－１７７６およびＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．１２－１７７６）によってコードされるポリペプチドに対して少なくとも約８０％の配列同一性を有する、単離されたポリペプチド。

【請求項２７】　ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９９で１９９９年9月２８日に、ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９８で１９９９年9月２８日に、ＡＴＣＣに寄託されたベクターのｃＤＮＡ挿入物（それぞれ、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．２－１７７６およびＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．１２－１７７６）によってコードされる、請求項２６に記載のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ

．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の単離されたポリペプチド。

【請求項２８】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、それぞれ、配列番号２の約１から約５７７、配列番号４の約１から約４７４、配列番号１８の約１から約５０６、配列番号１６の約１から約３４４、または配列番号１４の約１から約６３のアミノ酸残基の配列に比較したときに、少なくとも８０％陽性のスコア付けがされる、単離されたポリペプチド。

【請求項２９】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、それぞれ、配列番号２の約１から約５７７、配列番号４の約１から約４７４、配列番号１８の約１から約５０６、配列番号１６の約１から約３４４、または配列番号１４の約１から約６３のアミノ酸残基の配列、あるいは抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体に対する結合部位を提供するに十分なそのフラグメント、を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項３０】　以下：

（ｉ）以下：

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドをコードするＤＮＡ分子であって、該ポリペプチドは、それぞれ、配列番号２の約１から約５７７、配列番号４の約１から約４７４、配列番号１８の約１から約５０６、配列番号１６の約１から約３４４、または配列番号１４の約１から約６３３のアミノ酸残基の配列を含むＤＮＡ分子、あるいは（ａ）のＤＮＡ分子の相補体と、ストリンジェントな条件下で試験ＤＮＡ分子とハイブリダイズする工程；

（ｉｉ）該ポリペプチドの発現に適切な条件下で該試験ＤＮＡ分子を含む宿主

細胞を培養する工程；ならびに

（ｉｉｉ）該細胞培養物から該ポリペプチドを回収する工程、

によって生成される、単離されたポリペプチド。

【請求項３１】　前記試験ＤＮＡは、前記（ａ）または（ｂ）に対して少なくとも約８０％の配列同一性を有する、請求項３０に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項３２】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドを含むキメラ分子であって、該ポリペプチドは、異種アミノ酸配列に融合された、キメラ分子。

【請求項３３】　前記異種アミノ酸配列は、エピトープタグ配列である、請求項３２に記載のキメラ分子。

【請求項３４】　前記異種アミノ酸配列は、分泌シグナルペプチドである、請求項３２に記載のキメラ分子。

【請求項３５】　前記異種アミノ酸配列は、免疫グロブリンのＦｃ領域である、請求項３２に記載のキメラ分子。

【請求項３６】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドに対して特異的に結合する、抗体。

【請求項３７】　モノクローナル抗体である、請求項３６に記載の抗体。

【請求項３８】　ヒト化抗体である、請求項３６に記載の抗体。

【請求項３９】　抗体フラグメントである、請求項３６に記載の抗体。

【請求項４０】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の遺伝子配列に標的化された抗遺伝子化合物であって、該抗遺伝子化合物は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の発現を阻害する、抗遺伝子化合物。

【請求項４１】　５～６０のヌクレオ塩基を含むアンチセンスオリゴヌクレ

オチドである、請求項４０に記載の抗遺伝子化合物。

【請求項４２】　前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの改変されたヌクレオシド間結合を含む、請求項４１に記載の抗遺伝子化合物。

【請求項４３】　前記改変されたヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合である、請求項４１に記載の抗遺伝子化合物。

【請求項４４】　前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの改変された糖部分を含む、請求項４１に記載の抗遺伝子化合物。

【請求項４５】　前記改変された糖部分は、２’－Ｏ－メトキシエチル糖部分である、請求項４４に記載の抗遺伝子化合物。

【請求項４６】　前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの改変されたヌクレオ塩基を含む、請求項４１に記載の抗遺伝子化合物。

【請求項４７】　前記改変されたヌクレオ塩基は、５’－メチルシトシンである、請求項４６に記載の抗遺伝子化合物。

【請求項４８】　前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、キメラオリゴヌクレオチドである、請求項４１に記載の抗遺伝子化合物。

【請求項４９】　ペプチド核酸またはリボザイムである、請求項４１に記載の抗遺伝子化合物。

【請求項５０】　前記５～６０のヌクレオ塩基は、配列番号１からの配列を含む、請求項４０に記載の抗遺伝子化合物。

【請求項５１】　請求項４０に記載の抗遺伝子オリゴヌクレオチドをコードするＤＮＡを含む、ベクター。

【請求項５２】　請求項５１に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項５３】　ヒト細胞またはヒト組織において、インビトロでＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の発現を阻害する方法であって、

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の発現が阻害されるように、請求項４０に記載の抗遺伝子化合物と、該細胞または該組織とを接触させる工程、

を包含する、方法。

【請求項５４】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の細胞による発現に関連する状態を処置するための薬学的調製物であって、

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の抗遺伝子を含み、該抗遺伝子は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２を発現する細胞に侵入し、そしてＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする核酸分子に特異的に結合し、

該抗遺伝子は、生物学的に受容可能なキャリア中に存在する、

薬学的調製物。

【請求項５５】　前記ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２を発現する細胞への、前記抗遺伝子の送達を改善するための、少なくとも１つの因子をさらに含む、請求項５４に記載の薬学的調製物。

【請求項５６】　前記少なくとも１つの因子は、脂質を含む、請求項５５に記載の薬学的調製物。

【請求項５７】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の抗遺伝子の細胞型特異的送達を改善するための、少なくとも１つの標的化因子をさらに含む、請求項５５に記載の薬学的調製物。

【請求項５８】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドに対する、アゴニスト。

【請求項５９】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドに対するアンタゴニスト。

【請求項６０】　以下：

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドに対するアゴニスト、

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドに対するアンタゴニスト、あるいは

（ｄ）抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体を、

薬学的に受容可能なキャリアと混合して含む、

組成物。

【請求項６１】　治療有効量の：

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニスト、あるいは

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニスト、

を含む、請求項６０に記載の組成物。

【請求項６２】　心血管因子、内皮因子、血管形成因子または血管抑制因子をさらに含む、請求項６０に記載の組成物。

【請求項６３】　前記ポリペプチドまたは抗体、および前記心血管因子、内皮因子、血管形成因子または血管抑制因子が、治療有効量で存在する、請求項６２に記載の組成物。

【請求項６４】　前記アゴニストは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする核酸である、請求項６０に記載の組成物。

【請求項６５】　前記アンタゴニストは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のアンチセンス分子または抗体である、請求項６０に記載の組成物。

【請求項６６】　心血管因子、内皮因子、血管形成因子または血管抑制因子をさらに含む、請求項６０に記載の組成物。

【請求項６７】　以下：

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニスト、あるいは、

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニスト、

を薬学的に受容可能なキャリアとともに混合する工程、を包含する、

請求項６０に記載の組成物を調製する方法。

【請求項６８】　以下：

（ａ）以下：

（ｉ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、

（ｉｉ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニスト、あるいは

（ｉｉｉ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－

ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニスト、

を薬学的に受容可能なキャリアと混合して含む、組成物；

（ｂ）該組成物を含む容器；および

（ｃ）該容器に付着された標識または添付文書であって、該標識または添付文書は薬学的製品に含まれ、血管形成障害の処置のための該（ａ）の使用に関して言及する、標識または添付文書、

を含む、製品。

【請求項６９】　前記アゴニストは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の抗体または抗遺伝子化合物である、請求項６８に記載の製品。

【請求項７０】　前記アンタゴニストは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の抗体または抗遺伝子化合物である、請求項６８に記載の製品。

【請求項７１】　前記組成物は、治療有効量の：

前記（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニスト、あるいは

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニスト、

を前記薬学的に受容可能なキャリアと混合して含む、請求項６８に記載の製品。

【請求項７２】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニストを同定するための方法であって、該方法は以下の工程：

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドによって正常に増強される細胞応答の誘導に適切な条件下で、スクリーニングされる試験化合物と、細胞とを接触させる工程；および

（ｂ）該細胞応答の誘導を判定して該試験化合物が有効なアゴニストか否かを決定する工程であって、該細胞応答の誘導は、該試験化合物が有効なアゴニストであることの指標である、工程、

を包含する、方法。

【請求項７３】　前記ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドによって正常に誘導される前記細胞応答は、管の形成の刺激である、請求項７２に記載の方法。

【請求項７４】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドの活性を阻害する化合物を同定するための方法であって、該方法は：

試験化合物と、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドとを、該試験化合物と該ポリペプチドとが相互作用を可能とするに十分な条件および時間で接触させる工程；ならびに

該ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドの活性が阻害されるか否かを決定する工程、

を包含する、方法。

【請求項７５】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドまたは遺伝子の、該ポリペプチドを正常に発現する細胞における発現を阻害する化合物を同定するための方法であって、該方法は以下の工程：

該ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドの発現

を可能にするに適切な条件下で試験化合物と該細胞とを接触させる工程；ならびに

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドまたは遺伝子の発現が阻害されるか否かを決定する工程、

を包含する、方法。

【請求項７６】　前記化合物は、抗遺伝子化合物である、請求項７５に記載の方法。

【請求項７７】　前記抗遺伝子化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項７６に記載の方法。

【請求項７８】　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドをコードする核酸配列において変異に関連する、疾患または該疾患に対する感受性を診断するための方法であって、該方法は以下の工程：

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドをコードする核酸配列を、宿主に由来するサンプルから単離する工程；および

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドの核酸配列における該変異の存在または非存在を決定する工程であって、該変異の該存在または該非存在は、該疾患または該疾患に対する該感受性の存在の指標である、工程、

を包含する、方法。

【請求項７９】　哺乳動物における心血管障害、内皮障害または血管形成障害を診断する方法であって、該方法は、

（ａ）該哺乳動物から得られた組織細胞の試験サンプル中、および

（ｂ）該同じ細胞型の既知の正常組織のコントロールサンプル中の、

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドをコードす

る遺伝子の発現のレベルを分析する工程であって、該コントロールサンプルに比較して、該試験サンプルにおけるより高いかまたはより低い発現のレベルは、該哺乳動物における心血管障害、内皮障害または血管形成障害の存在の指標である、工程、
を包含する、方法。

【請求項８０】　哺乳動物における心血管障害、内皮障害または血管形成障害を診断する方法であって、該方法は以下の工程：

該哺乳動物から得られた組織細胞の試験サンプルにおける、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドの存在または非存在を検出する工程であって、該サンプル中の該ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドの該存在または該非存在は、該哺乳動物における心血管障害、内皮障害または血管形成障害の存在の指標である、工程、
を包含する、方法。

【請求項８１】　哺乳動物における心血管障害、内皮障害または血管形成障害を診断する方法であって、該方法は以下の工程：

（ａ）該哺乳動物から得られた組織細胞の試験サンプルと、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体と接触させる工程、ならびに

（ｂ）該試験サンプルにおける、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体と、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドとの間の複合体の形成を検出する工程であって、該複合体の形成は、該哺乳動物における心血管障害、内皮障害または血管形成障害の存在の指標である、工程、
を包含する、方法。

【請求項８２】　サンプルにおけるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドの存在を決定するための方法であって、該方法は以下の工程：

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドを含むと推定されるサンプルと、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体とを接触させる工程、ならびに

該抗体の該サンプル中の成分への結合を決定する工程、

を包含する、方法。

【請求項８３】　抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体もしくは抗遺伝子、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体もしくは抗遺伝子、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体もしくは抗遺伝子、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体もしくは抗遺伝子または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体もしくは抗遺伝子、およびキャリアを備える、心血管障害、内皮障害または血管形成障害の診断キット。

【請求項８４】　該抗体を用いてＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドまたは抗遺伝子の存在を検出するための指示書をさらに備える、請求項８３に記載のキット。

【請求項８５】　哺乳動物における心血管障害、内皮障害または血管形成障害を処置するための方法であって、該方法は以下の工程：

該哺乳動物に、治療有効量の：

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニスト、あるいは

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ

．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニスト、

を投与する工程、

を包含する、方法。

【請求項８６】　前記障害は、血管外傷または癌である、請求項８５に記載の方法。

【請求項８７】　前記量の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）は、心血管因子、内皮因子、血管形成因子または血管抑制因子とともに投与される、請求項８５に記載の方法。

【請求項８８】　前記量の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）は、化学療法剤、増殖阻害因子、細胞傷害性因子または血管抑制因子と合わせて投与される、請求項８５に記載の方法。

【請求項８９】　前記アゴニストは、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体もしくは抗遺伝子、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体もしくは抗遺伝子、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体もしくは抗遺伝子、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体もしくは抗遺伝子または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体もしくは抗遺伝子である、請求項８５に記載の方法。

【請求項９０】　前記アンタゴニストは、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体もしくは抗遺伝子、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体もしくは抗遺伝子、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体もしくは抗遺伝子、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体もしくは抗遺伝子または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体もしくは抗遺伝子である、請求項８５に記載の方法。

【請求項９１】　哺乳動物における心血管障害、内皮障害または血管形成障害を処置するための方法であって、該方法は以下の工程：

該哺乳動物に、

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ

．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニスト、あるいは

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニスト、

をコードする核酸分子を投与する工程、

を包含する、方法。

【請求項９２】　前記アゴニストは、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体もしくは抗遺伝子、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体もしくは抗遺伝子、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体もしくは抗遺伝子、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体もしくは抗遺伝子または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体もしくは抗遺伝子である、請求項９１に記載の方法。

【請求項９３】　前記アンタゴニストは、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体もしくは抗遺伝子、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体もしくは抗遺伝子、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体もしくは抗遺伝子、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体もしくは抗遺伝子または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体もしくは抗遺伝子である、請求項９１に記載の方法。

【請求項９４】　前記核酸分子は、エキソビボ遺伝子治療を介して投与される、請求項９１に記載の方法。

【請求項９５】　前記心血管障害、内皮障害または血管形成障害は、血管外傷または癌である、請求項９１に記載の方法。

【請求項９６】　レトロウイルスベクターを含む、組換えレトロウイルス粒子であって、該レトロウイルスベクターは以下：

プロモーター；

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド

のアゴニストポリペプチド、あるいは

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニストポリペプチド、

をコードする核酸；ならびに

該ポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列、

から本質的になり、

該レトロウイルスベクターは、レトロウイルス構造タンパク質と会合する、組換えレトロウイルス粒子。

【請求項９７】　核酸構築物を含むエキソビボプロデューサー細胞であって、該細胞はレトロウイルス構造タンパク質を発現し、そしてまた以下：

プロモーター；

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニストポリペプチド、あるいは

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニストポリペプチド、

をコードする核酸；ならびに

該ポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列、

から本質的になる、レトロウイルスベクターを含み、

該プロデューサー細胞は、該構造タンパク質と会合して該レトロウイルスベクターをパッケージングして、組換えレトロウイルス粒子を生成する、

エキソビボプロデューサー細胞。

【請求項９８】　哺乳動物における内皮細胞増殖を阻害するための方法であって、該方法は以下の工程：

該哺乳動物に、有効量の：

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニスト、

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニスト、あるいは

（ｄ）抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体

を投与する工程であって、該哺乳動物における内皮細胞増殖が阻害される、工程、

を包含する、方法。

【請求項９９】　哺乳動物における内皮細胞増殖を刺激するための方法であって、該方法は以下の工程：

該哺乳動物に、有効量の：

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニスト、

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニスト、あるいは

（ｄ）抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体または抗ＰＲＯ－Ｃ

－ＭＧ．７２抗体、

を投与する工程であって、該哺乳動物における内皮細胞増殖が刺激される、工程、

を包含する、方法。

【請求項１００】　血管形成を阻害するための方法であって、該方法は以下の工程：

哺乳動物に、有効量の：

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニスト、あるいは

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニスト、

を投与する工程であって、該血管形成が阻害される、工程、

を包含する、方法。

【請求項１０１】　血管形成を刺激するための方法であって、該方法は以下の工程：

哺乳動物に、有効量の：

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニスト、あるいは

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド

のアンタゴニスト、

を投与する工程であって、該血管形成が刺激される、工程、

を包含する、方法。

【請求項１０２】　内皮管形成を阻害するための方法であって、該方法は以下の工程：

哺乳動物に、管形成誘導有効量の：

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニスト、あるいは

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニスト、

を投与する工程であって、該内皮管形成が阻害される、工程、

を包含する、方法。

【請求項１０３】　内皮管形成を刺激するための方法であって、該方法は以下の工程：

哺乳動物に、管形成誘導有効量の：

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニスト、あるいは

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニスト、

を投与する工程であって、該管形成が刺激される、工程、
を包含する、方法。

【請求項１０４】　腫瘍を処置するため、腫瘍のサイズを低減するため、腫瘍を支持する血管系を低減するため、または哺乳動物の腫瘍負荷を低減するための方法であって、該方法は以下の工程：

それを必要とする哺乳動物に、治療有効量の：

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニスト、あるいは

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニスト、

を投与する工程、
を包含する、方法。

【請求項１０５】　所望されない過剰の新血管形成によって特徴づけられる疾患または障害を処置するための方法であって、該方法は以下の工程：

それを必要とする哺乳動物に、治療有効量の：

（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、

（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニスト、あるいは

（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニスト、

を投与する工程、
を包含する、方法。

【請求項１０６】　前記疾患または障害は、慢性関節リウマチ、乾癬、動脈硬化、網膜症、水晶体後繊維増殖、新血管形成緑内障、加齢性黄斑変性、甲状腺過形成、グレーヴ病、組織移植、慢性炎症、肺炎症および肥満からなる群より選択される、請求項１０５に記載の方法。

【請求項１０７】　マイクロアレイであって、該マイクロアレイは、
固体支持体、および
複数の異なるオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドは、該支持体に付着される、オリゴヌクレオチド、
を備え、
該異なるオリゴヌクレオチドの各々は、異なる所定の領域において該固体支持体の表面に付着し、異なる決定可能な配列を有し、かつ少なくとも６ヌクレオチド長であり、ここで、該異なるオリゴヌクレオチドの少なくとも１つは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の配列である、
マイクロアレイ。

【請求項１０８】　前記異なるオリゴヌクレオチドの各々は、約５から約６０のヌクレオチド長である、請求項１０７に記載のアレイ。

【請求項１０９】　前記アレイは、前記固体支持体に付着された２から１，０００，０００の異なるオリゴヌクレオチドを含む、請求項１０７に記載のアレイ。

【請求項１１０】　前記固体支持体はガラスである、請求項１０７に記載のアレイ。

【請求項１１１】　前記オリゴヌクレオチドは、リンカー基を通じて前記固体支持体の前記表面に付着される、請求項１０７に記載のアレイ。

【請求項１１２】　前記オリゴヌクレオチドは、少なくとも２０％純粋である、請求項１０７に記載のアレイ。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

（発明の分野）

本発明は、新規のＤＮＡおよびそれらのコードされる本明細書中で「ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２」ポリペプチドとして命名される細胞内ポリペプチドの同定および単離に一般的に関する。それらの遺伝子発現は、新脈管形成および／または血管新生をこうむる細胞内で調節される。従って、本発明はさらに、次の生物学的効果を必要とする哺乳動物において新脈管形成および／または新生血管形成もしくは心臓血管新生を促進する、あるいは阻害するのに有用な組成物および方法に関する。これは、心臓血管障害および腫瘍学的障害の診断および処置を含む。

【０００２】

（発明の背景）

細胞内のタンパク質は、とりわけ多細胞生物体の形成、分化、および維持において重要な役割を果たす。多くの個々の細胞の運命（例えば、増殖、移動、分化、または他の細胞との相互作用）は、他の細胞および／または隣接の環境から受ける情報によって、典型的に支配される。この情報は、しばしば、分泌性のポリペプチド（例えば、分裂促進因子、生存因子、細胞傷害性因子、分化因子、神経ペプチド、およびホルモン）によって伝達され、これらの因子は、次いで、多様な細胞レセプターまたは膜結合性タンパク質によって、解釈され、そして活性化する。各活性化シグナルは、細胞内タンパク質（例えば、タンパク質キナーゼ、ＤＮＡ結合調節タンパク質、タンパク質プロセシングタンパク質、プロテアーゼ、グリコシダーゼ）で構成される特異的シグナル導入経路を誘導し、その結果、このシグナルに応答する細胞の運命に関するもしくは必要とされる他の細胞内タンパク質の活性化、発現、または量の調節、アップレギュレーションあるいはダウンレギュレーションのいずれかを生じる。例えば、適切なシグナルの導入に応答する細胞増殖はたは分化に必要とされる細胞内タンパク質のＲＮＡまたはタンパク質検出可能な変化は、細胞内タンパク質に関するシグナル誘導経路のレセプ

ター介在リン酸化によって部分的に制御され得る。

【０００３】

細胞内タンパク質およびその遺伝子配列は、種々の産業的適用（医薬品、診断、バイオセンサー、およびバイオリアクターとしての使用を含む）を有する。現在利用可能なほとんどのタンパク質薬物は、サイトカインまたはその抗体擬態であるが、低分子、ペプチド、またはアンチセンス薬剤のほとんどの標的は、細胞内タンパク質またはそれらをコードする細胞内遺伝子である。例えば、そのような薬剤は、細胞内タンパク質標的と相互作用し、その活性をブロックし、関連するシグナル導入経路を中断させ、それによって細胞の応答またはその経路によって制御される細胞の活性を止める（または調節する）。産業および学界ともに、努力を取り入れ、新しい、ネイティブな細胞内タンパク質およびそれらの遺伝子、それらが機能するシグナル導入経路、ならびにそれらを調節するタンパク質または遺伝子を同定する。古典的に、そのような遺伝子およびそれらのタンパク質は、示差分析が、特定の刺激に応答する細胞又は組織上のＲＮＡまたはタンパク質でみなされる二元比較研究によって発見される。

【０００４】

細胞性応答の一つの結果は、新しい血管の形態である。これは、２つの関連するメカニズム（新脈管形成（前もって存在する血管から新しい血管の成長）および血管新生（内皮細胞の凝集を介する血管の形成））によって起こり得る。表面内の全血管は内皮細胞で統一される。血管と脈管外空間との間の界面でね血管内皮細胞は、心臓血管恒常性を維持するのに顕著に役割があり、傷に対する病態生理応答を媒介する。例えば、新脈管形成は、創傷治癒および排卵などの現象の間に成人において起こる。新脈管形成の間、環境的な刺激に応答する内皮細胞は、多くの細胞性変化および応答を受け、その結果、細胞性タンパク質による基底膜の分解、細胞外マトリックス中の内皮細胞の貫入および移動、内皮増殖ならびに相互連結される血管ネットワークの形成を包含する工程の複合シリーズを生じる。新しい血管のこの形成は、種々の細胞内タンパク質、細胞外マトリックス構成物、プロテアーゼおよびプロテアーゼ阻害剤、炎症性分子、ケモキネシス、ならびに細胞分裂および増殖、細胞骨格性再配列、付着分子およびまた特定の内皮細

胞集団のアポトーシスに関連する分子の調節または発現を必要とする、そして依存する明確な相において起こる。

【０００５】

内皮細胞はまた、腫瘍増殖ならびに転移ならびに種々の非新生組織疾患および障害に関連する新血管形成の間に新脈管形成をうける。腫瘍増殖の場合、新脈管形成は、過形成から新形成への遷移に対して、および増殖固体腫瘍への食物を提供することに対して重大であることを現わす（Ｆｏｌｋｍａｎら、Ｎａｔｕｒｅ　３３９：５８（１９８９））。新脈管形成は、腫瘍が宿主の血液床に接触することを可能にし、このことが、腫瘍細胞の転移の経路を提供する。事実、固体腫瘍増殖および転移の進行は、新脈管形成に依存する。例えば、これは、侵襲性のヒト乳癌の組織学的切片での微小血管の数および密度と遠隔転移の実際の存在との相関を示す研究によって支持される（Ｗｅｉｄｎｅｒら、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２４：１（１９９１））。最近のデータは、新しい血管増殖のブロックが、酸素および栄養源の供給を止めることで腫瘍増殖を遅らせ得、新しい血液の供給無しに、腫瘍は直径約１～２mmより大きく成長でき得ないことを示唆する。従って、癌を処置する新しい新脈血管形成治療は、所望される。

【０００６】

添加する生成物、方法およびアッセイの必要性が存在する。これらは、シグナル導入経路を制御し、それによって細胞性応答および組織応答ならびに細胞性活性および組織活性を調節する手段を提供する。このような生成物、方法および手段は、多数の医学的状態および手順について利益を提供する。

【０００７】

多くの疾患および障害における血管内非細胞増殖および新脈管形成の役割において、これらの進行の原因となるひとつ以上の生物学的効果を調節する手段を有し、血管の修復および維持を高め、そして癌および腫瘍進行を減少ならびに阻害する利益を提供することが所望される。通常のおよび疾患状態および特に癌において病原性ポリペプチドの存在をアッセイする手段を有することも所望される。さらに、一般的に、心臓肥大の処置に適用可能な治療はないので、心筋細胞性肥大を予防又は減少し得る因子の同定は、病態生理学的心増殖を阻害する新しい治

療的戦略の開発において非常に重要である。

【０００８】

種々の心血管障害および腫瘍学障害に対していくつかの治療様相があるが、付加的な治療的アプローチの必要がまだある。これらの存在する必要性を扱うさらなる手段として、「ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２」ポリペプチドとして本明細書中で命名される新規の細胞性ポリペプチドの同定および特徴づけが、提供される。

【０００９】

（発明の要旨）

本明細書中において「ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２」として命名される新規のポリペプチドをそれぞれコードする、本明細書中でＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．２－１７７６、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．１２－１７７６、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．４５－１７７６、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．６４－１７７６またはＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．７２－１７７６として命名されるｃＤＮＡクローンは、同定された。そのＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．２－１７７６、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．１２－１７７６、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．４５－１７７６、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．６４－１７７６またはＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．７２－１７７６ＲＮＡは、内皮細胞によって管形成を受ける細胞において調節され、これは、新脈管形成および血管新生の間の血管の開発において必要な工程である。示差ｃＤＮＡスクリーニング（ＧｅｎｅＣａｌｌｉｎｇ™技術）は、成長因子の存在、インビボの内皮細胞の新脈管形成環境を擬態したコラーゲンゲルにおいて管形成を受けるヒト臍帯内皮細胞（ＨＵＶＥＣＳ）に対して適用される；ゼラチンの表面上またはプラスチック上で増殖するＨＵＶＥＣＳは、管形成を受けない。

【００１０】

従って、本発明は、組成物および方法に関連する。その方法は、新脈管形成および／もしくは血管新生、好ましくは哺乳動物における新血管形成または新血管新生を促進または阻害し、そしてその利益を提供する添加分子を到底する、方法

である。本発明の分子は、障害の診断および／または処置（予防を含む）に有用な薬剤であると考えられる。以下のような効果が所望される；新脈管形成の促進または阻害、血管内皮細胞増殖の阻害または刺激、血管内皮細胞の成長または増殖の刺激、腫瘍増殖の阻害、新脈管形成依存増殖の阻害、新脈管形成依存増殖の刺激、心肥大の阻害および心肥大の刺激（例えば、うっ血性心不全の処置のため）。本発明は、内皮細胞に有効な量の本発明の化合物を供給して新脈管形成を阻害または刺激する方法を提供する。提供されるものはまた、腫瘍を処置する、腫瘍のサイズを減少する、腫瘍を支持する血管を減少する、または有効量の本発明の化合物を投与することによって哺乳動物の腫瘍負荷量を減少する方法である。

【００１１】

１つの実施形態において、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。

【００１２】

１つの実施形態において、単離された核酸分子は、（ａ）配列番号２の約１～約５７７、配列番号４の約１～４７４、配列番号１８の約１～約５０６、配列番号１６の約１～約３４４、または配列番号１４の約１～約６３３アミノ酸残基の配列をそれぞれ有する、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードするＤＮＡ分子、あるいは（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補体、または本明細書中に記載される本発明のＡＴＣＣ寄託ＤＮＡによってコードされるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードするＤＮＡ分子に対して少なくとも約８０％配列同一性から配列同一性において各１％増加で好ましく増加して少なくとも約９９％までの配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【００１３】

別の実施形態において、単離された核酸分子は、（ａ）配列番号２の約１～約

５７７、配列番号４の約１～４７４、配列番号１８の約１～約５０６、配列番号１６の約１～約３４４、または配列番号１４の約１～約６３３アミノ酸残基の配列をそれぞれ有する、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする核酸配列、あるいは（ｂ）（ａ）のヌクレオチド配列の相補体、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードするＡＴＣＣ寄託ＤＮＡを含む。

【００１４】

他の実施形態において、単離された核酸分子は、（ａ）配列番号１の約６６～約１７９６、配列番号３の約４６５～１８８６、配列番号１７の約２７１～約１７８８、配列番号１５の約２６７～約１２９８、または配列番号１３の約７１～約２０５９ヌクレオチド配列をそれぞれ有する、ＤＮＡ分子、あるいは（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補体またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードするＡＴＣＣ寄託ＤＮＡに対して少なくとも約８０％配列同一性から配列同一性において各１％増加で好ましく増加して少なくとも約９９％までの配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【００１５】

別の実施形態において、単離された核酸分子は、（ａ）それぞれ配列番号１の約６６～約１７９６、配列番号３の約４６５～１８８６、配列番号１７の約２７１～約１７８８、配列番号１５の約２６７～約１２９８、または配列番号１３の約７１～約２０５９ヌクレオチド配列、あるいは（ｂ）（ａ）のヌクレオチド配列の相補体、あるいはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードするＡＴＣＣ寄託ＤＮＡを含む。

【００１６】

別の実施形態において、本発明は、本明細書中で定義される活性ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－Ｍ

Ｇ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする単離された核酸分子（配列番号２の約１～約５７７、配列番号４の約１～４７４、配列番号１８の約１～約５０６、配列番号１６の約１～約３４４、または配列番号１４の約１～約６３３アミノ酸をそれぞれコードする核酸配列の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む）に関する。好ましくは、ハイブリダイゼーションは、ストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で起こる。

【００１７】

さらに別の実施形態において、本発明は、本明細書中で定義される活性ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする単離された核酸分子（それぞれ配列番号１の約６６～約１７９６、配列番号３の約４６５～１８８６、配列番号１７の約２７１～約１７８８、配列番号１５の約２６７～約１２９８、または配列番号１３の約７１～約２０５９間の核酸配列の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む）に関する。好ましくは、ハイブリダイゼーションは、ストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で起こる。

【００１８】

さらなる実施形態において、本発明は、（ａ）配列番号２の約１～約５７７、配列番号４の約１～４７４、配列番号１８の約１～約５０６、配列番号１６の約１～約３４４、または配列番号１４の約１～約６３３アミノ酸残基の配列を有する、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをそれぞれコードするＤＮＡ分子、あるいは（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補体、ならびに、試験ＤＮＡ分子が、（ａ）もしくは（ｂ）に対して少なくとも８０％配列同一性から配列同一性において各１％増加で好ましく増加して少なくとも約９９％までの配列同一性を有する場合、その試験ＤＮＡ分子と試験ＤＮＡ分子をストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることで生成される単離された核酸分子に関する。配列番号２の約１～約５７７、配列番号４の約１～４７４、配列番号１８の約１～約５０６、配列番号１６の約１～約３４４、または配列番号１４の

約１～約６３３アミノ酸残基の配列をそれぞれ有する、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードするＤＮＡ分子にハイブリダイズ可能なこのような分子は、それぞれ少なくとも約５９６ヌクレオチドおよび１５３５ヌクレオチドを有する。

【００１９】

別の実施形態では、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の単離された核酸分子に関し、この核酸分子は、（ａ）それぞれ、配列番号２の約１～約５７７もしくは配列番号４の約１～約４７４の残基のアミノ酸配列と比較した場合に、少なくとも約８０％ポジティブ（ポジティブが１パーセント増大する毎に好ましさが増大する）～少なくとも約９９％ポジティブと評点されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、または（ｂ）（ａ）のヌクレオチド配列の相補体を含む。

【００２０】

別の実施形態は、例えば、ハイブリダイゼーションプローブとしての用途を見出し得るか、あるいは抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の結合標的、好ましくは、抗体、天然のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の細胞内結合標的、または非天然の結合因子についての結合部位を含むポリペプチドを必要に応じてコードし得るＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのフラグメントをコードする、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドコード配列のフラグメントに関する。このような核酸フラグメントは通常、少なくとも約２０ヌクレオチド長であり、少なくとも約１０００ヌクレオチド長まで好ましさが増大し、ここで、この状況では、用語「約」とは、参照されたヌクレオチド配列長＋／－そ

の参照された長さの１０％を意味する。好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列フラグメントは、配列番号１または配列番号３に示されるヌクレオチド配列の任意のコード領域から誘導される。また意図されるのは、これらのヌクレオチド分子フラグメントによってコードされる、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドフラグメントであり、好ましくは、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の結合標的、好ましくは、抗体、天然のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の細胞内結合標的、または非天然の結合因子についての結合部位を含む、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドフラグメントである。

【００２１】

別の実施形態では、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２またはそれらの改変体をコードするヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。このベクターは、本明細書中に同定される単離された核酸分子のうちのいずれかを含み得る。

【００２２】

このようなベクターを含む宿主細胞もまた提供される。宿主細胞は、脊椎動物細胞、哺乳動物細胞、真菌細胞、植物細胞または細菌細胞であり得る。好ましくは、酵母細胞、ＣＨＯ細胞、Ｅ．ｃｏｌｉ、酵母細胞、ヒト細胞またはマウス細胞である。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドを産生するためのプロセスがさらに提供され、そしてこのプロセスは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドを産生するために、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、Ｐ

ＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の発現に適切な条件下で宿主細胞を培養する工程を含む。さらなる実施形態では、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドは、細胞培養物から回収され得る。用いられる場合、全体を通して、「細胞培養物」は、細胞または細胞培地を含む。

【００２３】

別の実施形態では、本発明は、本明細書中で同定される単離された核酸配列のうちのいずれかによってコードされる、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の単離されたポリペプチドを提供する。

【００２４】

特定の実施形態では、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の単離されたネイティブな配列のポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、特定の実施形態では、それぞれ、配列番号２の約１～約５７７、配列番号４の約１～約４７４、配列番号１８の約１～約５０６、配列番号１６の約１～約３４４、または配列番号１４の約１～約６３３の残基を含むアミノ酸配列を含む。

【００２５】

別の実施形態では、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の単離されたポリペプチドに関し、このポリペプチドは、それぞれ、配列番号２の約１～約５７７、配列番号４の約１～約４７４、配列番号１８の約１～約５０６、配列番号１６の約１～約３４４、または配列番号１４の約１～約６３３のアミノ酸残基の配列に対して、少なくとも約８０％の配列同一性（配列同一性が１パーセント増大する毎に好ましさが増大する）～少なくとも約９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００２６】

さらなる実施形態では、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の単離されたポリペプチドに関し、このポリペプチドは、本明細書中に記載される通り、ＡＴＣＣに寄託されたヒトタンパク質ｃＤＮＡによってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約８０％の配列同一性（配列同一性が１パーセント増大する毎に好ましさが増大する）～少なくとも約９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００２７】

さらなる実施形態では、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の単離されたポリペプチドに関し、このポリペプチドは、それぞれ、配列番号２の約１～約５７７、配列番号４の約１～約４７４、配列番号１８の約１～約５０６、配列番号１６の約１～約３４４または配列番号１４の約１～約６３３の残基のアミノ酸配列と比較した場合に、少なくとも約８０％ポジティブ（ポジティブが１パーセント増大する毎に好ましさが増大する）～少なくとも約９９％ポジティブと評点されるアミノ酸配列を含む。

【００２８】

なお別の実施形態では、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の単離されたポリペプチドまたはそのフラグメントに関し、このポリペプチドは、それぞれ、配列番号２の約１～約５７７、配列番号４の約１～約４７４、配列番号１８の約１～約５０６、配列番号１６の約１～約３４４または配列番号１４の約１～約６３３のアミノ酸残基の配列を含み、このフラグメントは、生物学的に活性であるか、あるいは抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の結合標的についての、好ましくは、抗体、天然のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の細胞内結合標的または非天然の結合因子についての結合部位を提供するに十分であり、ここで、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．

２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドフラグメントであって、生物学的活性を保有するかまたは結合部位を提供するポリペプチドフラグメントの同定は、当該分野で周知の技術を用いて慣用的な様式で達成され得る。好ましくは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のフラグメントは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のネイティブなポリペプチドの定性的生物学的活性を保持する。

【００２９】

なおさらなる実施形態では、本発明は、以下によって産生されるポリペプチドを提供する：（ｉ）ストリンジェントな条件下で、試験ＤＮＡ分子を、（ａ）それぞれ、配列番号２の約１～約５７７、配列番号４の約１～約４７４、配列番号１８の約１～約５０６、配列番号１６の約１～約３４４もしくは配列番号１４の約１～約６３３のアミノ酸残基の配列を有する、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドをコードするＤＮＡ分子、または（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補体とハイブリダイズすること、そして試験ＤＮＡ分子が、（ａ）または（ｂ）に対して少なくとも約８０％の配列同一性（配列同一性が１パーセント増大する毎に好ましさが増大する）～少なくとも約９９％の配列同一性を有する場合、（ｉｉ）ポリペプチドを産生するためにポリペプチドの発現に適切な条件下で試験ＤＮＡ分子を含む宿主細胞を培養すること、次いで必要に応じて（ｉｉｉ）このポリペプチドを細胞培養物から回収すること。

【００３０】

別の実施形態では、本発明は、異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に対して融合された、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドを含むキメラ分子を提供し、ここで、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ

－ＭＧ．７２のポリペプチドは、本明細書中に記載される任意のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、それらの改変体またはフラグメントを含み得る。このようなキメラ分子の一例は、エピトープタグ配列、免疫グロブリンのＦｃ領域または分泌シグナルペプチドに対して融合された、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドを含む。

【００３１】

１つの実施形態では、本発明は組成物を提供し、この組成物は、薬学的に受容可能なキャリアと混合された、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドを含む。１つの局面では、この組成物は、治療有効量のこのポリペプチドを含む。別の局面では、この組成物は、さらなる活性成分、すなわち、心臓血管因子、内皮因子もしくは脈管形成因子または血管増殖抑制（ａｎｇｉｏｓｔａｔｉｃ）因子、好ましくは、脈管形成因子または血管増殖抑制を含む。好ましくは、この組成物は無菌である。

【００３２】

さらなる実施形態では、本発明は、心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害の処置のために有用な、このような組成物を調製するための方法を提供し、この方法は、治療有効量のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドを薬学的に受容可能なキャリアと混合する工程を包含する。

【００３３】

別の実施形態では、本発明は、本明細書中に定義された通りのＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドに対して特異的に結合する、本明細書中に定義された通りの抗体を提供する。必要に応じて、この抗体は、モノクローナル抗体、抗体フラグメントまたは単鎖抗体である。

【００３４】

なお別の実施形態では、本発明は、本明細書中に定義される通りのＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のネイティブなポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストに関する。好ましくは、このアゴニストまたはアンタゴニストは、翻訳後レベル、翻訳レベル、転写レベルまたはトランスロケーションレベルで作用することによって、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の生物学的活性を調節する分子である。特定の実施形態では、このアゴニストまたはアンタゴニストは、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体もしくは抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体、アンチ遺伝子（ａｎｔｉｇｅｎｅ）分子（センスまたはアンチセンス）、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２遺伝子、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２遺伝子、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５遺伝子、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４遺伝子もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２遺伝子（例えば、遺伝子治療のため）または低分子である。

【００３５】

１つのこのような実施形態では、活性なＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の細胞性発現または細胞内濃度もしくは利用可能性を調節するために使用される、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の治療的核酸である。これらの核酸としては、アンチ遺伝子化合物、より代表的にはアンチセンス：ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の開示された核酸の相補体を含む一本鎖配列が挙げられ、そしてまた、遺伝子治療のための、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２およびＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２を発現する核酸が挙げられる。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の発現のアンチ遺伝子調節は、遺伝子調節配列に作動可能に連結された、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ

－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のアンチセンス核酸を用い得る。細胞は、ＰＲＯＣ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の配列を、この遺伝子の転写が、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする内因性ｍＲＮＡに結合し得るアンチセンス転写産物を生じるように方向付けされたプロモーター配列と共に含むベクターでトランスフェクトされる。アンチセンス核酸の転写は、構成性または誘導性であり得、そしてこのベクターは、安定な染色体外維持または組み込みを提供し得る。なお別の実施形態では、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするゲノムＤＮＡまたはＲＮＡに結合する一本鎖アンチ遺伝子核酸は、宿主中の、または宿主から一時的に単離された、標的細胞に、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の発現の実質的な減少をもたらす濃度で投与される。

【００３６】

１つの実施形態では、１以上のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２に特異的な結合親和性（ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２に特異的な少なくとも１つの天然のヒト細胞内結合標的または結合因子（例えば、本明細書中に記載される通りのアッセイにおいて同定される、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２特異的抗体または因子）に特異的に結合する能力を含む）を有する１以上のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２化合物を有する、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の化合物が提供される。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、Ｐ

ＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の天然の結合標的は、細胞、膜ならびに細胞抽出物および細胞画分を、開示された材料および方法でスクリーニングすることによって容易に同定される。例えば、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のフラグメントを用いたツーハイブリッドスクリーニングを用いて、このようなフラグメントに特異的に結合する細胞内標的を同定する。

【００３７】

別の実施形態では、本発明は、薬学的に受容可能なキャリアと混合された、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを含む組成物を提供する。１つの局面では、この組成物は、治療有効量のアゴニストまたはアンタゴニストを含む。別の局面では、この組成物は、さらなる活性成分、すなわち、心臓血管因子、内皮因子もしくは脈管形成因子または血管増殖抑制因子、好ましくは、脈管形成因子または血管増殖抑制因子を含む。

【００３８】

さらなる実施形態では、本発明は、心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害の処置に有用なこのような組成物を調製するための方法を提供し、この方法は、治療有効量のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを薬学的に受容可能なキャリアと混合する工程を包含する。

【００３９】

１つの実施形態では、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２を調節可能な細胞機能のレベルで活性な化合物を同定する効率的な方法を提供する。一般に、これらのスクリーニング方法は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４ま

たはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２と、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の天然の結合標的との相互作用を調整する化合物をアッセイする工程を包含する。この方法は、リード化合物についての化学ライブラリーの自動化された費用効果の高い高スループットスクリーニングとすることができる。タンパク質－タンパク質結合アッセイ、免疫アッセイおよび細胞ベースのアッセイを含めた、結合因子についてのアッセイが、提供される。好ましいアッセイは、高スループットな細胞ベースの、またはインビトロでの結合アッセイである。例えば、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の組成物は、別のペプチドまたはポリペプチド（例えば、タンパク質－タンパク質結合、アッセイ条件下での安定性または検出もしくは係留のためのタグを提供または増強し得るポリペプチド）との融合産物の一部であり得る。このアッセイ混合物は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の天然の細胞内結合標的、またはそれらの活性部分を含み得る。このアッセイ混合物はまた、候補薬理学的因子を含み得る。得られる混合物は、候補薬理学的因子の存在を別にして、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２が細胞性結合標的、部分またはアナログに参考結合親和性で特異的に結合する条件下でインキュベートされる。その因子の存在下での結合親和性と比較した場合の、その因子の非存在下でのＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のタンパク質の標的結合親和性における検出された相違は、その因子が、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の結合標的に対する、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のタンパク質の結合を調整することを示す。同様に、細胞ベースの転写アッセイにおいて、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．

４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の転写誘導における、因子の存在下と非存在下とでの相違は、この因子が、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２によって誘導される転写を調整することを示す。本明細書中で使用される場合、相違は、統計学的に有意であり、好ましくは、少なくとも５０％、より好ましくは、少なくとも９０％の相違を表す。

【００４０】

さらなる実施形態では、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドに対するアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法に関し、この方法は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドを含む細胞、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の核酸のいずれかを、候補分子と接触させる工程、ならびにＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドもしく核酸に対する特異的結合をモニタリングする工程、および／またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドによって媒介される生物学的活性をモニタリングする工程を包含する。好ましくは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のネイティブなポリペプチドである。

【００４１】

別の実施形態では、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１

２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアゴニストを同定するための方法を提供し、この方法は以下の工程を包含する：（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドによって通常誘導されるか、通常刺激されるか、またはこれに通常依存している細胞応答の誘導、刺激または依存性に適切な条件下で、標的細胞と、スクリーニングされる試験化合物とを接触させる工程；および（ｂ）細胞応答の誘導、刺激または依存性を決定して、試験化合物が有効なアゴニストであるか否かを決定する工程であって、ここで、細胞応答の誘導または増強は、試験化合物が有効なアゴニストであることを示す。好ましい実施形態では、この標的細胞は、内因性ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２を試験期間の間発現することを妨げるように操作または処理されている。細胞応答は好ましくは、細胞増殖または管形成である。

【００４２】

別の実施形態では、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアンタゴニストを同定するための方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドによって通常誘導されるか、通常刺激されるか、またはこれに通常依存している細胞応答の誘導、刺激または依存性に適切な条件下で、標的細胞と、スクリーニングされる試験化合物とを接触させる工程；および（ｂ）細胞応答の誘導、刺激または依存性を決定して、試験化合物が有効なアゴニストであるか否かを決定する工程であって、ここで、細胞応答の誘導または増強は、試験化合物が有効なアゴニストであることを示す。好ましい実施形態では、この標的細胞は、内因性ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２を試験期間の間発現することを妨げるように操作または処理されている。細胞応答

は好ましくは、細胞増殖または管形成である。

【００４３】

別の実施形態において、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、PRO－C－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチドの活性を阻害する化合物を同定するための方法を提供し、この方法は、試験化合物およびポリペプチドが相互作用するのを可能にするのに十分な条件および時間で、試験化合物をＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、PRO－C－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ

MG．７２ポリペプチドと接触させる工程、およびＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、PRO－C－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチドの活性が阻害されるかどうかを決定する工程を包含する。特定の好ましい実施形態において、試験化合物またはＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、PRO－C－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチドは、固体支持体上に固定化される。別の好ましい局面において、固定化されていない成分は、検出可能な標識を有する。好ましい局面において、この方法は、以下の工程を包含する：（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチドに対する細胞性応答の誘発、刺激、または依存性に適切な条件下で、細胞と、ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチドの存在下においてスクリーンされる試験化合物とを接触させる工程；および（ｂ）試験化合物が有効なアンタゴニストであるかどうかを決定するために、細胞性応答の誘発、刺激または依存性を決定する工程。別の好ましい局面において、このプロセスは、以下を包含する：（ａ）細胞増殖または管形成のＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチドに対する刺激または依存性に適切な条件下で、細胞と、ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５

、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの存在下でスクリーンされる試験化合物とを接触させる工程；および（ｂ）試験化合物が有効なアンタゴニストであるかどうかを決定するために、細胞増殖または管形成を測定する工程。

【００４４】

別の実施形態において、本発明は、正常にポリペプチドを発現する細胞におけるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの発現を阻害する化合物を同定するための方法を提供し、ここで、この方法は、細胞を試験化合物と接触させる工程、およびＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの発現が阻害されるかどうかを決定する工程を包含する。好ましい局面において、この方法は、以下の工程を包含する：（ａ）細胞と、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの発現を可能にするために適切な条件下でスクリーンされる試験化合物とを接触させる工程；および（ｂ）このポリペプチドの発現の阻害を決定する工程。

【００４５】

なおさらなる実施形態において、本発明は、上記の方法によって同定される化合物のような、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの発現を阻害する化合物を提供する。

【００４６】

本発明の別の局面は、必要に応じて上記の方法によって同定され得るＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストに関する。

【００４７】

本発明はまた、必要に応じて、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１

２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２遺伝子またはｍＲＮＡの５’または３’非翻訳配列の一部を有するＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするポリヌクレオチド配列を含むミクロアレイを提供する。

【００４８】

なおさらなる実施形態において、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、核酸、または本明細書中の上記のそれらのアゴニストもしくはアンタゴニスト、好ましくは、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原分子を、キャリアと組み合わせて含む物質の組成物に関する。必要に応じて、このキャリアは、薬学的に受容可能なキャリアである。

【００４９】

本発明の別の実施形態は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、核酸、アゴニストもしくはアンタゴニストに対して応答性である条件の処置の際に有用な医薬の調製のための、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、核酸、または本明細書中の上記のそれらのアゴニストもしくはアンタゴニスト、好ましくは、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原分子の使用に関する。

【００５０】

別の局面において、本発明は、以下を含む製造の物品を提供する：（ａ）治療

的に有効量のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、または核酸、または本明細書中の上記のそれらのアゴニストもしくはアンタゴニスト、好ましくは、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原分子を含む物質の組成物；（ｂ）この組成物を含む容器；および必要に応じて、（ｃ）この容器に貼り付けられるラベル、または心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害の処置における化合物の使用に関する薬学的製品に含まれるパッケージ挿入物。

【００５１】

なおさらなる局面において、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする核酸配列における変異に関する疾患または疾患に対する感受性を診断するための方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：（ａ）宿主から誘導されるサンプル由来のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする核酸配列を単離または増幅する工程；および（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド核酸配列における変異の存在または非存在を決定する工程であって、ここで、変異の存在または非存在は、この疾患または疾患に対する感受性の存在の指標である、工程。

【００５２】

なおさらなる局面において、本発明は、哺乳動物の心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害を診断する方法を提供し、この方法は、（ａ）哺乳動物から得られる組織細胞の試験サンプル、および（ｂ）同じ細胞型の公知の正常な細胞のコントロール細胞、におけるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを分析する工程を包含し、ここで、コントロールサンプルと比較して、試験サンプルのより高いまたはより低い発現レベルは、この哺乳動物の心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害の存在の指標である。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、必要に応じて、コントロールサンプルと比較して、試験サンプルにおけるｍＲＮＡまたはポリペプチドのレベルを測定する工程によって達成され得る。

【００５３】

なおさらなる局面において、本発明は、哺乳動物の心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害を診断する方法を提供し、この方法は、哺乳動物から得られる組織細胞の試験サンプルにおけるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの存在または非存在を検出する工程を包含し、ここで、試験サンプル中のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの存在または非存在は、哺乳動物の心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害の存在の指標である。

【００５４】

なおさらなる実施形態において、本発明は、哺乳動物の心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害を診断する方法を提供し、この方法は、以下を包含する：抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体を、哺乳動物から得られる組織細胞の試験サンプルと接触させる工程、および（ｂ）試験サンプル中の抗体と、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドとの間の複合体の形成を検出する工程であって、この複合体の形成は、哺乳動物の心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害の存在の指標である、工程。この検

出は、定性的または定量的であり得、同じ細胞型の公知の正常組織細胞のコントロールサンプルにおける複合体形成と比較して実施され得る。試験サンプル中に形成されたより多量のまたはより少量の複合体は、試験組織細胞が得られる哺乳動物の心臓血管不全、内皮不全または脈管形成不全の存在を示す。この抗体は、好ましくは、検出可能な標識を有する。

【００５５】

別の実施形態において、本発明は、サンプル中のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの存在を決定するための方法を提供し、この方法は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドを含むと疑われるサンプルを、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体に曝露する工程、およびサンプルの成分に対するこの抗体の結合を検出する工程、を包含する。

【００５６】

さらなる局面において、本発明は、適切なパッケージ内に、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体または核酸、およびキャリアを含む、心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害の診断キットを提供する。好ましくは、このようなキットは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたは核酸の存在を検出するために、この抗体または核酸を使用するための説明書をさらに含む。好ましくは、このキャリアは、例えば、緩衝液である。好ましくは、この心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害は、癌である。

【００５７】

さらなる実施形態において、本発明は、以下を含む製造の物品を提供する：容器；この容器内に含まれるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、Ｐ

ＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドを含む組成物；および必要に応じて、この容器上のラベルであって、この容器上のラベルは、この組成物が、心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害を処置するために使用され得ることを示す。

【００５８】

さらなる実施形態において、本発明は、以下を含む製造の物品を提供する：容器；この容器内に含まれるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストを含む組成物；および必要に応じて、この容器上のラベルであって、この容器上のラベルは、この組成物が、心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害を処置するために使用され得ることを示す。

【００５９】

さらなる実施形態において、以下を含む製造の物品を提供する：容器；この容器内に含まれる抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体または抗原化合物を含む組成物；および必要に応じて、この容器上のラベルであって、この容器上のラベルは、この組成物が、心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害を処置するために使用され得ることを示す。

【００６０】

なお別の実施形態において、本発明は、哺乳動物の心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害を処置するための方法を提供し、この方法は、有効量のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドを哺乳動物に投与する工程を包含する。好ましくは、この障害は、心臓肥大、血管外傷（例えば、創傷、火傷、または手術）、または癌の型である。さらなる局面において、哺乳動物は、心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害が、癌の型である場合、ＡＣＥインヒビターまたは化学療法剤のような心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害を処置する血管形成術または薬物にさらに曝露される。好ましくは、哺乳

動物は、ヒトである。好ましくは、心臓肥大が進展する危険性があり、より好ましくは、心筋梗塞に罹患しているヒトである。

【００６１】

別の好ましい実施形態において、心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害は、癌であり、そしてＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドは、化学療法剤、成長阻害剤または細胞傷害剤と組み合わせて投与される。

【００６２】

さらなる実施形態において、本発明は、哺乳動物の心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害を処置するための方法に関し、この方法は、有効量のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのアゴニストを哺乳動物に投与する工程を包含する。好ましくは、この心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害は、心臓肥大または血管外傷である。さらに好ましくは、哺乳動物はヒトであり、有効量の血管形成剤がアゴニストと組み合わせて投与される。

【００６３】

さらなる実施形態において、本発明は、哺乳動物の心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害を処置するための方法に関し、この方法は、有効量のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与する工程を包含する。好ましくは、心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害は、癌または年齢関連黄斑変性である。さらに好ましくは、哺乳動物は、ヒトであり、有効量のａｎｇｉｏｓｔａｔｉｃ　ａｇｅｎｔがアンタゴニストと組み合わせて投与される。

【００６４】

さらなる実施形態において、本発明は、哺乳動物の心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害を処置するための方法に関し、この方法は、有効量の抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－

Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体または抗原化合物を、哺乳動物に投与する工程を包含する。好ましくは、心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害は、心臓肥大、血管外傷、癌、または年齢関連黄斑変性である。さらに好ましくは、哺乳動物はヒトである。本明細書中でさらに好ましくは、有効量の血管形成剤またはａｎｇｉｏｓｔａｔｉｃ　ａｇｅｎｔは、抗体を組み合わせて投与される。

【００６５】

なおさらなる実施形態において、本発明は、心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害に罹患する哺乳動物の心臓血管障害、内皮障害または脈管形成障害を処置するための方法を提供し、この方法は、抗原化合物であるか、または（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのアゴニストまたは（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのアンタゴニストのいずれかについてコードする核酸分子を哺乳動物に投与する工程であって、ここでこのアゴニストまたはアンタゴニストが、好ましくは、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体である工程、を包含する。好ましい実施形態において、抗原化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、より好ましくは、センスまたはアンチセンスのペプチド核酸である。好ましい実施形態において、哺乳動物は、ヒトである。別の好ましい実施形態において、遺伝子は、エキソビボ遺伝子治療によって投与される。さらに好ましい実施形態において、遺伝子は、ベクター内に含まれ、より好ましくは、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、またはレトロウイルスベクター内に含まれる。

【００６６】

なお別の局面において、本発明は、レトロベクターを含む組換えレトロウイル

ス粒子を提供し、このレトロベクターは、本質的に、プロモーター、（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチド、（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチドのアゴニストポリペプチド、または（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチドのアンタゴニストポリペプチドをコードする核酸、およびポリペプチドの細胞性分泌のためのシグナル配列からなり、ここで、レトロウイルスベクターは、レトロウイルス構造タンパク質と関連している。好ましくは、このシグナル配列は、天然のＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチド由来のような哺乳動物由来である。

【００６７】

なおさらなる実施形態において、本発明は、レトロウイルス構造タンパク質を発現する核酸構築物を含むエキソビボ産生細胞を供給し、これはまた、本質的に、プロモーター、（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチド、（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチドのアゴニストポリペプチド、または（ｃ）ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチドのアンタゴニストポリペプチドをコードする核酸、およびポリペプチドの細胞性分泌のためのシグナル配列からなり、ここで、この産生細胞は、組換えレトロウイルス粒子を産生するために構造タンパク質と関連しているレトロウイルスベクターをパッケージする。

【００６８】

なお別の実施形態において、本発明は、哺乳動物の内皮細胞増殖を阻害するための方法を提供し、この方法は、（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－M

Ｇ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、または（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのアンタゴニストであって、このアンタゴニストは、好ましくは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原化合物または低分子である、アンタゴニスト、を哺乳動物に投与する工程を包含し、ここで哺乳動物における内皮細胞増殖が、阻害される。好ましくは、この哺乳動物は、ヒトであり、そして内皮細胞増殖は、腫瘍に関連する。

【００６９】

なお別の実施形態において、本発明は、哺乳動物の内皮細胞増殖を刺激するための方法を提供し、この方法は、（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、または（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのアンタゴニストであって、好ましくは、このアンタゴニストは、好ましくは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原化合物（例えば、ＰＮＡ）または低分子である、アンタゴニスト、を哺乳動物に投与する工程を包含し、ここで、哺乳動物の内皮細胞増殖が、刺激される。好ましくは、哺乳動物は、ヒトである。

【００７０】

なお別の実施形態において、本発明は、哺乳動物の管形成を阻害するための方法を提供し、この方法は、（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、または（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのアンタゴニストであって、ここで好ましくは、このアンタゴニストは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－

ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原化合物または低分子である、アンタゴニスト、を哺乳動物に投与する工程を包含し、ここで哺乳動物の管形成が、阻害される。

【００７１】

なお別の実施形態において、本発明は、哺乳動物の管形成を刺激するための方法を提供し、この方法は、（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、または（ｂ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのアンタゴニストであって、ここで、このアンタゴニストは、好ましくは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原化合物または低分子である、アンタゴニスト、を哺乳動物に投与する工程を包含し、ここで、この哺乳動物における管形成が刺激される。

【００７２】

なお別の実施形態において、本発明は、哺乳動物において、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドにより誘導されるか、増強されるか、またはこれらに依存する血管新生を阻害する方法を提供し、この方法は、この哺乳動物に、（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたは（ｂ）　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのアンタゴニスト、ここでこのアンタゴニストは、好ましくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原化合物、または低分子を投与する工程を包含し、そしてここでこの哺乳動物における血管新生が阻害される。好ましくは、この哺乳動物はヒトであり、そしてより好ましくはこの哺乳動物は腫瘍を有する。

【００７３】

なお別の実施形態において、本発明は、哺乳動物において、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドにより誘導されるか、増強されるか、またはこれらに依存する血管新生を刺激する方法を提供し、この方法は、この哺乳動物に、（ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたは（ｂ）　ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのアゴニスト、ここでこのアゴニストは、好ましくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原化合物、または低分子を投与する工程を包含し、そしてここでこの哺乳動物における血管新生が刺激される。好ましくは、この哺乳動物はヒトである。

【００７４】

（図面の簡単な説明）

なし。

【００７５】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

（Ｉ．定義）

用語「ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド」「ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２タンパク質」、および「ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２」は、本明細書中で使用される場合には、ネイティブな配列のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２およびＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－Ｍ

Ｇ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド改変体（これらは本明細書中でさらに定義される）を含む。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドは、種々の供給源から（例えば、ヒトの組織型から）または別の供給源から単離され得るか、あるいは組換えおよび／または合成方法によって調製され得る。

【００７６】

「ネイティブな配列のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２」は、天然に由来するＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２と同じアミノ酸配列を有しているポリペプチドを含む。このようなネイティブな配列のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２は、天然から単離され得るか、または組換えおよび／もしくは合成手段によって産生され得る。用語「ネイティブな配列のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２」は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の、天然に存在している短縮型または分泌された形態（例えば、細胞外ドメイン配列）、天然に存在している改変体の形態（例えば、交互にスプライシングされた形態）、および天然に存在している対立遺伝子改変体を特に含む。本発明の１つの実施形態においては、ネイティブな配列のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２は、成熟のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２であるか、または配列番号２のアミノ酸約１から約５７７、配列番号４のアミノ酸約１から約４７４、配列番号１８のアミノ酸約１から約５０６、配列番号１６のアミノ酸約１から約３４４または配列番号１４のアミノ酸約１から約６３３をそれぞれ含む全長のネイテ

ィブな配列のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２である。また、それぞれ配列番号２または４に開示されているＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドは、アミノ酸位置１として本明細書中で示されているメチオニン残基で開始することが示されており、配列番号１または配列番号３のアミノ酸位置１のコドンの上流または下流のいずれかに配置された開始コドンにコードされる別のメチオニン残基が、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの開始アミノ酸残基として使用され得ることが考えられ得、そしてそのことが可能である。

【００７７】

「ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２改変体ポリペプチド」は、以下のアミノ酸配列と少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有していると本明細書中に定義されているような活性なＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドを意味する：（ａ）それぞれ、配列番号２のアミノ酸約１から約５７７、配列番号４のアミノ酸約１から約４７４、配列番号１８のアミノ酸約１から約５０６、配列番号１６のアミノ酸約１から約３４４または配列番号１４のアミノ酸約１から約６３３の残基、または（ｂ）それぞれ配列番号２または４に示されているアミノ酸配列の別の特異的に誘導されるフラグメント。このようなＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２改変体ポリペプチドとしては、例えば、それぞれ配列番号２または配列番号４の配列のＮ末端および／またはＣ末端、ならびに１つ以上の内部ドメイン中で、１つ以上のアミノ酸残基が付加されているか、または欠失しているＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドが挙げられる。通常は、ＰＲＯ－Ｃ－

ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２改変体ポリペプチドは、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８１％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８４％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８８％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％のアミノ酸配列同一性、そしてなおより好ましくは少なくとも約９９％のアミノ酸配列同一性を、以下に対して有する：（ａ）それぞれ、配列番号２のアミノ酸約１から約５７７、配列番号４のアミノ酸約１から約４７４、配列番号１８のアミノ酸約１から約５０６、配列番号１６のアミノ酸約１から約３４４または配列番号１４のアミノ酸約１から約６３３の残基、または（ｂ）それぞれ配列番号２または４に示されているアミノ酸配列の別の特異的に誘導されるフラグメント。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２改変体ポリペプチドは、ネイティブＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド配列を含まない。通常は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２改変体ポリペプチドは、少なくとも約１０アミノ酸の長さであり、頻繁には少なくとも約２０アミノ酸の長さであり、よ

り頻繁には少なくとも約３０アミノ酸の長さであり、より頻繁には少なくとも約４０アミノ酸の長さであり、より頻繁には少なくとも約５０アミノ酸の長さであり、より頻繁には少なくとも約６０アミノ酸の長さであり、より頻繁には少なくとも約７０アミノ酸の長さであり、より頻繁には少なくとも約８０アミノ酸の長さであり、より頻繁には少なくとも約９０アミノ酸の長さであり、より頻繁には少なくとも約１００アミノ酸の長さであり、より頻繁には少なくとも約１５０アミノ酸の長さであり、より頻繁には少なくとも約２００アミノ酸の長さであり、より頻繁には少なくとも約３００アミノ酸の長さ以上である。

【００７８】

本明細書中で同定されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド配列に関する「パーセント（％）アミノ酸配列同一性」は、配列のアラインメント、および必要である場合には、最大のパーセント配列同一性を達成するためのギャップの導入の後での、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２配列中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割合として、そして配列同一性の一部としては任意の保存的置換は考慮せずに、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、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、ＡＬＩＧＮ－２、またはＭｅｇａｌｉａｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアのような公に入手可能なコンピューターソフトウェアを使用して、当該技術分野の範囲内である種々の方法で達成され得る。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要とされる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ーを決定し得る。しかし、本明細書中での目的のためには、％アミノ酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータープログラムＡＬＩＧＡ－２を使用して以下に記載されているように得られる。ここでは、ＡＬＩＧＮ－２プログラムについての完全なソースコードが、以下の表１に提供される。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータープログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．によって書かれており、そして表１に示されているソースコー

ドは、米国商標庁（Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ　Ｄ．Ｃ．，２０５５９）においてユーザードキュメントとともに整理保管されている。ここでは、これは、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７の下で登録されている。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａを通じて公に入手可能であるか、または表１に提供されているソースコードからコンパイルされ得る。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、ＵＮＩＸ（登録商標）オペレーティングシステム（好ましくは、デジタルＵＮＩＸ（登録商標）Ｖ４．ＯＤ）上での使用のためにコンパイルされるはずである。全ての配列比較パラメーターが、ＡＬＩＧＮ－２プログラムによって設定され、そして変化しない。

【００７９】

【表１】

表 1

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

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

（表１の続き）

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

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

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

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

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

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

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

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

（表１の続き）

```
/* 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 an may contain ambiguity
 *   Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 *   Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 *   A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 *   Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

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

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

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

(表1の続き)

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

（表1の続き）

...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
         */
```

(表1の続き)

```
                id = xx - yy + len1 - 1;
                if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
                        col1[yy] = mis;
                else if (delx >= dely[yy]) {
                        col1[yy] = delx;
                        ij = dx[id].ijmp;
                        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = delx;
                }
                else {
                        col1[yy] = dely[yy];
                        ij = dx[id].ijmp;

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

(表1の続き)

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

（表１の続き）

```
/*
 * 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, "\n");
      fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
          nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
```

(変化の続き)

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

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

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

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

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

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

(表1の続き)

```
        for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {                                   --pr_align
            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()                                                                     dumpblock
{
        register        i;

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

(私しの解釈)

...dumpblock

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

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

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

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

（表１の続き）

...putline

```
    int             i;
    register char *px;

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

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


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

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

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

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

（長いの続き）

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

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

}
```

stripname

（表１の続き）

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

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

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

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

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

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

(元しの参考文)

...getseq

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

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

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

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

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

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

（表1の続き）

...readjmps

```
                if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
                        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
                }
                else
                        break;
        }
        if (i >= JMPS) {
                fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
                cleanup(1);
        }
        if (j >= 0) {
                siz = dx[dmax].jp.n[j];
                xx = dx[dmax].jp.x[j];
                dmax += siz;
                if (siz < 0) {                  /* gap in second seq */
                        pp[1].n[i1] = -siz;
                        xx += siz;

                        /* id = xx - yy + len1 - 1
                         */
                        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
                        gapy++;
                        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
                        i1++;
                }
                else if (siz > 0) {     /* gap in first seq */
                        pp[0].n[i0] = siz;
                        pp[0].x[i0] = xx;
                        gapx++;
                        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
                        i0++;
                }
        }
        else
                break;
    }

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

(表しの続き)

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

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

Page 4 of nwsubr.c

ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータープログラムを使用して、％アミノ酸配列同一性（表２、比較１および２）および％核酸配列同一性（表２、比較３および４）を決定するため、推定の例示を表２の比較１～４に示し、ここで、「ＰＲ

Ｏ」は、目的の推定ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」は、目的の「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表し、「ＰＲＯ－ＤＮＡ」は、目的の推定ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２コード核酸配列を表し、「比較ＤＮＡ」は、目的の「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表し、「Ｘ」、「Ｙ」および「Ｚ」は、それぞれ、異なる推定アミノ酸残基を表し、そして「Ｎ」、「Ｌ」および「Ｖ」は、それぞれ、異なる推定ヌクレオチドを表す。

【００８０】

本明細書中での目的のために、所定の核酸配列Ａの、所定の核酸配列Ｂと、ＢとのまたはＢに対する％核酸配列同一性（これは、所定の核酸配列Ａと、ＡとのまたはＡに対して特定の％核酸配列同一性を有するかまたは％核酸配列同一性を含む所定の核酸配列Ａとして記載され得る）は、以下のように計算される：

割合Ｘ／Ｙの１００倍

ここでは、Ｘは、ＡおよびＢのアラインメントをプログラムしている配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ－２によって同一性適合としてスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、そしてここで、Ｙは、Ｂ中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸残基Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと等しくない場合には、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ことが明らかである。％アミノ酸配列同一性の計算の例として、以下の表２の比較１および２は、ＰＲＯと命名されたアミノ酸配列に対する、比較タンパク質と命名されたアミノ酸配列の％アミノ酸配列同一性を計算するための方法を示す。

【００８１】

【表２】

表2

比較1	PRO	XXXXXXXXXXXXXXX	(長さ =15 アミノ酸)
	比較タンパク質	XXXXXYYYYYY	(長さ =12 アミノ酸)
	%アミノ酸配列同一性＝(ALIGN－2によって決定される2つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数)÷(PROポリペプチドのアミノ酸残基の総数)＝5÷15＝33．3%		
比較2	PRO	XXXXXXXXXX	(長さ =10 アミノ酸)
	比較タンパク質	XXXXXYYYYYYZZYZ	(長さ =15 アミノ酸)
	%アミノ酸配列同一性＝(ALIGN－2によって決定される2つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数)÷(PROポリペプチドのアミノ酸残基の総数)＝5÷10＝50%		
比較3	PRO-DNA	NNNNNNNNNNNNN	(長さ =14 ヌクレオチド)
	比較DNA	NNNNNNLLLLLLLLL	(長さ =16 ヌクレオチド)
	%核酸配列同一性＝(ALIGN－2によって決定される2つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数)÷(PRO－DNA配列のヌクレオチドの総数)＝6÷14＝42．9%		
比較4	PRO-DNA	NNNNNNNNNNN	(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によって決定される2つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数)÷(PRO－DNA核酸配列のヌクレオチドの総数)＝4÷12＝33．3%		

他に特に記載されていない限りは、本明細書中で使用される全ての%アミノ酸配列同一性の値は、ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータープログラムを使用して上記のように得られる。しかし、%アミノ酸配列同一性はまた、配列比較プログラムＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ２（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２５：３３８９－３４０２（１９９７））を使用して決定され得る。ＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ－２配列比較プログラムは、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖからダウンロードされ得る。ＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ２は、いくつかの検索パラメーターを使用する。ここでは、例えば以下を含む、全てのこれらの検索パラメーターは、デフォルト値に設定される：マスクされていない＝ｙｅｓ、鎖＝全て、予想される出現＝１０、最低の複雑性の長さ＝１５／５、ｍｕｌｔｉ－ｐａｓｓ　ｅ値＝０．０１、ｍｕｌｔｉ－ｐａｓｓの定数＝２５、最終的なギャップアラインメントについてのドロップオフ＝２５、およびスコアリングマトリックス＝ＢＬＯＳＵＭ６２。

【００８２】

アミノ酸配列の比較のためにＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ２が使用される状況においては、所定のアミノ酸配列Ａの、所定のアミノ酸配列Ｂと、ＢとのまたはＢに対する％アミノ酸配列同一性（これは、所定のアミノ酸配列Ｂと、ＢとのまたはＢに対して特定の％アミノ酸配列同一性を有するかまたは％アミノ酸配列同一性を含む所定のアミノ酸配列Ａとして別に記載され得る）は、以下のように計算される：

割合Ｘ／Ｙの１００倍

ここでは、Ｘは、ＡおよびＢのアラインメントをプログラムしている配列アラインメントプログラムＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ２によって同一性適合としてスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、そしてここで、Ｙは、Ｂ中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと等しくない場合には、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ことが明らかである。

【００８３】

「ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２改変体ポリヌクレオチド」、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２改変体核酸配列は、本明細書中に定義されているような活性なＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチチドをコードし、そして以下のいずれかと少なくとも約８０％の核酸配列同一性を有している核酸分子を意味する：（ａ）それぞれ、配列番号２の約１～約５７７、配列番号４の約１～約４７４、配列番号１８の約１～約５０６、配列番号１６の約１～約３４４、または配列番号１４の約１～約６３３の残基をコードする核酸配列、または（ｂ）それぞれ、配列番号２または配列番号４で示されるアミノ酸配列の別の特異的に誘導されたフラグメントをコードする核酸配列。通常は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－Ｍ

Ｇ．７２改変体ポリペプチドは、（ａ）それぞれ、配列番号２の約１～約５７７、配列番号４の約１～約４７４、配列番号１８の約１～約５０６、配列番号１６の約１～約３４４、または配列番号１４の約１～約６３３の残基をコードする核酸配列、または（ｂ）それぞれ、配列番号２または配列番号４で示されるアミノ酸配列の別の特異的に誘導されたフラグメントをコードする核酸配列のいずれかと、少なくとも８０％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８１％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８４％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８８％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％の核酸配列同一性、そしてさらにより好ましくは少なくとも約９９％の核酸配列同一性を有する。

【００８４】

通常は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２改変体ポリヌクレオチドは、少なくとも約３０ヌクレオチドの長さ、頻繁には、少なくとも約６０ヌクレオチドの長さ、より頻繁には、少なくとも約９０ヌクレオチドの長さ、より頻繁には、少なくとも約１２０ヌクレオチドの長さ、より頻繁には、少なくとも約１５０ヌクレオチドの長さ、より頻繁には、少なくとも約１８０ヌクレオチドの長さ、より頻繁には、少なくとも約２１０ヌクレオチドの長さ、より頻繁には、少なくとも約２４０ヌクレオチドの長さ、より頻繁には、少なくとも約２７０ヌクレオチドの長さ、より頻繁には、少なくとも約３００ヌクレオチドの長

さ、より頻繁には、少なくとも約４５０ヌクレオチドの長さ、より頻繁には、少なくとも約６００ヌクレオチドの長さ、より頻繁には、少なくとも約９００ヌクレオチド以上の長さである。

【００８５】

本明細書中で同定されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする核酸配列に関する「パーセント（％）核酸配列同一性」は、配列のアラインメント、および必要である場合には、最大のパーセント配列同一性を達成するためのギャップの導入の後での、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２配列をコードする核酸配列中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割合として同定される。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、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、ＡＬＩＧＮ－２、またはＭｅｇａｌｉａｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアのような公に入手可能なコンピューターソフトウェアを使用して、当業者の範囲内である種々の方法において達成され得る。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要とされる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ーを決定し得る。しかし、本明細書中での目的のためには、％核酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータープログラムＡＬＩＧＡ－２を使用することによって以下に記載されているように得られる。ここでは、ＡＬＩＧＮ－２プログラムについての完全なソースコードが、以下の表１に提供される。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータープログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．によって書かれており、そして表１に示されているソースコードは、米国商標庁（Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ　Ｄ．Ｃ．，２０５５９）においてユーザードキュメントとともに整理補完されている。ここでは、これは、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７の下で登録されている。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．　Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａを通じて公に入手可能であるか、または表１に提供されているソースコードからコ

ンパイルされ得る。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、ＵＮＩＸ（登録商標）オペレーティングシステム（好ましくは、デジタルＵＮＩＸ（登録商標）　Ｖ４．ＯＤ）上での使用のためにコンパイルされるはずである。全ての配列比較パラメーターが、ＡＬＩＧＮ－２プログラムによって設定され、そして変化しない。

【００８６】

本明細書中での目的のために、所定の核酸配列Ｃの、所定の核酸配列Ｄと、ＤとのまたはＤに対する％核酸配列同一性（これは、所定の核酸配列Ｄと、ＤとのまたはＤに対して特定の％核酸配列同一性を有するかまたは％核酸配列同一性を含む所定の核酸配列Ｃとして記載され得る）は、以下のように計算される：

割合Ｗ／Ｚの１００倍

ここでは、Ｗは、ＣおよびＤのアラインメントをプログラムしている配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ－２によって同一性適合としてスコア付けされたヌクレオチドの数である。そしてここでは、Ｚは、Ｄ中のヌクレオチドの総数である。核酸配列Ｃの長さが核酸配列Ｄの長さと等しくない場合には、Ｄに対するＣの％核酸配列同一性は、Ｃに対するＤの％核酸配列同一性とは等しくないことが明らかである。％核酸配列同一性の計算の例として、以下の表３および表４は、ＰＲＯと命名された核酸配列に対する、Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ　ＤＮＡと命名された核酸配列の％核酸配列同一性を計算するための方法を示す。

【００８７】

他に特に記載されていない限りは、本明細書中で使用される全ての％アミノ酸配列同一性の値は、ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータープログラムを使用して上記のように得られる。しかし、％アミノ酸配列同一性はまた、配列比較プログラムＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ２（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２５：３３８９－３４０２（１９９７））を使用して決定され得る。ＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ－２配列比較プログラムは、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖからダウンロードされ得る。ＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ２は、いくつかの検索パラメーターを使用する。ここでは、例えば以下を含む、全てのこれらの検索パラメーターは、デフォルト値に設定される：マスクされていない＝ｙｅｓ、鎖＝全て、予想される出現＝１０、最低の複雑性の長

さ＝１５／５、ｍｕｌｔｉ－ｐａｓｓ　ｅ値＝０．０１、ｍｕｌｔｉ－ｐａｓｓの定数＝２５、最終的なギャップアラインメントについてのドロップオフ＝２５、およびスコアリングマトリックス＝ＢＬＯＳＵＭ６２。

【００８８】

アミノ酸配列の比較のためにＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ２が使用される状況においては、所定のアミノ酸配列Ｃの、所定のアミノ酸配列Ｄと、ＤとのまたはＤに対する％アミノ酸配列同一性（これは、所定のアミノ酸配列Ｄと、ＤとのまたはＤに対して特定の％アミノ酸配列同一性を有するかまたは％アミノ酸配列同一性を含む所定のアミノ酸配列Ｃとして別に記載され得る）は、以下のように計算される：

割合Ｘ／Ｙの１００倍

ここでは、Ｘは、ＣおよびＤのアラインメントをプログラムしている配列アラインメントプログラムＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ２によって同一性適合としてスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、そしてここで、Ｙは、Ｄ中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Ｃの長さがアミノ酸配列Ｄの長さと等しくない場合には、Ｄに対するＣの％アミノ酸配列同一性は、Ｃに対するＤの％アミノ酸配列同一性とは等しくないことが明らかである。

【００８９】

他の実施形態においては、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２改変体ポリヌクレオチドは、活性なＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする核酸分子であり、そしてこれはそれぞれ、配列番号２または配列番号４に示される全長のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して、（好ましくは、ストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で）ハイブリダイズし得る。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２改変

体ポリペプチドは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２改変体ポリヌクレオチドによってコードされるものであり得る。

【００９０】

用語「ポジティブ」は、上記のように行われるアミノ酸配列の同一性の比較の状況においては、同一ではないが同様の特性を有する、比較される配列中のアミノ酸残基を含む。目的のアミノ酸残基に対してポジティブな値をスコア付けするアミノ酸残基は、目的のアミノ酸残基に対して同一であるか、または目的のアミノ酸残基の好ましく置換されたもの（以下の表３において定義されている）であるかのいずれかである。

【００９１】

本明細書中での目的のためには、所定のアミノ酸配列Ａの、所定のアミノ酸配列Ｂと、ＢとのまたはＢに対するポジティブの％値（これは、所定のアミノ酸配列Ｂと、ＢとのまたはＢに対して特定の％ポジティブを有するかまたは％ポジティブを含む所定のアミノ酸配列Ａとして別に記載され得る）は、以下のように計算される：

割合Ｘ／Ｙの１００倍

ここでは、Ｘは、ＡおよびＢのアラインメントをプログラムしている配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ－２によって、上記に定義されているようなポジティブ値をスコア付けするアミノ酸残基の数であり、そしてここで、Ｙは、Ｂ中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと等しくない場合には、Ｂに対するＡの％ポジティブは、Ａに対するＢの％ポジティブとは等しくないことが明らかである。

【００９２】

本明細書中に開示されている種々のポリペプチドを記載するために使用される場合は、「単離された」は、同定されており、そしてその天然の環境の成分から分離されているおよび／または回収されているポリペプチドを意味する。好ましくは、単離されたポリペプチドは、それが天然に関連している全ての成分と関連していない。その天然の環境の混入成分は、代表的には、ポリペプチドについて

の診断的な使用または治療的な使用を妨害する材料であり、そしてこの成分としては、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性の溶質または非タンパク質性の溶質が挙げられ得る。好ましい実施形態においては、ポリペプチドは、（１）スピニングキャップシークエネーターの使用によってＮ末端または内部アミノ酸配列の少なくとも１５残基を得るために十分な程度まで、あるいは（２）クマシーブル（好ましくは、銀染色）を使用して非還元条件または還元条件下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥによる均質まで、精製される。単離されたポリペプチドとしては、は組換え細胞中でのインサイチュのポリペプチドが挙げられる。なぜなら、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の天然の環境の少なくとも１つの成分は存在しないからである。しかし、通常は、単離されたポリペプチドは、少なくとも１つの精製工程によって調製される。

【００９３】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする「単離された」核酸分子は、同定され、そして通常はＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする核酸の天然の供給源に関連している少なくとも１つの混入核酸分子から分離されている核酸分子である。好ましくは、単離された核酸は、天然に関連している全ての成分と関連していない。単離されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする核酸分子は、天然に見出される形態またはセッティング以外である。従って、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在する場合には、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする核酸分子とは区別される。しかし、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする単離された核酸分子は、通常はＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－

Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２を発現する細胞中に含まれるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする核酸分子を含む。ここでは、例えば、核酸分子は、天然の細胞のものとは異なる染色体位置に存在する。

【００９４】

用語「制御配列」は、特定の宿主生物体中に作動可能に連結されたコード配列の発現のために必要なＤＮＡ配列をいう。原核生物に適切な制御配列としては、例えば、プロモーター、必要に応じて、オペレーター配列、およびリボソーム結合部位が挙げられる。真核生物細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを利用することが公知である。

【００９５】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係で配置される場合には、「作動可能に連結される」。例えば、プレ配列または分泌リーダーのＤＮＡは、ポリペプチドの分泌に関与しているプレタンパク質として発現される場合には、ポリペプチドのＤＮＡに作動可能に連結される；プロモーターまたはエンハンサーは、それが配列の転写に影響を与える場合には、コード配列に対して作動可能に連結される；あるいは、リボソーム結合部位は、それが翻訳を容易にするように配置される場合には、コード配列に対して作動可能に連結される。一般には、「作動可能に連結される」は、連結されるＤＮＡ配列が連続しており、そしてこのＤＮＡ配列が、分泌リーダーの場合には連続しておりそしてリーディングフレーム内にあることを意味する。しかし、エンハンサーは、連続している必要はない。連結は、便利な制限部位での連結によって達成される。このような部位が存在しない場合には、合成のオリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来の実行に従って使用される。

【００９６】

用語「抗体」は、最も広い意味において使用され、そして例えば、単一の抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２モノクローナル抗体（アゴニ

スト、アンタゴニスト、および中和抗体を含む）、ポリペプチド特異性を有する抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体組成物、単鎖抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体、および抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体のフラグメントを含む（下記を参照のこと）。用語「モノクローナル抗体」は、本明細書中で使用される場合には、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を言う。すなわち、微量で存在し得る可能性のある天然に存在している変異体を除く、個々の抗体を含む集団は同一である。

【００９７】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定可能であり、そして一般には、プローブの長さ、洗浄温度、および塩濃度に依存して、経験的に計算される。一般には、より長いプローブは、適切なアニーリングのためにより高い温度を必要とし、一方、より短いプローブは、より低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは、一般には、相補鎖がそれらの融解温度未満の環境に存在する場合には、変性ＤＮＡが再アニーリングする能力に依存する。プローブとハイブリダイズが可能な配列との間でのより高い程度の相同性が所望されるほど、より高い相対的な温度が使用され得る。結果として、より高い相対的な温度が、反応条件をよりストリンジェントにする傾向にあり、一方、より低い温度はストリンジェントをより低くする傾向にあることが理解される。ハイブリダイゼーション反応のさらなる詳細およびストリンジェンシーの説明については、Ａｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｗｉｌｅｙ　Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，（１９９５）を参照のこと。

【００９８】

「ストリンジェントな条件」または「高ストリンジェンシーの条件」は、本明細書中で定義される場合には、以下によって同定され得る：（１）洗浄（例えば

、５０℃で、０．０１５Mの塩化ナトリウム／０．００１５Mのクエン酸ナトリウム／０．１％のドデシル硫酸ナトリウム）のために、低いイオン強度および高温を使用すること；（２）ハイブリダイゼーションの間に、ホルムアミドのような変性剤（例えば、４２℃で、０．１％のウシ血清アルブミンを有している５０％（ｖ／ｖ）ホルムアミド／０．１％のＦｉｃｏｌｌ／０．１％のポリビニルピロリドン／７５０mMの塩化ナトリウム、７５mMのクエン酸ナトリウムを有する５０mMのリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．５））を使用すること；（３）４２℃で、５０％のホルムアミド、５×ＳＳＣ（０．７５MのＮａＣｌ、０．０７５Mのクエン酸ナトリウム）、５０mMのリン酸ナトリウム（ｐＨ　６．８）、０．１％のピロリン酸ナトリウム、５×デンハルト溶液、超音波処理サケ精子ＤＮＡ（５０ｇ／ｍｌ）、０．１％のＳＤＳ、および１０％のデキストラン硫酸を使用し、４２℃での０．２×ＳＳＣ（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）、および５５℃での５０％のホルムアミドでの洗浄を伴い、続く５５℃でのＥＤＴＡを含有する０．１×ＳＳＣから構成される高ストリンジェンシーの洗浄を伴うこと。

【００９９】

「中程度のストリンジェントな条件」は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓ，１９８９に記載されているように同定され得、そしてこれは、上記のようなような低いストリンジェントの洗浄溶液およびハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、イオン強度、および％ＳＤＳ）の使用を含む。中程度のストリンジェントな条件の一例は、２０％のホルムアミド、５×ＳＳＣ（１５０mMのＮａＣｌ、１５mMのクエン酸三ナトリウム）、５０mMのリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５×デンハルト溶液、１０％のデキストラン硫酸、および２０ｍｇ／ｍｌの変性剤断サケ精子ＤＮＡを含有する溶液中での３７℃で一晩のインキュベーション、続く約３７～５０℃での１×ＳＳＣ中でのフィルターの洗浄である。当業者は、プローブの長さなどの因子に順応させるために必要である場合には、温度、イオン強度などを調節する方法を認識している。

【０１００】

用語「エピトープ（で）タグ化（した）」は、本明細書中で使用される場合には、「タグポリペプチド」に対して融合されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドを含むキメラポリペプチドをいう。タグポリペプチドは、それに対して抗体が作製され得るが、なおそれに対して融合されるポリペプチドの活性を妨害しないように十分に短いエピトープを提供するために十分な残基を有する。タグポリペプチドはまた、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応しないように、かなり特有である。適切なタグポリペプチドは、一般には、少なくとも６個のアミノ酸残基を有し、そして通常は、約８個～５０個の間のアミノ酸残基（好ましくは、約１０個～２０個の間のアミノ酸残基）を有する。

【０１０１】

本明細書中で使用される場合には、「イムノアドヘシン（ｉｍｍｕｎｏａｄｈｅｓｉｎ）」は、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能と異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性を組合せる、抗体様分子をいう。構造的には、イムノアドヘシンは、抗体の抗原認識部位および抗原結合部位以外である（すなわち、「異種」である）所望される結合特異性を有しているアミノ酸配列と、免疫グロブリンの定常ドメイン配列との融合体を含む。イムノアドヘシンの接着部分は、代表的には、レセプターまたはリガンドの少なくとも結合部位を含む連続しているアミノ酸配列である。イムノアドヘシン中の免疫グロブリン定常ドメイン配列は、任意の免疫グロブリン（例えば、ＩｇＧ－１、ＩｇＧ－２、ＩｇＧ－３、またはＩｇＧ－４サブタイプ、ＩｇＡ（ＩｇＡ－１およびＩｇＡ－２を含む）、ＩｇＥ、ＩｇＤ、またはＩｇＭ）から得ることができる。

【０１０２】

本明細書中での目的については、「活性な」または「活性」は、ネイティブの、または天然に存在しているＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の生物学的および／または免疫学的活性を保持しているＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２

、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の形態をいう。ここでは、生物学的活性は、ネイティブのまたは天然に存在しているＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２によって保有される抗原性エピトープに対する抗体の産生を誘導する能力以外の、ネイティブのまたは天然に存在しているＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２によって引き起こされる生物学的機能（阻害または刺激のいずれか）をいう。そして、免疫学的活性は、ネイティブのまたは天然に存在しているＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２によって保有される抗原性エピトープに対する抗体の産生を誘導する能力をいう。

【０１０３】

用語「アンタゴニスト」は、最も広い意味で使用され、そして本明細書中で開示されるネイティブなＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの生物学的活性を、部分的または完全にブロックする、阻害する、または中和する任意の分子を含む。同様の意味において、用語「アゴニスト」は、最も広い意味で使用され、そして本明細書中で開示されるネイティブなＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を含む。適切なアゴニストまたはアンタゴニスト分子としては、特に、アゴニストもしくはアンタゴニスト抗体もしくは抗体フラグメント、またはネイティブなＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのフラグメントもしくはアミノ酸配列改変体、ペプチド、アンチセンス分子、低有機分子などが挙げられる。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを同定するための方法は、Ｐ

ＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、ｍＲＮＡもしくは遺伝子を、候補のアゴニストまたはアンタゴニスト分子と接触させる工程、およびＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドと通常は関連した１つ以上の生物学的活性の検出可能な変更を測定する工程を包含し得る。

【０１０４】

「処置」は、治療的処置、および予防的（ｐｒｏｐｈｙｌａｃｔｉｃ）または予防的（ｐｒｅｖｅｎｔｉｖｅ）措置（ｍｅａｓｕｒｅ）の両方をいう。ここでは、目的は、標的化された病理学的状態または障害を予防することまたは遅らせる（軽減する）ことである。より詳細には、「処置」は、心臓血管、内皮、新血管形成または脈管形成の障害または状態の発症を予防するまたは症状を変化させる意図で行われる介入である。処置の概念は、最も広い意味で用いられ、そして特に、任意の段階での疾患または状態の予防（ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ）（予防（ｐｒｏｐｈｙｌａｘｉｓ））、減退（ｍｏｄｅｒａｔｅ）、低下（ｒｅｄｕｃｔｉｏｎ）、および治癒を含む。従って、「処置」は、、治療的処置、および予防的（ｐｒｏｐｈｙｌａｃｔｉｃ）または予防的（ｐｒｅｖｅｎｔｉｖｅ）措置（ｍｅａｓｕｒｅ）の両方をいい、ここで、目的は、障害または状態を予防または減速（減少）させることである。この障害は、任意の原因（突発性、心臓萎縮性（ｃａｒｄｉｏｔｒｏｐｈｉｃ）、または筋萎縮性（ｍｙｏｔｒｏｐｈｉｃ）の原因、または虚血もしくは虚血性発作（例えば、心筋梗塞）を含む）から生じ得る。処置を必要としている者は、すでに障害を有している者、障害を有する傾向にある者、および障害が予防されている者を含む。

【０１０５】

「慢性的な」投与は、延長された期間の最初の治療効果（活性）を最大にするように、急速な態様とは対照的に、持続的な態様での薬剤の投与をいう。「断続的な」投与は、中断を伴わずに連続的には行われないが、むしろ本質的には周期的である処置である。

【０１０６】

「マイクロアレイ」は、紙、ナイロン、または他の型の膜、フィルター、ゲル、ポリマー、チップ、スライドガラス、または任意の他の適切な支持体（固体支持体を含む）のような基材に配置されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのアレイをいう。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド（骨格化学は当該分野で利用可能ないずれかで有り得る）は、基材上で合成され得るか、または基材上に適用する前に調製され得る。

【０１０７】

処置の目的について「哺乳動物」は、哺乳動物（ヒト、飼育動物（ｄｏｍｅｓｔｉｃ　ａｎｉｍａｌ）、および家畜動物を含む）、および動物園の動物、変種（ｓｐｏｒｔ）、またはペット動物（例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなど）として分類される任意の動物をいう。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【０１０８】

１つ以上のさらなる治療剤「と組合せた」投与は、同時の（並行して）および任意の順序での連続的な投与を含む。

【０１０９】

「キャリア」は、本明細書中で使用される場合には、薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤を含む。これらは、使用される投与量および濃度では、それに対して暴露される細胞または哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に受容可能なキャリアは、しばしば、水性のｐＨ緩衝化された溶液である。

【０１１０】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の一部、好ましくは、インタクトな抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体フラグメントの例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦｖフラグメント；ダイアボディー（ｄｉａｂｏｄｙ）；直鎖状の抗体（Ｚａｐａｔａら、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．，８（１０）：１０５７－１０６２（１９９５））；単鎖抗体分子；ならびに抗体フラグメントから形成された多重特異的抗体が挙げられる。

【０１１１】

抗体のパパイン消化によって、２つの同一の抗原結合フラグメント（「Ｆａｂ」フラグメントと呼ばれる）が生じる。これらのそれぞれが、単一の抗原結合部位および残りの「Ｆｃ」（これは、容易に結晶化する能力を反映する名称である）フラグメントを有する。ペプシン処理によって、２つの抗原結合部位を有し、そしてなお抗原を架橋し得るＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを生じる。

【０１１２】

「Ｆｖ」は、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最少の抗体フラグメントである。この領域は、密接な共有結合していない、１つの重鎖可変ドメインおよび１つの軽鎖可変ドメインの二量体から構成される。この立体配置においては、それぞれの可変ドメイン中の３つのＣＤＲが、ＶＨ－ＶＬ二量体の表面上での抗原結合部位を定義するように相互作用する。全部で６個のＣＤＲが、抗体に対して抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン（または抗原に特異的な３個のＣＤＲのみを含むＦｖの半分）が、抗原を認識しそして結合する能力を有するが、完全な結合部位よりも親和性が低い。

【０１１３】

Ｆａｂフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の最初の定常ドメイン（ＣＨ１）を含む。Ｆａｂフラグメントは、抗体ヒンジ領域に由来する１つ以上のシステインを含む重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端での数個の残基の付加によってＦａｂ’フラグメントとは異なる。Ｆａｂ’－ＳＨは、Ｆａｂ’についての本明細書中での名称である。ここでは、定常ドメインのシステイン残基は、遊離のチオール基を保有している。Ｆ（ａｂ’）$_2$抗体フラグメントは、通常は、それらの間にヒンジシステインを有するＦａｂ’フラグメントの対として産生された。抗体フラグメントの他の化学的なカップリングもまた、公知である。

【０１１４】

任意の脊椎動物種に由来する抗体（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、κおよびλと呼ばれる、２つの明らかに異なる型の１つに割り当てられ得る。

【０１１５】

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割り当てられ得る。免疫グロブリンの５個の主要なクラスが存在する：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、およびＩｇＭ。そしてこれらのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、およびＩｇＡ２）にさらに分類され得る。

【０１１６】

「単鎖Ｆｖ」または「ｓＦｖ」抗体フラグメントは、抗体のＶＨドメインおよびＶＬドメインを含む。ここでは、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。好ましくは、Ｆｖポリペプチドはさらに、ＶＨドメインとＶＬドメインとの間にポリペプチドリンカーを含む。これによって、ｓＦｖが抗原結合のために所望される構造を形成することが可能となる。ｓＦｖの総説については、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ、Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、第１１３巻、Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ ａｎｄ Ｍｏｏｒｅ編、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、２６９－３１５頁（１９９４）。

【０１１７】

用語「ダイアボディー（ｄｉａｂｏｄｙ）」は、２つの抗原結合部位を有する小さい抗体フラグメントをいう。これらのフラグメントは、同じポリペプチド鎖（ＶＨ－ＶＬ）中で、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に対して連結された重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含む。同じ鎖上の２つのドメイン間での対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインが、別の鎖の相補ドメインと対合するように強制し、そして２つの抗原結合部位を作製する。ダイアボディーは、例えば、第ＥＰ ４０４，０９７号；第ＷＯ９３／１１１６１号；およびＨｏｌｌｉｎｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０：６４４４－６４４８（１９９３）により完全に記載されている。

【０１１８】

「単離された」抗体は、同定され、そしてその天然の環境の成分から分離および／または回収されている抗体である。その天然の環境の混入成分は、抗体の診断的または治療的な使用を妨害する材料であり、そしてこれらの成分としては、

酵素、ホルモン、および他のタンパク質様または非タンパク質様の溶質が挙げられ得る。好ましい実施形態においては、抗体は、Ｌｏｗｒｙ法によって決定されるような抗体の９５重量%以上を超えるまで、そして最も好ましくは、９９重量%を超えるまで、（２）スピニングキャップシークエネーターの使用によってＮ末端および内部アミノ酸配列の少なくとも１５残基を得るために十分な程度まで、あるいは（３）クマシーブル（好ましくは、銀染色）を使用して還元条件または非還元条件下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥによる均質まで、精製される。単離された抗体としては、組換え細胞中でのインサイチュの抗体が挙げられる。なぜなら、抗体の天然の環境の少なくとも１つの成分は存在しないからである。しかし、通常は、単離された抗体は、少なくとも１つの精製工程によって調製される。

【０１１９】

用語「標識」は、本明細書中で使用される場合には、検出可能である化合物または組成物をいう。これは、「標識された」抗体を生成するように、抗体に対して直接または間接的に結合される。標識は、それ自体によって検出可能（例えば、放射性同位元素または蛍光標識）であり得るか、あるいは酵素標識の場合においては、検出可能である基質化合物または組成物の化学的な変化を触媒し得る。

【０１２０】

「固相」によって、それに対して本発明の抗体が接着し得る非水性のマトリックスが意味される。本明細書中に含まれる固相の例としては、部分的または全体が、ガラス（例えば、制御された孔ガラス）、ポリサッカライド（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、およびシリコーンから形成されるものが挙げられる。特定の実施形態においては、状況に依存して、固相は、アッセイプレートのウェルを含み得る；他のものでは、精製カラム（例えば、アフィニティー精製カラム）である。この用語はまた、離散性の粒子の不連続な固相（例えば、米国特許第４，２７５，１４９号に記載されているもの）をも含む。

【０１２１】

「リポソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質、および／または境界活性剤の、小さい小胞化合物である。これは、哺乳動物への薬物（例えば、ＰＲＯ－Ｃ－

ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそれに対する抗体）の送達に有用である。リポソームの成分は、生物学的な膜の脂質の組み合わせ（ａｒｒａｎｇｅ）と同様に、二重層の形成において共通して準備される。

【０１２２】

低分子は、約５００ダルトン未満の分子量を有するとして、本明細書中で定義される。

【０１２３】

句「血管または脈管形成障害」、「血管または脈管形成不全」は、交換可能に用いられ、そして血管に影響する全身性障害（例えば、真性糖尿病）、および血管自身（例えば、動脈、毛細血管、静脈、および/またはリンパ球）の疾患の一部をいう。これは、脈管形成、心臓血管新生、および/または新生血管形成を刺激する兆候、および脈管形成、心臓血管新生、および/または新生血管形成を阻害する兆候を含む。

【０１２４】

「肥厚」は、本明細書中で用いられる場合、腫瘍形成を伴わない自然の増殖に依存しない、多く器官または構造の増加として規定される。器官または組織の肥厚は、個々の細胞の質量の増加（実際の肥厚）、または組織を作る細胞の数の増加（過形成）、あるいはその両方のいずれかに起因する。特定の器官（例えば、心臓）は、出生後直ぐに分裂する能力を失う。従って、「心臓肥厚」は、心臓の質量における増加として定義される。これは、成体において、筋細胞のサイズの増加、および細胞分裂を伴わない収縮性のタンパク質量により特徴付けられる。肥厚を刺激することを担うストレスの特徴（例えば、前負荷の増加、後負荷の増加、筋細胞の損失、心筋梗塞場合、または収縮性の一時性低下）は、応答の特徴を決定する際に重要な役割を果たすことが明かである。心臓肥厚の初期段階は、通常、筋原線維およびミトコンドリアのサイズの増加により、ならびにミトコンドリアおよび核の拡大により形態学的に特徴付けられる。この段階では、筋細胞は、通常よりも大きいが、細胞機構は、ほぼ保存される。心臓肥厚のより進行した段階では、特定の細胞小器官（例えば、ミトコンドリア）のサイズまたは数の

優先的な増加が存在し、そして新規の収縮性要素は、不規則な様式で、細胞の局部に添加される。長年の肥厚に供された細胞は、細胞機構におけるより明白な破壊を示す。これは、高度に分葉した膜を伴う著しく拡大した核を含む。これは、正常なＺバンドのレジストレーションの崩壊を引き起こす。句「心臓肥厚」は、この状態の進行の全ての段階を含み、根底にある心臓疾患にかかわらず、心筋の構造的損傷の種々の程度により特徴付けられように用いられる。それ故、この用語はまた、血圧の上昇、大動脈狭窄症、または心筋梗塞のような、心臓の肥厚の発症のきっかけとなる生理学的状態を含む。

【０１２５】

「心不全」は、心臓機能の異常をいう。ここで、心臓は、組織を代謝するための要求に必要とされる速度で血液をポンプしない。心不全は、多数の因子（虚血形態、先天性形態、リウマチ形態、または突発性形態を含む）により引き起こされ得る。

【０１２６】

「うっ血性心不全」は、進行性の病理的状態である。ここで、心臓は、末梢組織に酸素添加血液を送達するために、適切な心拍出量（経時的に心臓によりポンプされる血液の容量）を漸増的に供給することができない。ＣＨＦが進行する場合、構造的および血行力学的損傷が生じる。これらの損傷は、種々の兆候を有するが、１つの特徴的症状は、心室の肥厚である。ＣＨＦは、多数の種々の心臓障害の結果の共通の結末である。

【０１２７】

「心筋梗塞」は、一般に、冠動脈の動脈硬化症から生じ、しばしば、重ね合わされた冠血栓を伴う。それは、２つの主要なタイプに分けられ得る：貫壁性梗塞（これは、心筋壊死が心室壁の全厚を包含する）、および心内膜下（非貫壁性）梗塞（これは、心内膜下、壁内心筋、またはその両方を包含するが、心室壁を通って心外膜まで全面的に及ばない）。心筋梗塞は、血行動態効果の変化および心臓の損傷域および健常域の構造の変化の両方を引き起こすことが知られている。従って、例えば、心筋梗塞は、心臓の最大心拍出量および脈拍容量を減少する。また、心筋梗塞と関連するのは、隙間において生じるＤＮＡ合成の刺激および罹

患していない心臓の領域におけるコラーゲンの形成の増加である。

【０１２８】

弁上部「大動脈狭窄」は、上行大動脈が狭くなることによって特徴付けられる遺伝性血管障害であるが、しかし他の大動脈（肺動脈を含む）もまた罹患され得る。未処置の動脈狭窄は、心臓内圧の増加を招き、心筋肥大を生じ、そして最終的には、心不全および死亡を生じ得る。この障害の病原は、十分に理解されていないが、しかし、内側平滑筋の肥大およびおそらく過形成がこの障害の顕著な特徴である。エラスチン遺伝子の分子改変体が、大動脈狭窄の発症および病原に関与することが報告されている。米国特許第５，６５０，２８２号（１９９７年７月２２日発行）。

【０１２９】

「弁逆流」は、心臓弁の障害で生じる心疾患の結果として生じる。リウマチ熱のような種々の疾患が、弁開口部の縮小または隔離を引き起こし得るが、一方、他の疾患は、心内膜炎、心内膜または房室弁開口部の内層膜の炎症および心臓の手術を生じ得る。心臓弁狭窄の狭化または心臓弁の欠陥的閉鎖のような欠陥が、心臓腔中の血液の蓄積または心臓弁を通り過ぎる血液の逆流を生じる。矯正されなければ、長期の心臓弁狭窄または不全は、心臓肥大および心筋に関連した損傷を生じ得、これは最終的に、弁置換を必要とし得る。

【０１３０】

これらの全て、および他の心臓血管（内皮関与）障害および血管形成障害の処置は、本発明によって包含される。

【０１３１】

用語「癌」、「癌性」、および「悪性」は、調節されない細胞増殖によって代表的に特徴付けられる生理学的状態をいう、または記載する。

【０１３２】

用語「新生血管形成（ｎｅｏｖａｓｃｕｌａｒｉｚａｔｉｏｎ）」は、血管を通常含まない組織における血管の成長および発達、または組織において通常であるのとは異なる血管の成長および発達をいう。

【０１３３】

本明細書中で使用する用語「細胞傷害剤」は、細胞の機能を阻害または妨害する、かつ／または細胞の破壊を引き起こす物質をいう。用語は、放射性同位体（例えば、１３１Ｉ、１２５Ｉ、９０Ｙ、および１８６Ｒｅ）、化学療法剤、および毒素（例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素活性毒素）またはそれらのフラグメントを包含することを意図される。

【０１３４】

「化学療法剤」は、癌の処置において有用な化学的化合物である。化学療法剤の例は、アルキル化剤、葉酸アンタゴニスト、核酸代謝の抗代謝物、抗生物質、ピリミジンアナログ、５－フルオロウラシル、シスプラチン、プリンヌクレオシド、アミン、アミノ酸、トリアゾールヌクレオシド、またはコルチコステロイドを包含する。特定の例は、アドリアマイシン、ドキソルビシン、５－フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（「Ａｒａ－Ｃ」）、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン、タキソール、タキソテル（Ｔｏｘｏｔｅｒｅ）、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イフォスファミド、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ビンクレスチン（Ｖｉｎｃｒｅｉｓｔｉｎｅ）、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（ｃａｒｍｉｎｏｍｙｃｉｎ）、アミノプテリン、ダクチノマイシン、ミトマイシン、エスペラマイシン（米国特許第４，６７５，１８７号を参照のこと）、メルファラン、および他の関連ナイトロジェンマスタードを包含する。この定義内には、腫瘍に対してホルモン作用を調節または阻害するように作用するホルモン剤（例えば、タモキシフェンおよびオナプリストン）もまた含まれる。

【０１３５】

本明細書中で使用される場合「増殖阻害剤」は、細胞（例えば、Ｗｎｔ過剰発現癌細胞）の増殖をインビトロまたはインビボのいずれかで阻害する化合物または組成物をいい、そして血管新生阻害剤を含み、そして本明細書中では、血管新生阻害剤と交換可能に使用される。従って、増殖阻害剤は、例えば、Ｓ期の悪性細胞の割合を有意に減少する薬剤である。増殖阻害剤の例は、細胞周期進行をブロックする薬剤（Ｓ期以外の場所で）（例えば、Ｇ１阻止およびM期阻止を誘導

する薬剤）を包含する。古典的なM期遮断薬は、ビンカ類（ビンクリスチンおよびビンブラスチン）、タキソール、およびトポＩＩインヒビター（例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、エトポシドおよびブレオマイシン）を包含する。Ｇ１を阻止する薬剤は、Ｓ期阻止にもあふれ出る（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、デカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、５－フルオロウラシル、およびａｒａ－Ｃ））。さらなる情報は、Ｔｈｅ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ, ＭｅｎｄｅｌｓｏｈｎおよびＩｓｒａｅｌ編、Ｃｈａｐｔｅｒ １、標題「Ｃｅｌｌ ｃｙｃｌｅ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ, ｏｎｃｏｇｅｎｅｓ, ａｎｄ ａｎｔｉｎｅｏｐｌａｓｔｉｃ ｄｒｕｇｓ」、Ｍｕｒａｋａｍｉら、（ＷＢ Ｓａｕｎｄｅｒｓ： Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ, １９９５）、特に１３頁において見出され得る。さらなる例は、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）、酸性もしくは塩基性ＦＧＦまたは肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）の血管形成活性を阻害または中和し得る抗体、組織因子、プロテインＣ、またはプロテインＳの凝固活性を阻害または中和し得る抗体（ＷＯ９１／０１７５３（１９９１年2月２１日発行）を参照のこと）、またはＨＥＲ２レセプターに結合し得る抗体（ＷＯ８９／０６６９２）（例えば、４Ｄ５抗体）（およびそれらの機能的等価物）を包含する（例えば、ＷＯ９２／２２６５３）。

【０１３６】

「心臓血管剤」は、一般に、心臓血管障害を処置する際に作用する任意の薬物をいう。心臓血管剤の例は、血圧、心拍数、心収縮力、および内皮および平滑筋生物学（これらの全ては、心臓血管疾患において役割を有する因子である）を調整することにより血管ホメオスタシスを促進する薬剤である。これらの特定の例は、アンジオテンシン－ＩＩレセプターアンタゴニスト；エンドテリンレセプターアンタゴニスト（例えば、ＢＯＳＥＮＴＡＮ™およびＭＯＸＯＮＯＤＩＮ™のような）；インターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）；デス－アスパルテート－アンジオテンシンＩ；血栓溶解剤（例えば、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、ｔ－ＰＡ、およびより長い半減期および非常に高いフィブリン特異性を有するように特に設計されたｔ－ＰＡ改変体であるＴＮＫ ｔ－ＰＡ （ａ Ｔ１０３Ｎ,

Ｎ１１７Ｑ，ＫＨＲＲ（２９６－２９９）ＡＡＡＡｔ－ＰＡｖａｒｉａｎｔ，Ｋｅｙｔ ｅｔａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９１，３６７０－３６７４（１９９４））；変力（ｉｎｏｔｒｏｐｉｃ）または高血圧剤（例えば、ジゴキシゲニン）およびβアドレナリン作用レセプター遮断剤（例えば、プロプラノロール、チモロール、テルタロロール（ｔｅｒｔａｌｏｌｏｌ）、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロール、およびカルベジロール）；アンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）インヒビター（例えば、キナプリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリルおよびリシノプリル）；利尿薬（例えば、クロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメタジド（ｈｙｄｒｏｆｌｕｍｅｔｈａｚｉｄｅ）、メチルクロチアジド（ｍｅｔｈｙｌｃｈｌｏｔｈｉａｚｉｄｅ）、ベンズチアジド（ｂｅｎｚｔｈｉａｚｉｄｅ）、ジクロフェナミド、アセタゾラミド、およびインダパミド；ならびにカルシウムチャネル遮断薬（例えば、ジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル、ニカルジピン）を包含する。

【０１３７】

「血管形成剤」および「内皮剤」は、血管形成（ａｎｇｉｏｇｅｎｅｓｉｓ）および／または内皮細胞増殖、または適用可能であれば、脈管形成（ｖａｓｃｕｌｏｇｅｎｅｓｉｓ）を促進する活性薬剤である。これは、創傷治癒を促進する因子（例えば、成長ホルモン、インスリン様増殖因子－Ｉ（ＩＧＦ－Ｉ）、ＶＥＧＦ、ＶＩＧＦ、ＰＤＧＦ、上皮増殖因子（ＥＧＦ）、ＣＴＧＦおよびそのファミリーのメンバー、ＦＧＦ、ならびにＴＧＦ－αおよびＴＧＦ－β）を包含する。

【０１３８】

「血管新生阻害剤」は、血管形成もしくは脈管形成を阻害するか、またはそうでなければ癌細胞の増殖を阻害または防止する活性薬剤である。例は、上記のような血管形成剤に対する抗体または他のアンタゴニスト（例えば、ＶＥＧＦに対する抗体）を包含する。それらはさらに、細胞療法剤（例えば、細胞傷害剤）、化学療法剤、増殖阻害剤、アポトーシス剤、および癌を処置するための他の薬剤

（抗ＨＥＲ－２、抗ＣＤ２０、ならびに他の生物活性剤および有機化学剤）を包含する。

【０１３９】

「内皮細胞」は、内皮組織の細胞を意味し、これは、漿膜性心膜腔、心臓、血管およびリンパ管を裏打ちする膜を含む。

【０１４０】

本発明の背景における薬理学的意味においては、活性薬剤（例えば、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそれらに対するアゴニストもしくはアンタゴニストまたは抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－ＣＭＧ．７２抗体）の「治療有効量」は、哺乳動物における心臓血管障害、内皮障害、または血管形成障害の処置における有効量をいい、そして経験的に決定され得る。有効量は、処置される状態を予防するか、その悪化を減少させるか、軽減するか、もしくは治癒するか、または細胞応答、生物学的活性、もしくは述べられた目的を刺激するか、減少するか、または阻害する。

【０１４１】

本明細書中で使用されるように、活性薬剤（例えば、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－ＣＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそれらに対するアゴニストもしくはアンタゴニストまたは抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体）の「有効量」は、述べられた目的を実施するために有効な量をいう。ここで、このような量は、所望の効果について経験的に決定され得る。有効量は、細胞応答、生物学的活性、または述べられた目的を刺激、増強、減少または阻害し得る。

【０１４２】

（ＩＩ．本発明の組成物および方法）

（Ａ．全長ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－Ｍ

Ｇ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド）

本発明は、本出願でＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２と称するポリペプチドをコードする新たに同定されそして単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードするＤＮＡは、以下の実施例でさらに詳細に開示されているように、同定しそして単離した。簡便化のため、本明細書においては、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．２－１７７６、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．１２－１７７６、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．４５－１７７６、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．６４－１７７６もしくはＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．７２－１７７６によってコードされたタンパク質ならびにＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の前述の定義内に含まれる全てのさらなるネイティブホモログおよび改変体を、それらの起源または調製形態に関わらず、「ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２」と呼ぶ。

【０１４３】

以下の実施例において開示されるように、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．２－１７７６、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．１２－１７７６、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．４５－１７７６、ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．６４－１７７６もしくはＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．７２－１７７６と称されるｃＤＮＡクローンは、ＡＴＣＣに寄託されている。クローンの実際のヌクレオチド配列は、当該分野で慣用の技術を用いる寄託されたクローンの配列決定により、当業者によって容易に決定され得る。推定アミノ酸配列は、慣用の技術を用いてヌクレオチド配列から決定され得る。本明細書中に記載されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドおよびコードされた核酸配列については、出願人は、当時利用可能な配列情報で最良に同定可能な読み枠であると思われたものを同定した。

【０１４４】

配列番号１は、ネイティブ配列ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２をコードするヌクレオチド配列（ヌクレオチド１－２８９１）を含むｃＤＮＡを示し、ここで、ヌクレオチド配列（配列番号１）は、本明細書中で「ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．２－１７７６」と称されるクローンである。配列番号２は、配列番号１のコード配列に由来するようなネイティブ配列ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号２）を示す。

【０１４５】

配列番号３は、ネイティブ配列ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２をコードするヌクレオチド配列（ヌクレオチド１－２１１９）を含むｃＤＮＡを示し、ここで、ヌクレオチド配列（配列番号３）は、本明細書中で「ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．１２－１７７６」と称されるクローンである。配列番号４は、配列番号３のコード配列に由来するようなネイティブ配列ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号４）を示す。

【０１４６】

（Ｂ．ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２改変体）

本明細書に記載されている全長のネイティブな配列のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドに加えて、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２改変体を調製し得ることが意図されている。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２改変体は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２　ＤＮＡ中に適切なヌクレオチド変化を導入し、そして／または所望のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドを合成して調製し得る。当業者は、アミノ酸変化によってＰＲ

Ｏ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の翻訳後プロセスが変わり得る、例えば、グリコシル化部位の数もしくは位置を変えるかまたは膜アンカー形成特徴を変えられ得ることを理解する。

【０１４７】

ネイティブな全長配列のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２または本明細書に記載されているＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の種々のドメインにおける改変は、例えば、米国特許第５，３６４，９３４号中に記載されている、例えば保存的および非保存的突然変異に関する任意の技術や指針を使用して行われ得る。改変は、ネイティブな配列のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２と比較したとき、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のアミノ酸配列が変化しているＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする１つ以上のコドンの置換、欠失または挿入であり得る。必要に応じて、上記バリエーションは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の１つ以上のドメイン中の少なくとも１個のアミノ酸を他の任意のアミノ酸で置換することによるものである。所望の活性に悪い影響を与えることなくどのアミノ酸残基を挿入し、置換し、または欠失させ得るのかを決定する際の手引きは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の配列を公知の相同性タンパク質分子の配列と比較しそして高い相同性領域中でなされるアミノ酸配列変化の数を最小限にすることによって見いだされ得る。アミノ酸置換は、１つのアミノ酸を同様な構造および／または化学的特性を有する別のアミノ酸で置換すること、例えばセリンによるロイ

シンの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果であり得る。挿入または欠失は、必要に応じて、約１～５個のアミノ酸の範囲内であり得る。可能な改変は、配列内のアミノ酸の挿入、欠失または置換を系統的に行い、そして得られた改変体を全長または成熟ネイティブな配列のが示す活性について試験することによって決定し得る。

【０１４８】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのフラグメントを本明細書中で提供する。このようなフラグメントはＮ末端またはＣ末端で短縮され得るかまたは、例えば、全長の天然タンパク質と比較したとき、内部残基を欠失し得る。特定のフラグメントは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの所望の生物学的活性に必須でないアミノ酸残基を欠失している。

【０１４９】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２フラグメントは多数の従来技術のうちのいずれかで調製され得る。所望のペプチドフラグメントは化学的に合成され得る。代替的なアプローチは酵素的消化によって、例えば特定のアミノ酸残基によって特定される部位のタンパク質を切断することが公知の酵素でタンパク質を処理するかまたは適切な制限酵素でＤＮＡを消化し、そして所望のフラグメントを単離することによってＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２フラグメントを産生することを含む。なおもう１つの適切な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって、所望のポリペプチドフラグメントをコードするＤＮＡフラグメントを単離しそして増幅することを包含する。ＰＣＲにおいては、ＤＮＡフラグメントの所望の末端を規定するオリゴヌクレオチドが５’および３’プライマーに使用される。好ましくは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４

もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドフラグメントは、それぞれ配列番号２または配列番号４に示されているネイティブＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドと少なくとも１つの生物学的および／または免疫学的活性を共有している。

【０１５０】

特定の実施形態においては、目的の保存的置換を好ましい置換という標題で表３中に示す。このような置換によって生物学的活性が変化する場合には、表３中で例示的な置換と命名されているかまたはアミノ酸クラスに関して以下でさらに記載されている、より一層実質的な変化を導入しそして産物をスクリーニングする。

【０１５１】

【表３】

表３

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

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの機能または免疫学的活性における実質的な改変は、以下を維持する際にそれらの効果が有意に異なる置換を選択することによって達成される：（ａ）置換の領域におけるポリペプチド骨格の構造（例えば、シートもしくはヘリックスコンフォメーションとして）；（ｂ）標的部位の分子の電荷もしくは疎水性；または（ｃ）側鎖のかさ。天然に存在する残基は、一般の側鎖特性に基づいてグループに分けられる：（１）疎水性：ノルロイシン、ｍｅｔ、ａｌａ、ｖａｌ、ｌｅｕ、ｉｌｅ；（２）中性親水性：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；および（６）芳香族：ｔｒｐ、ｔｙｒ、ｐｈｅ。

【０１５２】

非保存的置換は、これらのクラスの１つのメンバーを別のクラスのものに変更することを包含する。このような置換残基はまた、保存的置換部位、またはより好ましくは、残存する（保存されない）部位に導入され得る。

【０１５３】

このバリエーションは、オリゴヌクレオチド媒介性（部位特異的）変異誘発、アラニンスキャニングおよびＰＣＲ変異誘発のような当該分野で公知の方法を使用して行い得る。クローン化したＤＮＡに対して、部位特異的変異誘発［Ｃａｒｔｅｒら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１３：４３３１（１９８６）；Ｚｏｌｌｅｒら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、１０：６４８７（１９８７）］、カセット変異誘発［Ｗｅｌｌｓら、Ｇｅｎｅ、３４：３１５（１９８５）］、制限選択変異誘発［Ｗｅｌｌｓら、Ｐｈｉｌｏｓ．Ｔｒａｎｓ．Ｒ．Ｓｏｃ．Ｌｏｎｄｏｎ　ＳｅｒＡ、３１７：４１５（１９８６）］または他の公知の技術を実行して、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２改変体ＤＮＡを産生し得る。

【０１５４】

スキャニングアミノ酸分析をまた使用して、連続的な配列に沿って１個以上のアミノ酸を同定し得る。好ましいスキャニングアミノ酸のなかには比較的小さな

中性アミノ酸がある。このようなアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリンおよびシステインが挙げられる。アラニンはβ－炭素を越えた側鎖が無くそして改変体の主鎖コンホメーションを変えることはあまりない［ＣｕｎｎｉｎｇｈａｍおよびＷｅｌｌｓ、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４４：１０８１～１０８５（１９８９）］ので、このグループのなかでアラニンは代表的には好ましいスキャニングアミノ酸である。アラニンはまた、これが最も一般的なアミノ酸であるという理由で、代表的には好ましい。さらに、アラニンは隠れた位置と露出した位置の両方にしばしば見られる［Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ、Ｔｈｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ（W. H. Ｆｒｅｅｍａｎ　＆　Ｃｏ.、NY）；Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｊ. Ｍｏｌ. Ｂｉｏｌ.、１５０：１（１９７６）］。アラニン置換によって適切な量の改変体が得られない場合、アイソテリック（ｉｓｏｔｅｒｉｃ）アミノ酸を使用し得る。

【０１５５】

（C. ＰＲＯ－Ｃ－MG. ２、ＰＲＯ－Ｃ－MG. １２、ＰＲＯ－Ｃ－MG. ４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG. ６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG. ７２の改変）

ＰＲＯ－Ｃ－MG. ２、ＰＲＯ－Ｃ－MG. １２、ＰＲＯ－Ｃ－MG. ４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG. ６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG. ７２の共有結合改変は本発明の範囲内に含まれる。共有結合改変の１つのタイプとしては、ＰＲＯ－Ｃ－MG. ２、ＰＲＯ－Ｃ－MG. １２、ＰＲＯ－Ｃ－MG. ４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG. ６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG. ７２ポリペプチドの標的化されたアミノ酸残基を、ＰＲＯ－Ｃ－MG. ２、ＰＲＯ－Ｃ－MG. １２、ＰＲＯ－Ｃ－MG. ４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG. ６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG. ７２の選択された側鎖またはN末端残基もしくはC末端残基と反応し得る有機誘導体化剤（ｏｒｇａｎｉｃ　ｄｅｒｉｖａｔｉｚｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）と反応させることが挙げられる。二官能性薬剤による誘導体化は、例えば、抗ＰＲＯ－Ｃ－MG. ２、ＰＲＯ－Ｃ－MG. １２、ＰＲＯ－Ｃ－MG. ４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG. ６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG. ７２抗体の精製方法で使用するためにＰＲＯ－Ｃ－MG. ２、ＰＲＯ－Ｃ－MG. １２、ＰＲＯ－Ｃ－MG. ４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG. ６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG. ７２を水不溶性の支持体マトリックスまたは表面と架橋させるために有用であり、そして逆の場合も同じである。通常使用される架橋剤には、例

えば、１，１－ビス（ジアゾアセチル）－２－フェニルエタン、グルタルアルデヒド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（例えば４－アジドサリチル酸とのエステル）、３，３’－ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）のような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－オクタンのような二官能性マレイミド、およびメチル－３－［（ｐ－アジドフェニル）ジチオ］プロピオイミデートのような薬剤が挙げられる。

【０１５６】

他の改変としては、グルタミニルおよびアスパラギニル残基の、それぞれ対応するグルタミルおよびアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖のα－アミノ基のメチル化［Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．、Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、７９～８６頁（１９８３）］、Ｎ末端アミンのアセチル化ならびに任意のＣ末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【０１５７】

本発明の範囲内に含まれるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの別のタイプの共有結合改変としては、ポリペプチドのネイティブなグリコシル化パターンの改変が挙げられる。「ネイティブなグリコシル化パターンの改変」は、本発明の目的では、ネイティブな配列のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２中に見られる１つ以上の炭水化物部分の欠失（元となるグリコシル化部位を取り除くか、あるいは化学的および／または酵素的手段によってグリコシル化を欠失させるかのどちらかによって）および／またはネイティブな配列のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２内には存在していない１つ以上のグリコシル化部位の付加を意味することが意図される

。加えて、上記の句には、ネイティブなタンパク質のグリコシル化における定性的変化が含まれており、そしてこれは存在する種々の炭水化物部分の性質および割合の変化に係わっている。

【０１５８】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドに対するグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を改変することにより達成され得る。この改変は、例えば、ネイティブな配列のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２に（Ｏ結合型グリコシル化部位のための）１個以上のセリンまたはトレオニン残基を付加すること、またはこれら残基により置換することにより行われ得る。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２アミノ酸配列はＤＮＡレベルでの変化によって、特に、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンが産生されるように、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードするＤＮＡを予め選択した塩基で変異させることによって、必要に応じて改変され得る。

【０１５９】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、グリコシドとこのポリペプチドの化学的または酵素的カップリングによるものである。このような方法は当該分野で、例えば、１９８７年9月１１日に公開されたWO　８７／０５３３０ならびにＡｐｌｉｎおよびＷｒｉｓｔｏｎ、ＣＲＣ　Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、２５９～３０６頁（１９８１）中に記載される。

【０１６０】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドに存在する

炭水化物部分の除去は、化学的もしくは酵素的に達成するか、またはグリコシル化用標的として利用される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達成され得る。化学的脱グリコシル化技術は当該分野で公知であり、そして例えば、Ｈａｋｉｍｕｄｄｉｎら、Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．、２５９：５２（１９８７）およびＥｄｇｅら、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１１８：１３１（１９８１）に記載されている。ポリペプチドの炭水化物部分の酵素的切断は、Ｔｈｏｔａｋｕｒａら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．、１３８：３５０（１９８７）によって記載されるように、種々のエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼの使用によって達成され得る。

【０１６１】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の共有結合改変の別の型には、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドを種々の非タンパク質ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレン）のうちの１つと、米国特許第４，６４０，８３５号；同第４，４９６，６８９号；同第４，３０１，１４４号；同第４，６７０，４１７号；同第４，７９１，１９２号または同第４，１７９，３３７号中に記載されている様式で結合させることが含まれる。

【０１６２】

本発明のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２はまた、別の異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列と融合したＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２を含んでいるキメラ分子を形成するような方法で改変され得る。

【０１６３】

１つの実施形態では、このようなキメラ分子はＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰ

ＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２と、抗タグ抗体が選択的に結合し得るエピトープを提供するタグポリペプチドとの融合体を含んでいる。このエピトープタグは、一般的にＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のアミノ末端またはカルボキシル末端に配置される。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のこのようなエピトープタグ化形態の存在は、このタグポリペプチドに対する抗体を使用して検出され得る。また、エピトープタグを備えることによって、このエピトープタグと結合する抗タグ抗体または別のタイプの親和性マトリックスを使用するアフィニティー精製でＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２を容易に精製することができる。種々のタグポリペプチドおよびそれらのそれぞれの抗体は当該分野で周知である。これらの例にはポリ－ヒスチジン（ｐｏｌｙ－ｈｉｓ）またはポリ－ヒスチジン－グリシン（ｐｏｌｙ－ｈｉｓ－ｇｌｙ）タグ；ｆｌｕ　ＨＡタグポリペプチドおよびその抗体１２ＣＡ５［Ｆｉｅｌｄら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．、８：２１５９～２１６５（１９８８）］；ｃ－ｍｙｃタグおよびこれに対する８Ｆ９、３Ｃ７、６Ｅ１０、Ｇ４、Ｂ７および９Ｅ１０抗体［Ｅｖａｎら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、５：３６１０～３６１６（１９８５）］；ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグおよびその抗体［Ｐａｂｏｒｓｋｙら、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、３（６）：５４７～５５３（１９９０）］が挙げられる。他のタグポリペプチドとしては、Ｆｌａｇ－ペプチド［Ｈｏｐｐら、Ｂｉｏ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、６：１２０４～１２１０（１９８８）］；ＫＴ３エピトープペプチド［Ｍａｒｔｉｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５５：１９２～１９４（１９９２）］；α－チューブリンエピトープペプチド［Ｓｋｉｎｎｅｒら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６６：１５１６３～１５１６６（１９９１）］；およびＴ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ［Ｌｕｔｚ－Ｆｒｅｙｅｒｍｕｔｈら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８７：６３９３～６３９７（１９９０）］が挙げられる。

【０１６４】

代替的な実施形態では、このキメラ分子は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２と免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定領域との融合体を含み得る。このキメラ分子の二価形態（「免疫アドヘシン」ともまた称される）では、このような融合体は、ＩｇＧ分子のＦｃ領域に対するものであり得る。このＩｇ融合体は好ましくは、Ｉｇ分子内の少なくとも１つの可変領域の代わりにＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの可溶性（膜貫通ドメイン欠失または不活化）形態による置換を含んでいる。特に好ましい実施形態では、免疫グロブリン融合体は、ＩｇＧ１分子のヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３またはヒンジ、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３領域を含んでいる。免疫グロブリン融合体の調製に関しては、１９９５年６月２７日に発行された米国特許第５，４２８，１３０号もまた参照のこと。

【０１６５】

別の実施形態において、このキメラ分子は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２とシグナルポリペプチドとの融合体を含み、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの分泌を可能にするかまたは増大し、またはさらに宿主細胞内のその位置を変更する。このシグナル配列は、一般に、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のアミノ末端またはカルボキシ末端に位置し、より一般的には、分泌または膜の局在化が所望される場合はN末端に位置する。このような融合体は、代表的には、中間産物である。なぜなら、このシグナルペプチドは、通常、宿主細胞の酵素によって特異的に切断されるためである。シグナルペプチドの提供は、培養培地への分泌の後のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の容易な精製を可能にする。

種々のシグナルポリペプチド（これは、分泌または細胞内の成分のの標的化を可能にする）は、当該分野で周知であり、そして多くの宿主細胞（酵母および哺乳動物細胞を含む）を用いる使用に利用可能である。

【０１６６】

（Ｄ．ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の調製）

以下の説明は主として、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２核酸を含むベクターで形質転換されるかまたはトランスフェクションされた細胞の培養によるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の生成に関する。当然のことながら、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２を調製するために当該分野で周知である代替的な方法を使用し得ることが意図されている。例えば、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の配列あるいはその部分は、固相技術を使用して直接的なペプチド合成で生成され得る［例えば、Ｓｔｅｗａｒｔら、Ｓｏｌｉｄ－Ｐｈａｓｅ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　Ｃｏ．、Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ（１９６９）；Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、８５：２１４９～２１５４（１９６３）を参照のこと］。インビトロタンパク質合成は、手動技術を使用するかまたは自動により実施され得る。自動化合成は、例えば、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ（Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ）を使用し、製造者の説明書を用いて達成され得る。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の種々の部分を化学的に別々に合成し得、そして化学的または酵素的方法を使用して組み合わせて、全長ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２を生成し

得る。

【０１６７】

（１．ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするＤＮＡの単離）

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするＤＮＡは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２　ｍＲＮＡを有し、かつ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したｃＤＮＡライブラリーから得られ得る。従って、ヒトＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２　ＤＮＡは好都合なことに、実施例に記載されるように、ヒト組織から調製したｃＤＮＡライブラリーから得られ得る。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする遺伝子はまた、ゲノムライブラリーから得られ得るか、または公知の合成方法（例えば、自動化核酸合成）によって得られ得る。

【０１６８】

ライブラリーは、目的の遺伝子またはこの遺伝子によってコードされているタンパク質を同定するように設計されたプローブ（例えば、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２に対する抗体あるいは少なくとも約２０～８０塩基のオリゴヌクレオチド）を用いてスクリーニングされ得る。選択したプローブを用いるｃＤＮＡまたはゲノムライブラリーのスクリーニングは、標準的な手順、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、１９８９）中に記載されている手順を使用して実施され得る。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－Ｍ

Ｇ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする遺伝子を単離する代替的な手段は、ＰＣＲ法［Ｓａｍｂｒｏｏｋら（上述）；Ｄｉｅｆｆｅｎｂａｃｈら、ＰＣＲ　Ｐｒｉｍｅｒ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、１９９５）］を使用することである。

【０１６９】

以下の実施例は、ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングする技術を記載している。プローブとして選択されるオリゴヌクレオチド配列は、擬似陽性を最小限にするに十分な長さで且つ十分に明白であるべきである。オリゴヌクレオチドは、好ましくは、このオリゴヌクレオチドがスクリーニングされているライブラリー中のＤＮＡに対するハイブリダイゼーションによって検出され得るように標識される。標識化方法は当該分野で周知であり、そして^{32}Ｐ－標識ＡＴＰのような放射性標識の使用、ビオチン化または酵素標識化が挙げられる。中程度のストリンジェンシーおよび高いストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（前出）中に提供されている。

【０１７０】

このようなライブラリースクリーニング方法で同定された配列は、ＧｅｎＢａｎｋのような公的なデータベースまたは他の私的な配列データベースに寄託されそしてそこで利用可能な他の公知の配列と比較され、そして整列され得る。この分子の規定の領域内または全長配列にわたる配列同一性（アミノ酸またはヌクレオチドレベルのどちらか）は当該分野で公知であり、かつ本明細書に記載の方法を使用して決定され得る。

【０１７１】

タンパク質コード配列を有する核酸は、本明細書で初めて開示された推定アミノ酸配列を使用し、そして必要な場合、前駆体を検出するために、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（前出）中に記載される従来のプライマー伸長手順を使用して、選択したｃＤＮＡまたはゲノムライブラリーをスクリーニングし、そしてｃＤＮＡに逆転写されていないｍＲＮＡの中間体をプロセシングすることによって得られ得る。

【０１７２】

（２．宿主細胞の選択および形質転換）

宿主細胞は、ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２製造のために本明細書で記載した発現ベクターまたはクローニングベクターでトランスフェクションするかまたは形質転換され、そしてプロモーターを誘発するか、形質転換体を選択するか、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適するように修飾した従来の栄養培地中で培養する。培地、温度、ｐH等のような培養条件は、過度の実験を行うことなく当業者により選択され得る。一般的に、細胞培養物の生産性を最大化するための原則、プロトコルおよび実践技術は、Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ、M. Ｂｕｔｌｅｒ編（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ、１９９１）およびＳａｍｂｒｏｏｋら（前出）中に見出され得る。

【０１７３】

真核生物細胞のトランスフェクション方法および原核生物細胞の形質転換方法は当業者に公知である（例えば、$CaCl_2$、$CaPO_4$、リポソーム媒介性およびエレクトロポレーション）。使用する宿主細胞に依存して、形質転換はこのような細胞に適する標準的な技術を使用して行われる。Ｓａｍｂｒｏｏｋら（前出）中に記載されているような塩化カルシウムを使用するカルシウム処理、またはエレクトロポレーションは、一般的に原核生物に対して使用される。Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓによる感染は、Ｓｈａｗら、Ｇｅｎｅ、２３：３１５（１９８３）および１９８９年6月２９日に公開されたWO８９／０５８５９によって記載されているように、特定の植物細胞を形質転換するために使用される。このような細胞壁がない哺乳動物細胞では、Ｇｒａｈａｍおよびｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、５２：４５６～４５７（１９７８）のリン酸カルシウム沈降法を使用し得る。哺乳動物細胞宿主系トランスフェクションの一般的な局面は、米国特許第４，３９９，２１６号中に記載されている。酵母内への形質転換は、代表的にはＶａｎ Ｓｏｌｉｎｇｅｎら、Ｊ．Ｂａｃｔ．、１３０：９４６（１９７７）およびＨｓｉａｏら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）、７６：３８２９（１９７９）の方法に従って

実施される。しかし、ＤＮＡを細胞内に導入する他の方法（例えば核微量注入、エレクトロポレーション、インタクトな細胞との細菌プロトプラスト融合またはポリカチオン、例えば、ポリブレン、ポリオルニチンによる方法）もまた、使用され得る。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ら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、１８５：５２７～５３７（１９９０）およびMansourら、Ｎａｔｕｒｅ、３３６：３４８～３５２（１９８８）を参照のこと。

【０１７４】

本明細書中に記載のベクター内のＤＮＡをクローニングするかまたは発現させるための適切な宿主細胞としては、原核生物、酵母または高等真核生物細胞が挙げられる。適切な原核生物としては、真正細菌（ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、例えばグラム陰性またはグラム陽性生物、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉのようなＥｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅが挙げられるが、これらに限定されない。種々のＥ．ｃｏｌｉ株、例えばＥ．ｃｏｌｉ　Ｋ１２株MM２９４（ＡＴＣＣ　３１，４４６）；Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ　３１，５３７）；Ｅ．ｃｏｌｉ株Ｗ３１１０（ＡＴＣＣ　２７，３２５）およびＫ５　７７２（ＡＴＣＣ　５３，６３５）が公的に入手可能である。他の適切な原核宿主細胞としては、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ（例えば、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（例えばＥ．ｃｏｌｉ）、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ、Ｅｒｗｉｎｉａ、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ、Ｐｒｏｔｅｕｓ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ（例えば、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）、Ｓｅｒｒａｔｉａ（例えば、Ｓｅｒｒａｔｉａ　ｍａｅｃｅｓｃａｎｓ）およびＳｈｉｇｅｌｌａ）、ならびにＢａｃｉｌｌｉ（例えば、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓおよびＢ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ（例えば、１９８９年4月１２日に公開されたＤＤ　２６６，７１０に開示されているＢ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ　４１Ｐ））、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ（例えば、Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）およびＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓが挙げられる。これらの例は限定ではなく、例示である。株Ｗ３１１０は組換えＤＮＡ産物発酵用の通常の宿主株であるので、これは１つの特に好ましい宿主または親宿主である。好ましくは、この宿主細胞は最小限量のタンパク質分解酵素しか分泌しな

い。例えば、株Ｗ３１１０は、この宿主に内在性のタンパク質をコードする遺伝子に遺伝子変異を生じさせるように改変され得、このような宿主の例としては、完全な遺伝子型ｔｏｎＡを有しているＥ．ｃｏｌｉ Ｗ３１１０株１Ａ２；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ ｐｔｒ３を有しているＥ．ｃｏｌｉ Ｗ３１１０株９Ｅ４；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ ｐｔｒ３ ｐｈｏＡ Ｅ１５（ａｒｇＦ－ｌａｃ）１６９ ｄｅｇＰ ｏｍｐＴ ｋａｎ^{r}を有しているＥ．ｃｏｌｉ Ｗ３１１０株２７Ｃ７（ＡＴＣＣ ５５，２４４）；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ ｐｔｒ３ ｐｈｏＡ Ｅ１５（ａｒｇＦ－ｌａｃ）１６９ ｄｅｇＰ ｏｍｐＴ ｒｂｓ７ ｉｌｖＧ ｋａｎ^{r}を有しているＥ．ｃｏｌｉ Ｗ３１１０株３７Ｄ６；Ｅ．ｃｏｌｉ Ｗ３１１０株４０Ｂ４（これは非カナマイシン耐性ｄｅｇＰ欠失変異を有する株３７Ｄ６である）；および１９９０年８月７日に発行された米国特許第４，９４６，７８３号中に開示されている変異ペリプラズムプロテアーゼ（ｐｅｒｉｐｌａｓｍｉｃ ｐｒｏｔｅａｓｅ）を有しているＥ．ｃｏｌｉ株が挙げられる。あるいは、クローニングのインビトロ方法、例えばＰＣＲまたは他の核酸ポリメラーゼ反応が適している。

【０１７５】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母のような真核微生物はＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするベクター用の適切なクローニングまたは発現用宿主である。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅは、一般的に使用される下等真核宿主微生物である。他のものとしては、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ（ＢｅａｃｈおよびＮｕｒｓｅ、Ｎａｔｕｒｅ、２９０：１４０［１９８１］；１９８５年5月2日に公開されたＥＰ １３９，３８３）；Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ宿主（米国特許第４，９４３，５２９号；Ｆｌｅｅｒら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、９：９６８～９７５（１９９１））、例えば、Ｋ．ｌａｃｔｉｓ（ＭＷ９８－８Ｃ、ＣＢＳ６８３、ＣＢＳ４５７４；Ｌｏｕｖｅｎｃｏｕｒｔら、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．、１５４（２）７３７－７４２［１９８３］）、Ｋ．ｆｒａｇｉｌｉｓ（ＡＴＣＣ １２，４２４）、Ｋ．ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ（ＡＴＣＣ １６，０４５

）、K. wickeramii（ATCC 24, 178）、K. waltii（ATCC 56, 500）、K. drosophilarum（ATCC 36, 906；Van den Bergら、Bio／Technology、8：135（1990））、K. thermotoleransおよびK. marxianus；yarrowia（EP 402, 226）；Pichia pastoris（EP 183, 070；Sreekrishnaら、J. Basic Microbiol.、28：265～278［1988］）；Candida；Trichoderma reesia（EP 244, 234）；Neurospora crassa（Caseら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、76：5259～5263［1979］）；Schwanniomyces、例えば、Schwanniomyces occidentalis（1990年10月31日に公開されたEP 394, 538）；ならびに糸状菌、例えば、Neurospora、Penicillium、Tolypocladium（1991年1月10日に公開されたWO 91／00357）、およびAspergillus宿主、例えばA. nidulans（Ballanceら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、112：284～289［1983］；Tilburnら、Gene、26：205～221［1983］；Yeltonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81：1470～1474［1984］）およびA. niger（KellyおよびHynes、EMBO J.、4：475～479［1985］）が挙げられる。メチロトローフ酵母（methylotropic yeast）は本発明に適しており、そしてこれらとしては、Hansenula、Candida、Kloeckera、Pichia、Saccharomyces、TorulopsisおよびRhodotorulaからなる属から選択される、メタノールで増殖可能な酵母が挙げられるが、これらに限定されない。このクラスの酵母の例示である特定の種の列挙は、C. Anthony、The Biochemistry of Methylotrophs、269（1982）中に見ることができる。

【0176】

グリコシル化したＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２を発現するための適切な宿主細胞は、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、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　Ｓ2およびＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ　Ｓｆ9のような昆虫細胞ならびに植物細胞が挙げられる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例としては、チャイニーズ・ハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞およびＣＯＳ細胞が挙げられる。さらに特定の例としては、ＳＶ４０で形質転換したサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ－7、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６５１）；ヒト胚性腎臓株（２９３細胞または懸濁培養で増殖させるためにサブクローン化した２９３細胞、Ｇｒａｈａｍら、Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．、３６：５９（１９７７））；チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞／ＤＨＦＲ（ＣＨＯ、ＵｒｌａｕｂおよびＣｈａｓｉｎ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７７：４２１６（１９８０））；マウス・セルトリ細胞（ＴＭ4、Ｍａｔｈｅｒ、Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．、２３：２４３～２５１（１９８０））；ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ７５）；ヒト肝細胞（Ｈｅｐ　Ｇ2、ＨＢ　８０６５）；およびマウス乳癌（ＭＭＴ　０６０５６２、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５１）が挙げられる。適切な宿主細胞の選択は当該分野の技術範囲内であると考えられる。

【０１７７】

（３．複製可能なベクターの選択および使用）

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする核酸（例えば、ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ）は、クローニング（ＤＮＡの増幅）または発現のために複製可能なベクター内に挿入され得る。種々の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、ウイルス粒子またはファージの形態であり得る。適切な核酸配列を種々の手順によりベクターへ挿入し得る。一般的に、ＤＮＡは、当該分野で公知の技術を使用して適切な制限エンドヌクレアーゼ部位内に挿入される。ベクター構成成分としては、一般的に、１つ以上のシグナル配列、複製起点、１つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーターおよび転写終結配列が挙げられるが、これらに限定され

ない。１つ以上のこれら構成成分を含む適切なベクターの構築には、当業者に公知の標準的な連結技術が使用される。

【０１７８】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２は、直接組換え的に産生されるだけでなく、成熟型タンパク質またはポリペプチドのＮ末端の特定の切断部位を有しているシグナル配列または他のポリペプチドであり得る異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても組換え的に産生され得る。一般に、上記シグナル配列はベクターの構成成分であり得るかまたはベクター内に挿入されるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするＤＮＡの一部であり得る。このシグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、ｌｐｐまたは熱安定エンテロトキシン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り得る。酵母から分泌させるためには、上記シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、α因子リーダー（これにはＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓおよびＫｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ　α因子リーダーが挙げられ、後者は米国特許第５，０１０，１８２号中に記載されている）もしくは酸ホスファターゼリーダー、Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓ　グルコアミラーゼリーダー（１９９０年４月４日に公開されたＥＰ　３６２，１７９）または１９９０年１１月１５日に公開されたＷＯ　９０／１３６４６中に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞発現においては、哺乳動物シグナル配列、例えば、同一種または関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列ならびにウイルス分泌リーダーを使用して、タンパク質の分泌を方向付け得る。

【０１７９】

発現ベクターとクローニングベクターは共に、１つ以上の選択された宿主細胞内でそのベクターを複製させ得る核酸配列を含む。このような配列は種々の細菌、酵母およびウイルスについて周知である。プラスミドｐＢＲ３２２由来の複製起点は大部分のグラム陰性菌に適しており、２μプラスミド起点は酵母に適しており、そして種々のウイルス起点（ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウイルス、Ｖ

ＳＶまたは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。

【０１８０】

発現ベクターおよびクローニングベクターは代表的には、選択マーカーとも称される選択遺伝子を含む。代表的な選択遺伝子は、（ａ）抗生物質または他のトキシン、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートまたはテトラサイクリンに対して耐性を付与するタンパク質か、（ｂ）栄養要求性欠乏を補足するタンパク質かまたは（ｃ）複雑な培地から入手できない重要な栄養を供給するタンパク質をコードする（例えばＢａｃｉｌｌｕｓのＤ－アラニンラセマーゼをコードする遺伝子）。

【０１８１】

哺乳動物細胞用の適切な選択マーカーの例は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする核酸を取り込む能力のある細胞の同定を可能にする選択マーカー（例えば、ＤＨＦＲまたはチミジンキナーゼ）である。野生型ＤＨＦＲを使用する場合に適する宿主細胞は、Ｕｒｌａｕｂら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７７：４２１６（１９８０）によって記載されているようにして調製されそして増殖されたＤＨＦＲ活性を欠失しているＣＨＯ細胞株である。酵母で使用される適切な選択遺伝子は酵母プラスミドＹＲｐ７中に存在するｔｒｐ１遺伝子である［Ｓｔｉｎｃｈｃｏｍｂら、Ｎａｔｕｒｅ、２８２：３９（１９７９）；Ｋｉｎｇｓｍａｎら、Ｇｅｎｅ、７：１４１（１９７９）；Ｔｓｃｈｅｍｐｅｒら、Ｇｅｎｅ、１０：１５７（１９８０）］。ｔｒｐ１遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠いている酵母の変異株、例えば、ＡＴＣＣ番号４４０７６またはＰＥＰ４－１［Ｊｏｎｅｓ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ．８５：１２（１９７７）］の選択マーカーを提供する。

【０１８２】

発現ベクターおよびクローニングベクターは通常、ｍＲＮＡ合成を指令するためにＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする核酸配列

と作動可能に連結したプロモーターを含む。種々の潜在的宿主細胞によって認識されるプロモーターは周知である。原核宿主で使用するために適しているプロモーターとしては、β－ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系［Ｃｈａｎｇら、Ｎａｔｕｒｅ、２７５：６１５（１９７８）；Ｇｏｅｄｄｅｌら、Ｎａｔｕｒｅ、２８１：５４４（１９７９）］、アルカリホスファターゼ、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーター系［Ｇｏｅｄｄｅｌ、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ.、８：４０５７（１９８０）；ＥＰ ３６，７７６］ならびにｔａｃプロモーターのようなハイブリッドプロモーター［ｄｅＢｏｅｒら、Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ、８０：２１～２５（１９８３）］が挙げられる。細菌系で使用するためのプロモーターはまた、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ. ２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ. １２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ. ４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ. ６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ. ７２をコードするＤＮＡと作動可能に連結したシャイン・ダルガーノ（Ｓ. Ｄ.）配列を含む。

【０１８３】

酵母宿主で使用される適切なプロモーター配列（ｐｒｏｍｏｔｉｎｇ ｓｅｑｕｅｎｃｅ）の例としては、３－ホスホグリセレートキナーゼ［Ｈｉｔｚｅｍａｎら、Ｊ. Ｂｉｏｌ. Ｃｈｅｍ.、２５５：２０７３（１９８０）］または他の解糖酵素［Ｈｅｓｓら、Ｊ. Ａｄｖ. Ｅｎｚｙｍｅ Ｒｅｇ.、７：１４９（１９６８）；Ｈｏｌｌａｎｄ、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、１７：４９００（１９７８）］、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース－６－リン酸イソメラーゼ、３－ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼおよびグルコキナーゼのプロモーターが挙げられる。

【０１８４】

増殖条件によって転写が制御されるというさらなる利点を有する誘導性プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ２、イソチトクロームＣ、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関係のある分解酵素、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ならびにマルトース

およびガラクトース利用にを担う酵素のプロモーター領域である。酵母発現で使用される適切なベクターおよびプロモーターはＥＰ　７３，６５７中でさらに記載されている。

【０１８５】

哺乳動物宿主細胞内におけるベクターからＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の転写は、例えば、ウイルスのゲノムから得られるプロモーター、例えばポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス（１９８９年7月5日に公開されたＵＫ　２，２１１，５０４）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス２）、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルスおよびシミアン・ウイルス４０（ＳＶ４０）から得られるプロモーター、異種哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターから得られるプロモーター、ならびに熱ショックプロモーターから得られるプロモーターによって制御されるが、但し、このようなプロモーターは宿主細胞株と適合性である。

【０１８６】

高等真核生物によるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするＤＮＡの転写は、ベクター内にエンハンサー配列を挿入することによって増大され得る。エンハンサーは、プロモーターに作用してその転写を増大させる、通常、約１０から３００ｂｐまでのＤＮＡのシス作用性エレメントである。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在公知である（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α－フェトプロテインおよびインスリン）。しかし、代表的には、真核生物細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用する。これらの例としては、複製起点の後側（ｂｐ　１００～２７０）のＳＶ４０エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後側のポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。上記エンハンサーはベクター内のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコ

ードする配列の５’または３’位にスプライシングされ得るが、好ましくは上記プロモーターの５’位に位置させる。

【０１８７】

真核宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒトまたは他の多細胞生物由来の有核細胞）内で使用される発現ベクターはまた、転写終結およびｍＲＮＡ安定化に必要な配列を含む。このような配列は通常、真核生物またはウイルスのＤＮＡまたはｃＤＮＡの５’非翻訳領域から、そしてときには３’非翻訳領域から得られる。これらの領域は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするｍＲＮＡの非翻訳部分にポリアデニル化フラグメントとして転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

【０１８８】

組換え脊椎動物細胞培養におけるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の合成に適合させることに適しているさらに他の方法、ベクターおよび宿主細胞はＧｅｔｈｉｎｇら、Ｎａｔｕｒｅ、２９３：６２０～６２５（１９８１）；Ｍａｎｔｅｉら、Ｎａｔｕｒｅ、２８１：４０～４６（１９７９）；ＥＰ　１１７，０６０；およびＥＰ　１１７，０５８中に記載されている。

【０１８９】

（４．遺伝子増幅／発現の検出）

遺伝子増幅および／または発現は、本明細書で提供した配列に基づいて、適切な標識プローブを使用して、試料中で直接、例えば従来のサザンブロット法、ｍＲＮＡの転写を定量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）またはインサイチュハイブリダイゼーションで測定され得る。あるいは、ＤＮＡ二重鎖、ＲＮＡ二重鎖およびＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド二重鎖またはＤＮＡ－タンパク質二重鎖を含む特定の二重鎖を認識し得る抗体を使用し得る。これらの抗体は順次標識し得、そしてアッセイを実施し得、そのアッセイにおいて、二重鎖が表面に結合され、その結果、表面に二重鎖が

形成されると、この二重鎖に結合した抗体の存在を検出し得る。

【０１９０】

あるいは、遺伝子発現を免疫学的方法、例えば、細胞または組織切片の免疫組織化学的染色および細胞培養物または体液のアッセイによって測定して、遺伝子産物の発現を直接定量し得る。免疫組織化学的染色および／またはサンプル液体のアッセイに有用な抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかであり得、そして任意の哺乳動物において調製され得る。好都合には、これら抗体はネイティブな配列のＰＲＯ－Ｃ－MG．２ポリペプチド、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２ポリペプチド、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５ポリペプチド、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４ポリペプチドまたはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチドに対してか、または本明細書中で提供されるＤＮＡ配列に基づく合成ペプチドに対してか、またはＰＲＯ－Ｃ－MG．２　ＤＮＡ、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２　ＤＮＡ、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５　ＤＮＡ、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４　ＤＮＡまたはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２　ＤＮＡと融合しそして特定の抗体エピトープをコードする外来配列に対して調製され得る。

【０１９１】

（５．ポリペプチドの精製）

ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２の形態物は、培養培地または宿主細胞溶解物から回収され得る。膜と結合している場合、これは適切な境界活性剤溶液（例えば、Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００）を使用するかまたは酵素的切断によって膜から遊離され得る。ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２の発現に使用された細胞は、種々の物理的または化学的手段、例えば凍結－融解反復、超音波処理、機械的破壊または細胞溶解剤によって破壊され得る。

【０１９２】

組換え細胞タンパク質またはポリペプチドからＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２を精製することは望ましくあり得る。以下の手順は適切な

精製手順の例である：イオン交換カラムでの分画；エタノール沈澱；逆相ＨＰＬＣ；シリカまたはＤＥＡＥのような陽イオン交換樹脂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降；例えば、セファデックスＧ－７５を用いるゲルろ過；ＩｇＧのような夾雑物を除去するプロテインＡセファロースカラム；およびＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のエピトープ－タグ化形態と結合する金属キレート化カラム。種々のタンパク質精製方法が使用され得、そしてこのような方法は当該分野で公知であり、そして例えば、Ｄｅｕｔｓｃｈｅｒ、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、１８２（１９９０）；Ｓｃｏｐｅｓ、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８２）中に記載される。選択される精製工程は、例えば、使用される製造方法および生成される特定のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の性質に依存する。

【０１９３】

（Ｅ．ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の使用）

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするヌクレオチド配列（またはそれらの相補鎖）は、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用を含む分子生物学分野、染色体および遺伝子マッピングならびにアンチセンスＲＮＡ、ＤＮＡおよびＰＮＡ（ペプチド核酸）の産生における種々の適用を有する。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２核酸、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２核酸、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５核酸、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４核酸またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２核酸はまた、本明細書中で記載した組換え技術によるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２ポリペプチド、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２ポリペプチド、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５ポリペプチド、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４ポリペプチドまたはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの調製に有用である。全長のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２ポリペプチド、Ｐ

ＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２ポリペプチド、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５ポリペプチド、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４ポリペプチドまたはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはフラグメントをコードする配列は、例えば、ハイブリダイゼーションプローブとして、あるいはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２ポリペプチド、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２ポリペプチド、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５ポリペプチド、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４ポリペプチドもしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたは抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体もしくは抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体への結合部位を含むポリペプチドを必要に応じてコードし得るそのフラグメントをコードするための用途を見出す。

【０１９４】

全長のネイティブな配列のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２遺伝子、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２遺伝子、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５遺伝子、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４遺伝子またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２遺伝子（それぞれ配列番号１または配列番号３）またはその部分は、全長のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２　ｃＤＮＡ、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２　ｃＤＮＡ、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５　ｃＤＮＡ、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４　ｃＤＮＡまたはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２　ｃＤＮＡを単離するかあるいはそれぞれ配列番号１または配列番号３に開示されているＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の配列と所望の配列同一性を有するさらに他のｃＤＮＡ（例えば、天然に存在するＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の改変体または他の種から得られるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするもの）を単離するために、ｃＤＮＡライブラリーのハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。上記ハイブリダイゼーションプローブは、それぞれ配列番号１または配列番号３のヌクレオチド配列の少なくとも部分的に新規な領域から（ここで、その領域は、過度の実験を行うことなく決定され得る）か、またはネイティブな配列のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ

－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のプロモーター、エンハンサーエレメントおよびイントロンを含むゲノム配列から誘導され得る。

【０１９５】

そのような核酸フラグメントは、通常長さが少なくとも約２０ヌクレオチド、好ましくは長さが少なくとも約３０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約４０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約５０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約６０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約７０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約８０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約９０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約１００ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約１１０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約１２０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約１３０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約１４０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約１５０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約１６０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約１７０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約１８０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約１９０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約２００ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約２５０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約３００ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約３５０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約４００ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約４５０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約５００ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約６００ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約７００ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約８００ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも約９００ヌクレオチド、そしてより好ましくは長さが少なくとも約１０００ヌクレオチドである。ここで、この文脈中で用語「約」は、言及されたヌクレオチド配列の長さプラスまたはマイナスその言及された長さの１０％を意味する。好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列フラグメントは、それぞれ配列番号１または配列番号３に示したヌク

レオチド配列の任意のコード領域から得られる。１つの実施形態において、フラグメントサイズ範囲は、２０～５０ヌクレオチドであり、これは、プローブまたはアンチセンスの用途のために特に有用である。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の新規フラグメントは、多くの任意の周知の配列整列プログラムを用いて、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、他の公知のヌクレオチド配列とを整列させ、そしてどのＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列フラグメントが新規か決定することによって、慣用的な方法で決定し得ることが記載される。そのようなＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は全て本明細書中で企図され、そして過度の実験なしに決定し得る。これらのヌクレオチド分子フラグメントによってコードされるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドフラグメント、好ましくは抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．抗体２、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．抗体１２、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．抗体４５、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体への結合部位を含むＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドフラグメントも企図される。

【０１９６】

一例として、スクリーニング方法は、公知のＤＮＡ配列を使用して約４０塩基の選択されたプローブを合成してＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２遺伝子のコード領域を単離する工程を包含する。ハイブリダイゼーションプローブは、^{32}Ｐもしくは^{36}Ｓのような放射性ヌクレオチドまたは酵素標識、例

えばアビジン／ビオチンカップリング系を介してプローブとカップリングしているアルカリホスファターゼを含む種々の標識により標識され得る。本発明のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２遺伝子の配列と相補的な配列を有している標識プローブを使用してヒトｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡまたはｍＲＮＡのライブラリーをスクリーニングして、上記プローブがこのようなライブラリーのうちのどのメンバーとハイブリダイズするのかを決定し得る。ハイブリダイゼーション技術は以下の実施例でさらに詳細に記載される。

【０１９７】

本出願で開示されているＥＳＴ配列はいずれも、本明細書で開示した方法を使用して、プローブとして同様に使用され得る。

【０１９８】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２核酸の他の有用なフラグメントとしては、標的ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２　ｍＲＮＡ（センス）あるいはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ＤＮＡ（アンチセンス）配列と結合し得る一本鎖核酸配列（ＲＮＡかまたはＤＮＡのどちらか）を含んでいる抗遺伝子（アンチセンスまたはセンス）オリゴヌクレオチドが挙げられる。抗遺伝子化合物は、上記および以下により詳細に議論されるように、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２遺伝子の配列のフラグメントを含む。このフラグメントは、５’または３’非コード領域のいずれかを含み得る。

【０１９９】

密接に関連したＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２コード配列を同定するための配列プールを作製するために、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲ

Ｏ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２オリゴヌクレオチドおよびプローブを、ＰＣＲ技術において使用し得る。

【０２００】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするヌクレオチド配列を使用して、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする遺伝子をマッピングするためおよび遺伝子疾患を有する個体の遺伝子分析のためにハイブリダイゼーションプローブを構築し得る。本明細書中で提供されるヌクレオチド配列は、公知の技術（例えば、インサイチュハイブリダイゼーション、公知の染色体マーカーに対する連鎖分析およびライブラリーとのハイブリダイゼーションスクリーニング）を使用して染色体および染色体の特定の領域にマッピングされ得る。

【０２０１】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のコード配列が、別のタンパク質に結合するタンパク質をコードする場合、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２は、結合相互作用に関与する他のタンパク質または分子を同定するためのアッセイにおいて使用され得る。このような方法によって、結合相互作用のインヒビターが同定され得る。このような結合相互作用に関与するタンパク質はまた、結合相互作用のペプチドまたは低分子インヒビターまたはアゴニストをスクリーニングするために使用され得る。また、レセプターＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２は、関連するリガンド（ｃｏｒｒｅｌａｔｉｖｅ　ｌｉｇａｎｄ）を単離するために使用され得る。スクリーニングアッセイは、ネイティブなＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２

あるいはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のレセプターの生物学的活性を模倣するリード化合物を見出すために設計され得る。このようなスクリーニングアッセイは、化学的なライブラリーの高スループットスクリーニングに敏感に反応するアッセイを含み、これは、それらを低分子薬物候補を同定するために特に適切にする。意図される低分子としては、合成の有機化合物、または無機化合物が挙げられる。アッセイは、タンパク質－タンパク質結合アッセイ、生化学的なスクリーニングアッセイ、イムノアッセイ、および細胞に基づくアッセイを含む種々の形式で行われ得、これらは当該分野で十分に特徴付けられている。このような高スループットアッセイおよび超高スループットアッセイはまた、アンチセンス分子を試験するために使用され得る。このようなアッセイの１つとしては、レポーター分子（例えば、β－ラクターゼ）の使用を含み、ここで、β－ラクターゼ発現カセットは、目的の生物学的反応の調節（例えば、チューブ形成）がβ－ラクターゼ活性の調節として反映される（好ましくは、蛍光による測定による）様式で、試験細胞ゲノム中に組み込まれ得る（例えば、ＷＯ９８／１３３５３およびＷＯ９８／５２０４７を参照のこと）。

【０２０２】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２またはその改変された形態をコードする核酸もまた、トランスジェニック動物または「ノックアウト」動物のいずれかを作製するために使用され得、次いでこれらは、治療的に有用な試薬の開発およびスクリーニングにおいて有用である。トランスジェニック動物（例えば、マウスまたはラット）は、トランスジーンを含む細胞を有する動物である。このトランスジーンは、胎児期に（例えば、胚段階で）動物または動物の先祖に導入された。トランスジーンは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノム中に組み込まれるＤＮＡである。１つの実施形態においては、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするｃＤＮＡが、確立された技術に従ってＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－Ｍ

Ｇ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするゲノムＤＮＡをクローン化するために使用され得、そしてゲノム配列が、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするＤＮＡを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用され得る。トランスジェニック動物（特に、マウスまたはラットのような動物）を作製するための方法は、当該分野で従来技術となっており、そして例えば、米国特許第４，７３６，８６６号および同第４，８７０，００９号に記載されている。代表的には、特定の細胞は、組織特異的エンハンサートを伴うＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２トランスジーンの取りこみのために標的化される。胚段階で動物の生殖系に導入されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするトランスジーンのコピーを含むトランスジェニック動物が、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするＤＮＡの増大された発現の影響を試験するために使用され得る。このような動物は、例えば、その過剰な発現に関連する病理学的状態からの防御を付与すると考えられる試薬についてのテスター動物として使用され得る。本発明のこの局面に従うと、動物が試薬で処置され、そしてトランスジーンを保有していない未処置の動物と比較した病理学的状態の減少した指標は、病理学的状態についての可能性のある治療介入を示す。

【０２０３】

あるいは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の非ヒトホモログが、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２「ノックアウト」動物を構築するために使用され得る。この動物は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４または

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする内因性の遺伝子と、動物の胚性幹細胞中に導入されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする改変されたゲノムＤＮＡとの間での相同組換えの結果として、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする遺伝子を欠損しているか、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする遺伝子が改変されている。例えば、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするｃＤＮＡは、確立された技術に従って、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするゲノムＤＮＡをクローン化するために使用され得る。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするゲノムＤＮＡの部分が欠失され得るか、またはそれが、組込みをモニターするために使用され得る選択可能なマーカーをコードする遺伝子のような別の遺伝子で置きかえられ得る。代表的には、数キロベースの改変されていない隣接しているＤＮＡ（５’および３’末端の両方）が、ベクター中に含まれる（例えば、相同組換えベクターの記載については、ＴｈｏｍａｓおよびＣａｐｅｃｃｈｉ，Ｃｅｌｌ，５１：５０３（１９８７）を参照のこと）。ベクターが、胚性幹細胞株中に導入され（例えば、エレクトロポレーションによって）、そして導入されたＤＮＡが内因性のＤＮＡと相同組換えされた細胞が、選択される（例えば、Ｌｉら、Ｃｅｌｌ，６９：９１５（１９９２）を参照のこと）。選択された細胞は、次いで、凝集キメラを形成するように動物（例えば、マウスまたはラット）の胎盤胞に注入される（例えば、Ｂｒａｄｌｅｙ、Ｔｅｒａｔｏｃａｒｃｉｎｏｍａｓ ａｎｄ Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｅ．Ｊ．Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ編（ＩＲＬ，Ｏｘｆｏｒｄ、１９８７）、１１３－１５２頁を参照のこと）。キメラの胚は、次いで、適切な偽

妊娠させた雌性の里親動物に移植され、そして胚は、「ノックアウト」動物を作製する期間を過ごす。相同組換えされたＤＮＡをそれらの生殖細胞中に保有している子孫は、標準的な技術によって同定され得、そしてその動物の全ての細胞が相同組換えされたＤＮＡを含む動物を交配するために使用され得る。ノックアウト動物は、例えば、特定の病理学的状態に対して防御するそれらの能力について、およびＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの非存在に起因する病理学的状態のそれらの発症について特徴付けられ得る。

【０２０４】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする核酸はまた、遺伝子治療において使用され得る。遺伝子治療適用においては、遺伝子は、治療的に有効な遺伝子産物のインビボでの合成を達成するために、例えば、欠損遺伝子の置換のために、細胞中に導入される。あるいは、標的遺伝子のアンチセンス形態のインビボ合成は、不必要な標的遺伝子発現を減少し得る（例えば、腫瘍、ウイルス感染、または遺伝子過剰発現に関与する状態の場合において）。「遺伝子治療」は、従来の遺伝子治療（ここでは、永続的な効果が急性の処置（例えば、単一処置）によって達成される）および遺伝子治療剤の投与（これは、治療的に有効なＤＮＡまたはｍＲＮＡの１回または反復投与を含む）の両方を含む。アンチセンスＲＮＡおよびＤＮＡは、インビボで特定の遺伝子の発現をブロックするための治療剤として使用され得る。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドは、それらの低い細胞内濃度が細胞膜によるそれらの制限された取りこみによって生じるにもかかわらず、インヒビターとして作用し得る細胞中に輸送され得ることがすでに示されている（Ｚａｍｅｃｎｉｋら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８３，４１４３－４１４６（１９８６））。オリゴヌクレオチドは、例えば、それらの負に荷電したホスホジエステル基を荷電していない基（例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ））で置換することによって、それらの取りこみを増強するように改変され得る。

【０２０５】

生存可能な細胞中に核酸（抗遺伝子オリゴヌクレオチドを含む）を導入するために利用可能な種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が、意図される宿主の細胞のインビトロでまたはインビボで培養された細胞中に移入されるかどうかに依存して、変化する。インビトロでの哺乳動物細胞への核酸の移入に適切な技術としては、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、ＤＥＡＥ－デキストラン、リン酸カルシウム沈殿方法などの使用が挙げられる。１つの実施形態において、インビボ遺伝子移入技術としては、ウイルス（代表的には、レトロウイルス（例えば、アデノウイルス、レンチウイルス、Ｉ型単純ヘルペスウイルス、またはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ））ベクターでのトランスフェクション、ウイルスコートタンパク質－リポソーム媒介性トランスフェクション（Ｄｚａｕら、Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１１，２０５－２１０（１９９３））および脂質ベースの系（例えば、DOTMA、DOPE、およびDC－Ｃｈｏｌ；例えば、Ｔｏｎｋｉｎｓｏｎら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ　１４（１）：５４－６５（１９９６））が挙げられる。WO９９／２２７７２は、抗遺伝子オリゴヌクレオチドを用いる使用のための特に有用なリポソームを開示する。レトロウイルスベクターのようなウイルスベクターは、少なくとも１つの転写プロモーター／エンハンサーまたは座位規定エレメント、または交代性スプライシング、核酸ＲＮＡ輸出、もしくはメッセンジャーの転写後の修飾などの他の方法によって遺伝子発現を制御する他のエレメントを含む。さらに、レトロウイルスベクターのようなウイルスベクターは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする遺伝子の存在下で転写される場合、そこに作動可能に連結され、そして、翻訳開始配列として作用する核酸分子を含む。このようなベクター構築物はまた、パッケージングシグナル、長い末端反復（ＬＴＲ）またはその一部、および使用されるウイルスに適切な＋鎖および－鎖プライマー結合部位（これらが、ウイルスベクター中にすでに存在しない場合）を含む。さらに、このようなベクターは、代表的に、それが配置される宿主細胞からＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６

４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの分泌のためのシグナル配列を含む。好ましくは、この目的のためのシグナル配列は、哺乳動物シグナル配列である。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドがＣ末端または内部転移ペプチドを含む場合、異種分泌シグナルペプチド活性との干渉を避けるための変異によって、それを欠失またはそれを不活化することが好ましい。必要に応じて、ベクター構築物はまた、ポリアデニル化を指向するシグナル、ならびに、１つ以上の制限部位および翻訳終止配列を含み得る。一例として、このようなベクターは、代表的に、５’ＬＴＲ、ｔＲＮＡ結合部位、パッケージングシグナル、第２鎖ＤＮＡ合成の起点、および３’ＬＴＲまたはその一部を含む。非ウイルス（例えば、陽イオン性脂質、ポリリシン、およびデンドリマー（ｄｅｎｄｒｉｍｅｒ））である他のベクターは使用され得る。

【０２０６】

いくつかの状況においては、核酸の供給源に標的細胞を標的化する薬剤（例えば、細胞表面の膜タンパク質または標的細胞に対して特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンドなど）を提供することが所望される。リポソームが使用される場合は、エンドサイトーシスに関連する細胞表面の膜タンパク質に結合するタンパク質が、例えば、特定の細胞型について向性である、キャプシドタンパク質またはそのフラグメント、循環している際にインターナライズを受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的化しそして細胞内半減期を増大するタンパク質中の取りこみを標的化および／または促進するために、使用され得る。レセプターによって媒介されるエンドサイトーシスの技術は、例えば、Ｗｕら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２，４４２９－４４３２（１９８７）；およびＷａｇｎｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７，３４１０－３４１４（１９９０）によって記載されている。遺伝子作製および遺伝子治療プロトコールの概要については、Ａｎｄｅｒｓｏｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ２５６、８０８－８１３（１９９２）を参照のこと。

【０２０７】

（染色体マーカー）本発明の配列はまた、染色体同定について有用である。こ

の配列は、個々のヒト染色体上の特定の位置を特異的に標的化し、そして特定の位置とハイブリダイズし得る。さらに、染色体上の特定の部位を同定するための現在の必要性が存在する。染色体位置のマーキングに現在利用可能な実際の配列データ（反復多型）に基づいた染色体マーキング試薬はほとんどない。本発明に従う、ＤＮＡの染色体へのマッピングは、疾患に関連した遺伝子を有するこれらの配列と相関する重要な第１の工程である。

【０２０８】

簡潔には、配列は、ｃＤＮＡからＰＣＲプライマー（好ましくは１５～２５ｂｐ）を調製することによって、染色体にマッピングし得る。３’非翻訳領域についてのコンピューター分析を使用して、ゲノムＤＮＡ中に１つ以上のエクソンを含まないプライマーを迅速に選択し、このようにして、増幅プロセスを複雑化する。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのＰＣＲスクリーニングに使用される。プライマーに対応するヒト遺伝子を含むこれらのハイブリッドのみが、増幅フラグメントを生じる。

【０２０９】

体細胞ハイブリッドのＰＣＲマッピングは、特定の染色体に対する特定のＤＮＡを割り当てるための迅速な手順である。同一のオリゴヌクレオチドプライマーと共に本発明を使用して、類似の様式で、特定の染色体由来のフラグメントのパネルまたは大規模なゲノムクローンのプールを用いて、亜局在化（ｓｕｂｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ）が達成され得る。その染色体に対するマッピングに同様に使用され得る他のマッピングストラテジーは、インサイチュハイブリダイゼーション、標識されたフロー種別染色体を用いるプレスクリーニング、および染色体特異的ｃＤＮＡライブラリーを構築するためのハイブリダイゼーションによるプレ選択を含む。

【０２１０】

中期染色体拡散に対するｃＤＮＡクローンのインサイチュハイブリダイゼーションにおける蛍光（ＦＩＳＨ）を使用して、１つの工程における正確な染色体位置を提供し得る。この技術は、５００または６００塩基もの短いｃＤＮＡを用いて行なわれ得る；しかし、２，０００ｂｐより大きいクローンは、単純な検出の

ための十分な単一強度を有する唯一の染色体位置に結合する可能性がより高い。ＦＩＳＨは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする遺伝子が由来するクローンの使用を必要とし、長いほうがより良い。例えば、２，０００ｂｐは良好であり、４，０００ｂｐはよりよく、そして、４，０００を超えることは、合理的な時間の割合で良好な結果を得るのに必要ではない。この技術の総説としては、例えば、Ｖｅｒｍａら、Ｈｕｍａｎ Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ：ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８８）を参照のこと。

【０２１１】

一旦、配列が正確な染色体位置にマッピングされると、染色体上の配列の物理的位置は、遺伝的マップデータに相関し得る。このようなデータは、例えば、Ｖ．ＭｃＫｕｓｉｃｋ，Ｍｅｎｄｅｌｉａｎ Ｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ ｉｎ Ｍａｎ（Ｊｏｈｎｓ Ｈｏｐｋｉｎｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｗｅｌｃｈ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｌｉｂｒａｒｙを通してオンラインで入手可能）において見出される。次いで、同一の染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患との間の関係は、連鎖分析（物理的に隣接した遺伝子の共同遺伝）を介して同定される。

【０２１２】

次に、罹患した個体と罹患していない個体との間のｃＤＮＡまたはゲノム配列における差異を決定することが必要である。変異が罹患した個体のいくつかまたは全てに観察されるが、正常な個体には観察されない場合、この変異は疾患の原因因子であるようである。

【０２１３】

物理的なマッピングおよび遺伝的マッピング技術の現在の解決法を用いて、疾患と関連する染色体領域に正確に位置するｃＤＮＡは、５０～５００の間の可能性のある原因遺伝子の１つであり得る（これは、１メガ塩基マッピング解決法および２０ｋｂについて１つの遺伝子を仮定する）。

【０２１４】

本発明のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドおよび核酸分子は、組織型決定に使用され得、ここで、本発明のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドは、別の組織と比較して、１つの組織において差次的に発現され得る。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２核酸分子は、ＰＣＲ、ノーザン分析、サザン分析およびウエスタン分析のためのプローブを作製するための使用を見出する。

【０２１５】

本明細書中に記載されるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドはまた、タンパク質電気泳動目的のための分子量マーカーとして使用され得る。

【０２１６】

（Ｆ．ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２のアンチ遺伝子化合物）

ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２の核酸は、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２の機能を調節する際の使用のための、アンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドを含み、細胞によって産生されるＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２の量を調節し、そして究極的にはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２が決定的である生物学的プロセスまたは応答を調節する。これは、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－

ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする１以上の核酸と特異的にハイブリダイズするアンチ遺伝子化合物を提供することによって達成され得る。本明細書中で使用される場合、用語「標的核酸」または「ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする核酸」は、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするＤＮＡ（例えば、ゲノムＤＮＡ）、このようなＤＮＡから転写されたＲＮＡ（プレｍＲＮＡ（ｐｒｅ－ｍＲＮＡ）およびｍＲＮＡを含む）ならびにまたこのようなＲＮＡ由来のｃＤＮＡを包含する。その標的核酸を有するオリゴマー化合物の特異的なハイブリダイゼーションは、核酸の通常の機能を妨害する。標的核酸に特異的にハイブリダイズする化合物による標的核酸の機能のこのような調節は、通常、「アンチセンス」技術といわれるが、ここでは、より広く「アンチ遺伝子」技術といい、これは、明確に、センス配列とアンチセンス配列の両方を含み、そして本明細書中で「アンチセンス」と交換可能に使用される。アンチセンス化合物は、ペプチド核酸およびリボザイムを含む。妨害されるべきＤＮＡの機能としては、複製および転写が挙げられる。妨害されるべきＲＮＡの機能としては、例えば、タンパク質翻訳部位へのＲＮＡの転移、ＲＮＡからのタンパク質の翻訳、１以上のｍＲＮＡ種を与えるＲＮＡのスプライシング、およびＲＮＡに関係し得るかまたはＲＮＡによって促進され得る触媒活性のようなあらゆる生命機能が挙げられる。標的核酸の機能によるこのような妨害の全体の効果は、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２の発現の調節である。本発明の文脈において、「変異」は、遺伝子の発現における増大（刺激）または減少（阻害）のいずれかを意味する。本発明の文脈において、阻害は、遺伝子発現の調節の好ましい形態であり、そしてｍＲＮＡは好ましい標的である。

【０２１７】

本発明において、標的は、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１

２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする核酸分子である。所望の効果（例えば、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２の発現の検出または調節）が生じるようなアンチ遺伝子相互作用を引き起こすためのこの遺伝子の部位を迅速に（約１週間以内に）決定するための方法が、当該分野において利用可能である。好ましい遺伝子内の部位は、遺伝子のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）の翻訳開始コドンまたは終止コドンを包含する領域である。当該分野において公知なように、翻訳開始コドンは、典型的に、５’－ＡＵＧ（転写されたｍＲＮＡ分子において；対応するＤＮＡ分子における５’－ＡＴＧ）であるので、翻訳開始コドンはまた、「ＡＵＧコドン」「開始コドン」または「ＡＵＧ開始コドン」といわれる。少数派の遺伝子は、ＲＮＡ配列の５’－ＧＵＧ、５’－ＵＵＧまたは５’－ＣＵＧを有する翻訳開始コドンを有し、そして５’－ＡＵＡ、５’－ＡＣＧおよび５’－ＣＵＧは、インビボで機能することが示された。従って、用語「翻訳開始コドン」および「開始コドン」は、開始アミノ酸は、それぞれの場合において、典型的にメチオニン（真核生物において）またはホルミルメチオニン（原核生物において）であるが、多くのコドン配列を有し得る。真核細胞遺伝子は、２つ以上の代替の開始コドンを有し得、このコドンの任意の１つは、特定の細胞型または組織において、あるいは特定の条件設定下で、翻訳を開始するために優先的に利用され得る。本発明の文脈において、「開始コドン」および「翻訳開始コドン」とは、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする遺伝子から転写されたｍＲＮＡ分子の翻訳を開始するために、このようなコドンの配列にかかわらず、インビボで使用されるコドンをいう。遺伝子の翻訳終止コドン（または「停止コドン」）が３つの配列（すなわち、５’－ＵＡＡ、５’－ＵＡＧおよび５’－ＵＧＡ（対応するＤＮＡ配列は、それぞれ５’－ＴＡＡ、５’－ＴＡＧおよび５’－ＴＧＡである））の１つを有し得ることが当該分野で公知である。用語「開始コドン領域」および「翻訳開始コドン領域」とは、このようなｍＲＮＡの一部分または翻訳開始コドンからのいずれか

の方向（すなわち、５’または３’）に、約２５～約５０個の連続したヌクレオチドを包含する遺伝子をいう。同様に、用語「停止コドン領域」および「翻訳終止コドン領域」とは、このようなｍＲＮＡの一部分または翻訳終止コドンからいずれかの方向（すなわち、５’または３’）に、約２５～約５０個の連続したヌクレオチドを包含する遺伝子をいう。

【０２１８】

オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）または「コード領域」（これは、翻訳開始コドンと翻訳終止コドンとの間の領域をいう）はまた、有効に標的化され得る。他の標的領域は、５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）（これは、翻訳開始コドンからの５’方向のｍＲＮＡ部分であり、そしてｍＲＮＡの５’ｃａｐ部位と翻訳開始コドンとの間のヌクレオチドまたは遺伝子上の対応するヌクレオチドを含む）、および３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）（これは、翻訳終止コドンから３’方向のｍＲＮＡ部分であり、従って翻訳終止コドンとｍＲＮＡの３’末端との間のヌクレオチドまたは遺伝子上の対応するヌクレオチドを含む）を含む。ｍＲＮＡの５’ｃａｐは、５’－５’トリホスフェート結合によってｍＲＮＡの５’最末端残基に結合したＮ７メチレン化グアノシン残基を含む。ｍＲＮＡの５’ｃａｐ領域は、それ自身ｃａｐ構造およびｃａｐに隣接する最初の５０個のヌクレオチドを含むと考えられる。５’ｃａｐ領域はまた、好ましい標的領域である。

【０２１９】

いくつかの成熟核のｍＲＮＡ転写物は、直接翻訳されるが、多くは、「イントロン」として知られる１以上の領域を含み、これは、転写物が翻訳される前の転写物から切除される。残った（そして従って翻訳された）領域は、「エキソン」として知られ、そして一緒にスプライシングされ、連続したｍＲＮＡ配列を形成する。存在する場合、ｍＲＮＡスプライス部位（すなわち、イントロンーエキソン連結物）はまた、好ましい標的領域であり、そして異常なスプライシングが疾患に関連するか、または特定のｍＲＮＡスプライス産物の過剰産生が疾患に関連する状況において、特に有用である。再配列または欠失に起因する異常な融合連結物もまた、好ましい標的である。イントロンはまた、標的化されたアンチ遺伝子化合物（例えば、ＤＮＡまたはプレｍＲＮＡ）のための有効な標的領域である

。

【０２２０】

一旦１以上の標的部位が、当該分野における技術を用いて同定された場合、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２の遺伝子標的に十分に相補的である（すなわち、十分うまく、かつ十分な特異性を有してハイブリダイズする）オリゴヌクレオチドが、所望の効果を与えるために選択される。所定のタンパク質をコードするｃＤＮＡ配列に基づくアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを得る能力は、例えば、ＳｔｅｉｎおよびＣｏｈｅｎ（Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４８：２６５９（１９８８））およびｖａｎ　ｄｅｒ　Ｋｒｏｌら（ＢｉｏｌＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　６：９５８（１９８８））に記載される。例えば、部位を標的化することは、コンビナトリアルライブラリー（ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ　ｌｉｂｒａｒｉｙ）を用いて、好ましくはミクロアレーにおいて迅速に決定され得る。ペプチド核酸コンビナトリアルライブラリーの統合は、米国特許第５，８６４，０１０号に開示される。アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドは、これらが、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２の核酸配列に基づいて、そしてこれらに特異的に設計される限り、ＲＮＡまたは改変された骨格または改変されたヌクレオシドを有する他の分子を含む。

【０２２１】

ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２のアンチ遺伝子化合物の配列は、特異的にハイブリダイズ可能であるその標的核酸の配列に１００％相補的である必要はない（最も、１００％の相補性は好ましい）。アンチ遺伝子化合物は、標的のＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２のＤＮＡまたはＲＮＡ分子へのこの化合物の結合が、標的ＤＮＡまたはＲＮＡの正常な機能を妨害し、有用性の損失を引き起こす場合、および特定の結

合が所望される条件下（すなわち、インビボアッセイまたは治療の処置の場合における生理学的状況下、およびインビトロアッセイの場合、そのアッセイが実施される条件下）で非標的配列へのＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２のアンチ遺伝子化合物の非特異的な結合を避けるのに十分な程度の相補性がある場合、特異的にハイブリダイズする。

【０２２２】

標的遺伝子の機能を調節するために、種々の細胞（ＨＵＶＥＣを含む）のアンチ遺伝子化合物を投与するための方法は、公知である（例えば、Ａｃｋｅｒｍａｎｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ ２７４（１６）：１１２４５－５２（１９９９））。

【０２２３】

アンチ遺伝子の特異性および感受性は、治療的用途に対して特に適している。アンチ遺伝子オリゴヌクレオチドは、動物およびヒトの疾患の状態の処置における治療的成分をして利用されてきた。アンチ遺伝子オリゴヌクレオチドは、ヒトに安全かつ有効に投与されてきて、そして多くの臨床的治験が現在行われている。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、動物とヒトの両方において、受容可能な安全性および毒性プロフィール（ｔｏｘｉｃｉｔｙ ｐｒｏｆｉｌｅ）を示した。多くのアンチセンス分子は、フェーズＩＩおよびフェーズＩＩＩの治験にある。アンチセンス化合物は、受容され、そしてDMVで誘発された網膜炎の処置のために市場で取引される。クラスとして、アンチセンス分子は、全身的な送達に対して動物およびヒトにおいて安全であることが証明された。従って、アンチ遺伝子治療は、動物、特にヒトの細胞、組織の処置のための処置レジメにおいて有用であるように形成され得る、有用な治療的形態であり得ることが確立された。次いで、動物モデルにおける毒性および有効性を試験するための方法が、当該分野において十分確立される。

【０２２４】

本発明の文脈において、用語「オリゴヌクレオチド」とは、リボ核酸（ＲＮＡ）またはデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）あるいはそれらの模倣物のオリゴマーもし

くはポリマーをいう。この用語は、天然に存在する核酸塩基、糖および共有結合的ヌクレオシド間（ｉｎｔｅｒｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ）（骨格）結合ならびに同様に機能する天然に存在しない部分を有するオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドを含む。このような改変されたまたは置換されたオリゴヌクレオチドは、しばしば、望ましい特性（例えば、増強された細胞の取り込み、核酸標的に対する増強された親和性およびヌクレアーゼ存在下での増大された安定性）のために、天然の形態を超えて好ましい。

【０２２５】

本発明に従うアンチ遺伝子化合物は、好ましくは、約５～約６０個の核酸塩基を含む。約８～約３０個の核酸塩基（すなわち、約８～約３０個の結合したヌクレオシド）からなるアンチ遺伝子オリゴヌクレオチドが、特に好ましく、そして約１５～約２５個のヌクレオシドが最も好ましい。

【０２２６】

１７～１８個の塩基配列は、これがヒトゲノムにおける固有の配列の推定される長さであるので、特に目的である。当該分野において公知であるように、ヌクレオシドは、核酸塩基－糖の組み合わせである。ヌクレオシドの塩基部分は、通常、複素環式の塩基である。このような複素環式の塩基の２つの最も一般的なクラスは、プリンおよびピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合的ン結合したリン酸基をさらに含むヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むこれらのヌクレオシドのために、リン酸基は、その糖の２’、３’または５’のいずれかのヒドロキシル基に結合し得る。オリゴヌクレオチドを形成する際に、リン酸基は、隣接するヌクレオシドとお互いに共有結合的に結合し、線状のポリマー化合物を形成する。代わりに、この線状ポリマー構造のそれぞれの末端は、さらに結合し、環状構造を形成し得るが、通常、開いた線状構造が好ましい。オリゴヌクレオチド構造内で、リン酸基は、通常、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間骨格を形成するといわれる。ＲＮＡおよびＤＮＡの通常の結合または骨格は、３’の５’へのリン酸ジエステル結合である。

【０２２７】

従って、標的核酸配列へのアンチ遺伝子オリゴヌクレオチド（アンチセンスオ

リゴヌクレオチドまたはセンスオリゴヌクレオチドのいずれか）の結合は、二重鎖または三重鎖の形成を引き起こし、これらは、二重鎖の増強された分解、転写または翻訳の未熟な終止を含むいくつかの手段の１つによる、あるいは他の手段による標的配列の転写または翻訳をブロックする。従って、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２のタンパク質の発現をブロックするために使用され得る。アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドは、さらに改変された糖－リン酸ジエステル骨格（または他の糖結合（例えば、ＷＯ９１／０６６２９に記載される糖結合））を有するオリゴヌクレオチドを含み、ここで、このような糖結合は、内因性ヌクレアーゼに耐性である。耐性糖結合を有するこのようなオリゴヌクレオチドは、インビボで安定である（すなわち、酵素分解に抵抗し得る）が、標的ヌクレオチド配列に結合し得る配列特異性を保持する。センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例としては、有機物の基に共有結合的に結合するこのようなオリゴヌクレオチド（例えば、ＷＯ９０／１００４８に記載されるようなオリゴヌクレオチド）、および標的核酸配列に対するオリゴヌクレオチドの親和性を増大させる他の基（例えば、ポリ－（Ｌ－リジン））が挙げられる。なおさらに、挿入（ｉｎｔｅｒｃａｌａｔｉｎｇ）剤（例えば、エリプチシン）およびアルキル化剤または金属複合体が、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドにくっつけられ、以下に記載されるように標的ヌクレオチド配列に対するアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドの結合特異性を改変し得る。

好ましいＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯＣ－Ｃ－ＭＧ．７２のアンチ遺伝子化合物の特定の例としては、改変された骨格または天然に存在しないヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドが挙げられる。この明細書に規定されるように、改変された骨格を有するオリゴヌクレオチドとしては、骨格にリン原子を保持するオリゴヌクレオチドおよび骨格にリン原子を有さないオリゴヌクレオチドが挙げられる。この明細書の目的のために、そして当該分野において時々参照されるように、それらのヌクレオシド間骨格にリン原子を有さない改変さ

れたオリゴヌクレオチドもまた、オリゴヌクレオシドとしてみなされ得る。

【０２２８】

好ましい改変されたオリゴヌクレオチド骨格としては、例えば、ホスホロチオネート、キラルホスホロチオネート、ホスホロジチオネート、リン酸トリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、３’アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含むメチルおよび他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、３’アミノホスホロアミデートおよびアミノアルキルホスホロアミデートを含むホスホロアミデート、チオノホスホロアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、ならびに通常の３’－５’結合、これらの２’－５’結合アナログ、および逆の極性を有する結合（ここで、ヌクレオシド単位の隣接する対は、３’－５’の５’－３’への結合または２’－５’の５’－２’への結合である）を有するボラノホスフェートが挙げられる。種々の塩、混合された塩および遊離酸の形態もまた挙げられる。リンを含む結合の調製を教示する代表的な米国特許としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：米国特許第３，６８７，８０８号；同第４，４６９，８６３号；同第４，４７６，３０１号；同第５，０２３，２４３号；同第５，１７７，１９６号；同第５，１８８，８９７号；同第５，２６４，４２３号；同第５，２７６，０１９号；同第５，２７８，３０２号；同第５，２８６，７１７号；同第５，３２１，１３１号；同第５，３９９，６７６号；同第５，４０５，９３９号；同第５，４５３，４９６号；同第５，４５５，２３３号；同第５，４６６，６７７号；同第５，４７６，９２５号；同第５，５１９，１２６号；同第５，５３６，８２１号；同第５，５４１，３０６号；同第５，５５０，１１１号；同第５，５６３，２５３号；同第５，５７１，７９９号；同第５，５８７，３６１号；同第および５，６２５，０５０号（これらの各々は、本明細書中で参考として援用される）。

【０２２９】

骨格にリン原子を含まない好ましい改変されたオリゴヌクレオチド骨格は、短鎖のアルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合されたヘテロ原子およびアルキルまたはシクロアルキルのヌクレオシド間結合、あるいは１以上の

短鎖のヘテロ原子または複素環式のヌクレオシド間結合を形成する骨格をこれらの骨格内に有するリン原子を含む。これらは、モルホリノ（ｍｏｒｈｐｌｉｎｏ）結合（一部分ヌクレオシドの糖部分から形成される）；シロキサン骨格；スルフィド、スルフォキシドおよびスルホン骨格；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；アルケンを含む骨格；スルファメート（ｓｕｌｆａｍａｔｅ）骨格；メリレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格：スルホネートおよびスルホンアミド骨格；アミド骨格；ならびに混合されたN、O、SおよびＣＨ２の成分部分を有する他の骨格を含む。これらのオリゴヌクレオシドの調製を教示する代表的な米国特許としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：米国特許第５，０３４，５０６号；同第５，１６６，３１５号；同第５，１８５，４４４号；同第５，２１４，１３４号；同第５，２１６，１４１号；同第５，２３５，０３３号；同第５，２６４，５６２号；同第５，２６４，５６４号；同第５，４０５，９３８号；同第５，４３４，２５７号；同第５，４６６，６７７号；同第５，４７０，９６７号；同第５，４８９，６７７号；同第５，５４１，３０７号；同第５，５６１，２２５号；同第５，５９６，０８６号；同第5、６０２，２４０号；同第５，６０８，０４６号；同第５，６１０，２８９号；同第５，６１８，７０４号；同第５，６２３，０７０号；同第５，６６３，３１２号；同第５，６３３，３６０号；同第５，６７７，４３７号；および同第５，６７７，４３９号（これらの各々は、本明細書中で参考として援用される）。

【０２３０】

他の好ましいオリゴヌクレオチド模倣物において、ヌクレオチド単位の糖とヌクレオシド間の両方の結合（すなわち、骨格）は、新規の基によって置換される。この塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために保持される。このようなオリゴマーの（ｏｌｉｇｏｍｅｒｉｃ）化合物の１つ、優れた溶解性、膜移動、およびハイブリダイゼーション特性を有することが示されたオリゴヌクレオチド模倣物は、ペプチド核酸（ＰＮＡ；Ｎｉｅｌｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５４：１４９７－１５００（１９９１））といわれる。ＰＮＡ化合物において、糖－骨格はアミドを含む骨格（例えば、アミノエチルグリシ

ン骨格）によって置換される。核酸塩基は、保持され得、そして骨格のアミド部分のアザ（ａｚａ）窒素原子に直接または間接的に結合する。ＰＮＡ化合物の調製を教示する代表的な米国特許としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：米国特許第５，５３９，０８２号；同第５，７１４，３３１号；および同第５，７１９，２６２号、

ならびにＰＣＴ出願番号ＷＯ９７／３３５５１（これらの各々は、本明細書中で参考として援用される）。ＰＮＡ化合物は、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）を認識し、そして二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）に配列選択的および鎖選択的に結合し、この二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）は、鎖置換によって達成され、ここでは、ＰＮＡは、ワトソン－クリック結合によって、その相補鎖に結合し、そして実際に一本鎖のコンフォメーションにおいて他方の鎖を突出させる。ＰＮＡ化合物はまた、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）およびＲＮＡを認識して、そして配列選択的に一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）に、およびＲＮＡに結合する。ＰＮＡによるＲＮＡ、ｓｓＤＮＡまたはｄｓＤＮＡのこのような認識は、少なくとも５つの塩基長の配列において起こり得る。より好ましい認識配列の長さは、５～６０塩基対の長さであり、そしてより好ましくは、８～３０塩基対の長さであり、そして最も好ましくは、約１５～約２５ヌクレオシドである。ＰＮＡ化合物の治療的用途のために、ＰＮＡ化合物の標的物は、通常、二本鎖ＤＮＡ－－この場合、ＰＮＡは、センスとアンチセンスの両方の形態において有効である－－およびＲＮＡである。ＤＮＡが細胞外で単離される診断用途、研究方法および試薬のために、ＤＮＡは、一本鎖ＤＮＡに変化され得、そしてＰＮＡ化合物の使用は、このような一本鎖ＤＮＡおよびＲＮＡに標的化される。

【０２３１】

ＲＮＡ、ｓｓＤＮＡおよびｄｓＤＮＡへの結合を行い、そして二重鎖および三重鎖複合体を形成するのに有用なＰＮＡ化合物は、ポリアミド、ポリチオアミド、ポリスルフィンアミドまたはポリスルホンアミド骨格骨格から形成される重合体鎖であり、複数のリガンドが骨格に沿って間隔を空けた配置で配置され、少なくともいくつかのリガンドが、化合物または核酸標的のいずれかで他のリガンドと水素結合し得る。骨格を形成するアミノ酸は、同一であっても異なってもよい

が、２－アミノエチル－グリシンに基づくアミノ酸が好ましい。いくつかの場合において、ＰＮＡの結合特性を調節するために、いずれかの末端でリガンドを付着させることは興味深くあり得る。代表的なリガンドは、ＤＮＡインターカレーター（ｄｓＤＮＡ結合を改善する）、または塩基の基（例えば、リジンまたはポリリジン）（静電的な相互作用に起因してＰＮＡの結合を強める）を包含する。静電反発を減少させるために、カルボキシル基およびスルホ基のような荷電した基が使用され得る。オリゴヌクレオチドおよび／またはオリゴヌクレオシドは、ＰＮＡ部分およびオリゴヌクレオチド部分および／またはオリゴヌクレオシド部分を含むキメラを形成するために末端位置のいずれかに共有結合され得る。ヌクレオシドおよび／またはヌクレオチド（モノ、ジまたはトリホスホネート）がまた、末端位置に付着され得る。変異はまた、非末端位置に配置され得る。一つの実施形態において、ＰＮＡオリゴマーは、ヌクレアーゼ活性またはアルキル化活性を有するリガンドのような低分子量のエフェクターリガンドあるいはレポーターリガンド（蛍光、スピン標識、放射性、タンパク質認識リガンド（例えば、ビオチンまたはハプテン））に結合される。別の実施形態において、ＰＮＡは、ペプチドまたはタンパク質に結合され、ここで、このペプチドは、シグナル伝達活性を有し、そしてこのタンパク質は、例えば酵素、転写因子、または抗体である。また、ＰＮＡは、水溶性または水不溶性ポリマーに付着され得る。なお別の実施形態において、ＰＮＡは、オリゴヌクレオチドまたは炭水化物に結合される。所望のＰＮＡオリゴマーが、固体支持体に付着される部分（例えば、ペプチド鎖、レポーター、インターカレーターまたは他の型のリガンド含有基）に合成され得る。

【０２３２】

さらなる実施形態において、ＰＮＡ化合物はまた、遺伝子活性化因子および合成転写因子に特異的なＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の遺伝子配列として使用され得、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２を選択的に上方制御するのに有用である。ＲＮＡポリメラーゼによる転写開始

は、ポリメラーゼ自身によってかまたは補助転写因子によってのいずれかで、二本鎖ＤＮＡプロモーターの配列特異的な認識を包含する。続いて、約１２塩基対のＤＮＡらせんが融解する転写開始オープン複合体が形成され、これは、ＲＮＡ鎖が合成される塩基対合のために、鋳型鎖の塩基を曝露する。Ｅ．ｃｏｌｉファージＴ７　ＲＮＡポリメラーゼが、ＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖および転写伸長のための一本鎖ＤＮＡ　Ｄループを含む合成「ＲＮＡ／ＤＮＡバブル二重鎖」複合体を利用し得る。さらに、ホモピリミジンＰＮＡはまた、鎖の置換によって相補的な二本鎖ＤＮＡに結合する場合、Ｄループ構造、ＲＮＡ／ＤＮＡオープン構造と同様に振舞い、ＲＮＡポリメラーゼによって認識される構造を形成する。

【０２３３】

本発明の好ましい実施形態は、ホスホロチオエート骨格およびヘテロ原子を有するオリゴヌクレオシド骨格を有するＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２オリゴヌクレオチドであり、特に、上で参照される米国特許第５，４８９，６７７号および米国特許第５，６０２，２４０号のアミド骨格の－ＣＨ２－ＮＨ－Ｏ－ＣＨ２－、－ＣＨ２－Ｎ（ＣＨ３）－Ｏ－ＣＨ２－［メチレン（メチルアミノ）またはＭＭＩ骨格として公知］、－ＣＨ２－Ｏ－Ｎ（ＣＨ３）－ＣＨ２－、－ＣＨ２－Ｎ（ＣＨ３）－Ｎ（ＣＨ３）－ＣＨ２－および－Ｏ－Ｎ（ＣＨ３）－ＣＨ２－ＣＨ２－［ネイティブなホスホジエステル骨格が、－Ｏ－Ｐ－Ｏ－ＣＨ２－として表される］である。米国特許第５，０３４，５０６号に記載されるモルホリノ骨格構造を有するオリゴヌクレオチドもまた好ましい。

【０２３４】

改変オリゴヌクレオチドはまた、一つ以上の置換糖部分を含み得る。好ましいオリゴヌクレオチドは、２’位に以下の１つを含む：ＯＨ；Ｆ；Ｏ－，Ｓ－，またはＮ－アルキル；Ｏ－，Ｓ－，またはＮ－アルケニル；Ｏ－，Ｓ－またはＮ－アルキニル；あるいはＯ－アルキル－Ｏ－アルキル（ここで、アルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換または非置換のＣ１～Ｃ１０アルキルまたはＣ２～Ｃ１０アルケニルおよびアルキニルである）。特に好ましいのは、Ｏ［（ＣＨ２）［ｎ］Ｏ］［ｍ］ＣＨ３、Ｏ（ＣＨ２）［ｎ］ＯＣＨ３、Ｏ（ＣＨ２）［ｎ

］ＮＨ２、Ｏ（ＣＨ２）［ｎ］ＣＨ３、Ｏ（ＣＨ２）［ｎ］ＯＮＨ２、およびＯ（ＣＨ２）［ｎ］ＯＮ［（ＣＨ２）［ｎ］ＣＨ３）］２であり、ここで、ｎおよびｍは、１～約１０である。他の好ましいオリゴヌクレオチドは、２’位に以下の１つを含む：Ｃ１～Ｃ１０低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリール、アラルキル、Ｏ－アルカリールまたはＯ－アラルキル、ＳＨ、ＳＣＨ３、ＯＣＮ、Ｃｌ、Ｂｒ、ＣＮ、ＣＦ３、ＯＣＦ３、ＳＯＣＨ３、ＳＯ２ＣＨ３、ＯＮＯ２、ＮＯ２、Ｎ３、ＮＨ２，ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、ＲＮＡ切断基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態学な性質を改善するための基、またはオリゴヌクレオチドの薬力学的な性質を改善するための基、ならびに同様な性質を有する他の置換基。好ましい改変には、２’メトキシエトキシ（２’－Ｏ－ＣＨ２ＣＨ２ＯＣＨ３、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）または２’－ＭＯＥとしても公知）（Ｍａｒｔｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｅｌｖ．Ｃｈｉｍ．Ａｃｔａ，７８：４８６－５０４（１９９５）；ＭｃＫａｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７４（３）：１７１５－２２（１９９９））、すなわち、アルコキシアルコキシ基が挙げられる。２’－Ｏ－（２－メトキシ）エチル化学の組み込みは、オリゴヌクレオチドの特性において多くの重要な改善（相補的なＲＮＡに対するハイブリダイゼーション親和性の増加（改変あたり１．５℃）、および３’－エキソヌクレアーゼと細胞内ヌクレアーゼの両方に対する耐性の増加を含む）を提供する。これらの改善は、オリゴヌクレオチド効力の実質的な増加（例えば、７２時間後に２０倍より大きい）を生じる。さらに好ましい改変には、２’－ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、Ｏ（ＣＨ２）２ＯＮ（ＣＨ３）２基（２’－ＤＭＡＯＥとして公知）が挙げられる。

【０２３５】

他の好ましい改変は、２’メトキシ（２’－Ｏ－ＣＨ３）、２’－アミノプロポキシ（２’－ＯＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＮＨ２）および２’フルオロ（２’－Ｆ）を含む。同様な改変はまた、オリゴヌクレオチドの他の位置、特に３’末端ヌクレオチドの糖の３’位または２’－５’連結オリゴヌクレオチドおよび５’末端ヌクレオチドの５’位でなされ得る。オリゴヌクレオチドはまた、ペントフラノ

シル糖の代わりに、シクロブチル部分のような糖部分を有し得る。このような改変糖構造の調製を教示する代表的な米国特許は、限定しないが、以下が挙げられる：米国特許第４，９８１，９５７号；同第５，１１８，８００号；同第５，３１９，０８０号；同第５，３５９，０４４号；同第５，３９３，８７８号；同第５，４４６，１３７号；同第５，４６６，７８６号；同第５，５１４，７８５号；同第５，５１９，１３４号；同第５，５６７，８１１号；同第５，５７６，４２７号；同第５，５９１，７２２号；同第５，５９７，９０９号；同第５，６１０，３００号；同第５，６２７，０５３号；同第５，６３９，８７３号；同第５，６４６，２６５号；同第５，６５８，８７３号；同第５，６７０，６３３号；および同第５，７００，９２０号（これらのそれぞれは、本明細書中でその全体で参考として援用される）。

【０２３６】

オリゴヌクレオチドは、核酸塩基（単純に「塩基」と呼ばれる）改変または置換を含み得る。本明細書中で使用する場合、「非改変」または「天然」核酸塩基は、プリン塩基アデニン（Ａ）およびグアニン（Ｇ）、ならびにピリミジン塩基チミジン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）およびウラシル（Ｕ）を含む。改変核酸塩基には、５－メチルシトシン（５－ｍｅ－Ｃ）、５－ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの６－メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの２－プロピルおよび他のアルキル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミンおよび２－チオシトシン、５－ハロウラシルおよびシトシン、５－プロピルウラシルおよびシトシン、６－アゾウラシル、シトシンおよびチミン、５－ウラシル（プソイドウラシル）、４－チオウラシル、８－ハロ、８－アミノ、８－チオール、８－チオアルキル、８－ヒドロキシおよび他の８－置換アデニンおよびグアニン、５－ハロ（特に５－ブロモ）、５－トリフルオロメチルおよび他の５－置換ウラシルおよびシトシン、７－メチルグアニンおよび７－メチルアデニン、８－アザグアニンおよび８－アザアデンニン、７－デアザグアニンおよび７－デアザアデニンおよび３－デアザグアニンおよび３－デアザアデニンのような他の合成および天然塩基が挙げられる。さらなる核酸塩基には、米国特許第３，６８７，８０８、「Ｔｈ

ｅ Ｃｏｎｃｉｓｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ Ｏｆ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ａｎｄ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ」，８５８－８５９頁，Ｋｒｏｓｃｈｗｉｔｚ，ｅｄ．Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，（１９９０），Ｅｎｇｌｉｓｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｇｅｗａｎｄｔｅ Ｃｈｅｍｉｅ，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｅｄｉｔｉｏｎ，３０：６１３（１９９１）、およびＳａｎｇｈｖｉ（Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｃｈａｐｔｅｒ １５，２８９－３０２頁，Ｃｒｏｏｋｅ ａｎｄ Ｌｅｂｌｅｕ，ｅｄ．，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，（１９９３））に開示されるものが挙げられる。本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増加するために特に有用な核酸塩基は、５－置換ピリミジン、６－アザピリミジン、ならびにＮ－２、Ｎ－６およびＯ－６置換プリン（２－アミノプロピルアデニン、５－プロピルウラシルおよび５－プロピニルシトシンを含む）が挙げられる。５－メチルシトシン置換は、核酸二重鎖安定性を０．６～１．２℃増加することを示し（Ｓａｎｇｈｖｉ、同書、２７６－２７８頁）、現在好ましい塩基置換であり、なおより詳細には、２’－Ｏ－メトキシエチル糖改変と組み合わせる場合である。特定の上記改変核酸塩基ならびに他の改変核酸塩基の調製を教示する代表的な米国特許は、限定しないが、以下が挙げられる：上記米国特許第３，６８７，８０８号、ならびに米国特許第４，８４５，２０５号；同第５，１３０，３０２号；同第５，１３４，０６６号；同第５，１７５，２７３号；同第５，３６７，０６６号；同第５，４３２，２７２号；同第５，４５７，１８７号；同第５，４５９，２５５号；同第５，４８４，９０８号；同第５，５０２，１７７号；同第５，５２５，７１１号；同第５，５５２，５４０号；同第５，５８７，４６９号；同第５，５９４，１２１；同第５，５９６，０９１号；同第５，６１４，６１７号；同第５，６８１，９４１号；および同第５，７５０，６９２（これらのそれぞれは、本明細書中で参考として援用される）。

【０２３７】

本発明のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２オリゴヌクレオチドの別の改変は、活性、細胞分布またはオリゴヌクレオチドの細胞取り込みを

向上する一つ以上の部分または結合体をオリゴヌクレオチドに化学的に連結することを含む。このような部分には、限定しないが、コレステロール部分のような脂質部分（Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８６：６５５３－６５５６（１９８９））、コール酸 （Ｍａｎｏｈａｒａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔ ４：１０５３－１０６０（１９９４））、チオエーテル（例えば、ヘキシル－Ｓ－トリチルチオール（Ｍａｎｏｈａｒａｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６０：３０６－３０９（１９９２）；Ｍａｎｏｈａｒａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔ．３：２７６５－２７７０（１９９３））、チオコレステロール（Ｏｂｅｒｈａｕｓｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０：５３３－５３８（１９９２））、脂肪族鎖（例えば、ドデカンジオール残基またはウンデシル残基）（Ｓａｉｓｏｎ－Ｂｅｈｍｏａｒａｓ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．１０：１１１１－１１１８（１９９１）；Ｋａｂａｎｏｖ ｅｔ ａｌ．，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．２５９：３２７－３３０（１９９０）；Ｓｖｉｎａｒｃｈｕｋ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ ７５：４９－５４（１９９３））、リン脂質（例えば、ジ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロールまたはトリエチルアンモニウム１，２－ジ－Ｏ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロ－３Ｈ－ホスホネート（Ｍａｎｏｈａｒａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，３６：３６５１－３６５４（１９９５）；Ｓｈｅａ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８：３７７７－３７８３（１９９０））、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖（Ｍａｎｏｈａｒａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ ＆ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ １４：９６９－９７３（１９９５））、またはアダマンタン酢酸（Ｍａｎｏｈａｒａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．３６：３６５１－３６５４（１９９５）、パルミチル部分（Ｍｉｓｈｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ １２６４：２２９－２３７（１９９５）、またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ－カルボニル－オキシコレステロール部分（Ｃｒｏｏｋｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．，２７７：９２３－９３７（１９９６））

が挙げられる。このようなオリゴヌクレオチド結合体の調製を教示する代表的な米国特許は、限定しないが、以下が挙げられる：米国特許第４，８２８，９７９号；同第４，９４８，８８２号；同第５，２１８，１０５号；同第５，５２５，４６５号；同第５，５４１，３１３号；同第５，５４５，７３０号；同第５，５５２，５３８号；同第５，５７８，７１７；同第５，５８０，７３１号；同第５，５８０，７３１号；同第５，５９１，５８４号；同第５，１０９，１２４号；同第５，１１８，８０２号；同第５，１３８，０４５号；同第５，４１４，０７７号；同第５，４８６，６０３号；同第５，５１２，４３９号；同第５，５７８，７１８号；同第５，６０８，０４６号；同第４，５８７，０４４号；同第４，６０５，７３５号；同第４，６６７，０２５号；同第４，７６２，７７９号；同第４，７８９，７３７号；同第４，８２４，９４１号；同第４，８３５，２６３号；同第４，８７６，３３５号；同第４，９０４，５８２号；同第４，９５８，０１３号；同第５，０８２，８３０号；同第５，１１２，９６３号；同第５，２１４，１３６号；同第５，０８２，８３０号；同第５，１１２，９６３号；同第５，２１４，１３６号；同第５，２４５，０２２号；同第５，２５４，４６９号；同第５，２５８，５０６号；同第５，２６２，５３６号；同第５，２７２，２５０号；同第５，２９２，８７３号；同第５，３１７，０９８号；同第５，３７１；同第２４１，５，３９１，７２３号；同第５，４１６，２０３；同第５，４５１，４６３号；同第５，５１０，４７５号；同第５，５１２，６６７号；同第５，５１４，７８５号；同第５，５６５，５５２号；同第５，５６７，８１０号；同第５，５７４，１４２号；同第５，５８５，４８１号；同第５，５８７，３７１号；同第５，５９５，７２６号；同第５，５９７，６９６号；同第５，５９９，９２３号；同第５，５９９，９２８および同第５，６８８，９４１号（これらのそれぞれは、本明細書中で参考として援用される）。

【０２３８】

所定の化合物の全ての位置が均一に改変される必要はなく、実際、記載される改変の１つより多くが、単一の化合物またはオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオシドに組み込まれ得る。従って、本発明はまた、キメラ化合物であるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－

Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原性化合物を含む。「キメラＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原」化合物または「抗原キメラ」は、２つ以上の化学的に異なる領域（それぞれが、少なくとも一つのモノマーユニット（すなわち、オリゴヌクレオチドの場合にはヌクレオチド）から構成される）を含む抗原性化合物、特にオリゴヌクレオチドを意味する。これらのオリゴヌクレオチドは、代表的に、オリゴヌクレオチドが、ヌクレアーゼ分解に対する増加した耐性、増加した細胞取り込み、および／または標的核酸に対する増加した結合親和性をオリゴヌクレオチドに与えるように改変される少なくとも一つの領域を含む。オリゴヌクレオチドのさらなる領域は、ＲＮＡ：ＤＮＡまたはＲＮＡ：ＲＮＡハイブリッドを切断し得る酵素（例えば、ＲＮａｓｅ）に対する基質として役立ち得る。例示として、ＲＮａｓｅ　Ｈは、ＲＮＡ：ＤＮＡ二重鎖のＲＮＡ鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。従って、ＲＮａｓｅＨの活性化は、ＲＮＡ標的の切断を生じ、これによって、遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の効率を非常に増加する。結果として、比較可能な結果は、しばしば、キメラオリゴヌクレオチドが使用される場合、より短いオリゴヌクレオチドを用いて得られ得、同じ標的領域をハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシオリゴヌクレオチドと比較される。ＲＮＡ標的の切断は、ゲル電気泳動および必要ならば当該分野で公知の関連する核酸ハイブリダイゼーションによって慣用的に検出され得る。本発明のキメラ抗原性化合物は、２つ以上のオリゴヌクレオチド、改変オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシドおよび／またはオリゴヌクレオチド模倣物（本明細書中に記載される）の複合構造として形成され得る。これらには、連結ヌクレオシドの「ギャップ」セグメントが連結ヌクレオシドの５’と３’の間の「ウイング（ｗｉｎｇ）」セグメントに位置付けられる第１型、ならびに「ギャップ」セグメントがオリゴマー化合物の３’末端または５’末端のいずれかに位置する第２の「開放端」型が挙げられる。第１型のオリゴヌクレオチドはまた、「ギャップマー」またはギャップオリゴヌクレオチドとしても当該分野において公知である。第２型のオリゴヌクレオチドは、「ヘミマー（ｈｅｍｉｍｅｒ）」または「ウイングマー（ｗｉｎｇｍｅｒ）」としても当該分

野において公知である。このようなハイブリット構造の調製を教示する代表的な米国特許は、限定しないが、以下が挙げられる：米国特許第５，０１３，８３０号；同第５，１４９，７９７号；同第５，２２０，００７号；同第５，２５６，７７５号；同第５，３６６，８７８号；同第５，４０３，７１１号；同第５，４９１，１３３号；同第５，５６５，３５０号；同第５，６２３，０６５号；同第５，６５２，３５５号；同第５，６５２，３５６号；および同第５，７００，９２２号（これらのそれぞれは、その全体において、本明細書中で参考として援用される）。用語「プロドラッグ」は、内因性酵素または他の化合物および／または条件の作用によって、体内またはその細胞において活性形態（すなわち、薬物）に変換される不活化形態で調製される治療剤を示す。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原性化合物として、それらのプロドラッグバージョンが含まれる。例えば、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２オリゴヌクレオチドのプロドラッグバージョンは、ＷＯ９３／２４５１０またはＷＯ９４／２６７６４に開示される方法に従って、ＳＡＴＥ［（Ｓ－アセチル－２－チオエチル）ホスフェート］誘導体として調製され得る。

【０２３９】

本発明のＰＮＡ化合物は、ＷＯ９２／２０７０２、ＷＯ／９２／２０７０３および米国特許第５，６４１，６２５号に開示されるものを含む任意の方法によって合成され得る。

【０２４０】

本発明のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原オリゴヌクレオチド化合物は、固相合成の周知技術によって便利かつ慣用的になされ得る。当該分野において公知のこのような合成のための任意の他の手段は、さらに、または代替として使用され得る。

【０２４１】

本発明のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ

．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原性化合物は、取り込み、分布および／または吸収を補助するために、混合される得か、カプセル化される得か、結合体化され得るか、あるいはそうでなければ他の分子と会合し得るか、分子構造または化合物の混合物（例えば、リポソーム）、レセプター標的分子、経口、直腸、局所または他の処方物であり得る。このような取り込み、分布および／または吸収を補助する処方物の調製を教示する代表的な米国特許は、限定しないが、以下が挙げられる：米国特許第５，１０８，９２１号；同第５，３５４，８４４号；同第５，４１６，０１６号；同第５，４５９，１２７号；同第５，５２１，２９１号；同第５，５４３，１５８号；同第５，５４７，９３２号；同第５，５８３，０２０号；同第５，５９１，７２１号；同第４，４２６，３３０号；同第４，５３４，８９９号；同第５，０１３，５５６号；同第５，１０８，９２１号；同第５，２１３，８０４号；同第５，２２７，１７０号；同第５，２６４，２２１号；同第５，３５６，６３３号；同第５，３９５，６１９号；同第５，４１６，０１６号；同第５，４１７，９７８号；同第５，４６２，８５４号；同第５，４６９，８５４号；同第５，５１２，２９５号；同第５，５２７，５２８号；同第５，５３４，２５９号；同第５，５４３，１５２号；同第５，５５６，９４８号；同第５，５８０，５７５号；および同第５，５９５，７５６（これらのそれぞれは、本明細書中で参考として援用される）。

【０２４２】

本発明のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原性化合物は、薬学的に受容可能な塩、エステル、またはこのようなエステルの塩、あるいはヒトを含む動物への投与時に、生物学的に活性な代謝物またはその残基を（直接的または間接的に）提供し得る任意の他の化合物を含む。従って、例えば、この開示は、本発明の化合物のプロドラッグおよび薬学的に受容可能な塩、このようなプロドラッグの薬学的に受容可能な塩、ならびに他の生物学的同等物に引かれる。用語「薬学的に受容可能な塩」は、本発明の化合物の生理学的および薬学的に受容可能な塩：すなわち、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、そしてそれに対する望ましくない中毒的な効果を与えない塩をいう。薬学的に受容可能な

塩基付加塩は、金属またはアミン（例えば、アルカリ金属およびアルカリ土類金属または有機アミン）を用いて形成される。カチオンとして使用される金属の例は、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどである。適切なアミンの例は、Ｎ，Ｎ’－ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、エチレンジアミン、Ｎ－メチルグルカミン、およびプロカイン（例えば、Ｂｅｒｇｅ　ｅｔ　ａｌ．，「Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓａｌｔｓ」，Ｊ．ｏｆ　Ｐｈａｒｍａ　Ｓｃｉ．６６：１－１９（１９７７）を参照のこと）である。この酸性化合物の塩基付加塩は、遊離酸形態を十分な量の所望の塩基と接触させて、従来の方法で塩を形成することによって調製される。遊離酸形態は、塩形態を酸と接触させ、そして従来の方法で遊離酸を単離することによって再生され得る。遊離酸形態は、極性溶媒中での溶解性のような特定の物理的な性質において幾分それぞれの塩形態とは異なるが、そうでなければ、塩は、本発明の目的のために、それぞれの遊離酸に等価である。本明細書中で使用される場合、「薬学的な付加塩」は、本発明の組成物の成分の一つの酸形態の薬学的に受容可能な塩を包含する。これらは、アミンの有機または無機酸塩を包含する。好ましい酸塩は、塩酸塩、酢酸塩、サリチル酸塩、硝酸塩およびリン酸塩である。他の適切な薬学的に受容可能な塩は、当該分野において周知であり、種々の無機および有機酸（例えば、無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸またはリン酸）；有機カルボン酸；スルホン酸；スルホまたはホスホ酸またはN置換スルファミン酸（例えば、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、メチルマレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、乳酸、シュウ酸、グルコン酸、グルカル酸（ｇｌｕｃａｒｉｃ　ａｃｉｄ）、グルクロン酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、サリチル酸、４－アミノサリチル酸、２－フェノキシ安息香酸、２－アセト安息香酸、エンボン酸（ｅｍｂｏｎｉｃ　ａｃｉｄ）、ニコチン酸またはイソニコチン酸）；アミノ酸（例えば、天然のタンパク質の合成に含まれる２０のαアミノ酸（例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸）ならびにフェニル酢酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、２－ヒドロキシエタンスルホン酸、エタン－１，２－ジスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、４－メチルベンゼンスル

ホン酸、ナフタレン－２－スルホン酸、ナフタレン－１，５－ジスルホン酸、２－または３－ホスホグリセレート、グルコース－６－ホスホネート、Ｎ－シクロヘキシルスルファミン酸（シクラメートの形成をともなう）、または他の酸の有機化合物（例えば、アスコルビン酸）の塩基の塩を含む。化合物の薬学的に受容可能な塩はまた、薬学的に受容可能なカチオンを用いて調製され得る。適切な薬学的に受容可能なカチオンは、当業者に周知であり、アルカリ、アルカリ土類、アンモニウムおよび第四級アンモニウムカチオンが挙げられる。炭酸塩または炭酸水素塩もまた可能である。

【０２４３】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２オリゴヌクレオチドについて、薬学的に受容可能な塩の好ましい例には、（ａ）カチオンで形成される塩（例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウム、ポリアミン（スペルミンおよびスペルミジン）など）；（ｂ）無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸など）で形成される酸付加塩；（ｃ）有機酸（例えば、酢酸、オキサル酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パルミチン酸、アルギニン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、メタンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ポリガラクツロン酸など）で形成される塩；ならびに（ｄ）元素アニオン（例えば、塩素、臭素、ヨウ素）から形成される塩が含まれるが、これらに限定されない。本発明のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原化合物は、診断、治療、予防ならびに研究試薬およびキットのために使用され得る。治療のために、本明細書で議論される疾患または障害であって、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の発現を調整することによって処置され得る疾患または障害を有すると疑われる動物、好ましくは、ヒトは、本発明に従う抗原化合物を投与することによって処置される。本発明の化合物は、有効量の抗原化合物を適切な

薬学的に受容可能な希釈剤またはキャリアに添加することによって薬学的組成物中にて利用され得る。本発明の抗原化合物および方法の利用はまた、予防的に、例えば、所望の応答を防止または遅延するために有用であり得る。

【０２４４】

研究および診断試薬としてのＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原化合物は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする核酸にハイブリダイズし、サンドイッチおよびその他のアッセイが、容易に構成され得るようにする。本発明の抗原性オリゴヌクレオチドの、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする核酸とのハイブリダイゼーションは、当該分野で公知の手段によって検出され得る。このような手段には、酵素のオリゴヌクレオチドへの結合、オリゴヌクレオチドの放射能標識、蛍光レポーター、または任意の他の適切な検出手段が含まれる。サンプル中のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原化合物のレベルを検出するためのこのような検出手段を使用するキットが調製され得る。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原化合物は、標識核酸配列を含有する細胞へと、任意の遺伝子トランスファー方法（例えば、$CaPO_4$媒介ＤＮＡトランスフェクション、エレクトロポレーション）によって、または遺伝子トランスファーベクター（例えば、エプスタインバーウイルスおよび本明細書において詳細に議論されるもの）を使用して、導入され得る。簡単には、好ましい手順において、アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドが、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含有する細胞が、組換えレトロウイルスベクターに、インビボまたはエキソビボのいずれかで、接触される。適切なレトロウイルスベクターには、マウスレトロウイルスＭ－ＭｕＬＶに由来するもの、Ｎ２（Ｍ－ＭｕＬＶに由来するレトロウイルス）、またはＤＣＴ５Ａ、Ｄ

ＣＴ５Ｂ、およびＤＣＴ５Ｃと命名される二重コピーベクター（ＷＯ９０／１３６４１を参照）が含まれるが、これらに限定されない。センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、標的ヌクレオチド配列を含有する細胞に、ＷＯ９１／０４７５３に記載されるように、リガンド結合分子との結合体の形成によって導入され得る。適切なリガンド結合分子には、細胞表面レセプター、成長因子、その他のサイトカイン、または細胞表面レセプターに結合するその他のリガンドが含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、リガンド結合分子の結合は、リガンド結合分子のその対応する分子もしくはレセプターに結合する能力を実質的に妨害しないか、またはセンスもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその結合体化バージョンが細胞へ侵入する能力を実質的に遮断しない。あるいは、センスもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的核酸配列を含有する細胞へ、ＷＯ９０／１０４４８に記載されるように、オリゴヌクレオチド脂質複合体の形成によって、導入され得る。センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド脂質複合体は、好ましくは、内因性リパーゼによて細胞内において解離される。これらおよびその他の方法は、本明細書においてより詳細に議論される。

【０２４５】

したがって、本発明はまた、本発明のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗原化合物を含有する薬学的組成物および処方物を含む。本発明の薬学的組成物は、局所的もしくは全身的処置のいずれかが所望されるか、および処置される領域に依存して、多数の方法において投与される。投与は、局所的であるか（眼科および粘膜を含み、膣および直腸送達を含む）、肺(例えば、粉末もしくはエアロゾルの吸入またはガス注入（ネブライザーによるもの；気管内を含む）による）、鼻腔内、表皮、および経皮、経口もしくは非経口であり得る。非経口投与には、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、筋肉内注射もしくは注入；または頭蓋内（例えば、くも膜下内もしくは脳室内）投与を含む。少なくとも１つの２’－Ｏ－メトキシエチル改変を有するオリゴヌクレオチドは、経口投与に特に有用であると考えられる。腹腔内投与されるＰＮＡは、血液脳関門を通過し

、特に、遺伝子発現を減少することがインビボで示されている（例えば、Ｔｙｌｅｒら、ＰＮＡＳ　９６（１２）：７０５３－８（１９９９）を参照のこと）。

【０２４６】

局所投与のための薬学的組成物および処方物には、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点滴剤、坐剤、スプレー、液体、および粉末が含まれ得る。従来の薬学的キャリア、水性、粉末または油性ベースのもの、濃厚剤などは、必要でありまたは所望され得る。被覆したコンドーム、グローブなどもまた、有用であり得る。経口投与のための組成物および処方物には、粉末または顆粒、水中または非水性媒体中の懸濁液または溶液、カプセル、袋（ｓａｃｈｅｔ）または錠剤が含まれる。濃厚剤、香味剤、希釈剤、エマルジョン、分散補助剤もしくは結合剤は、望ましくあり得る。

【０２４７】

非経口、くも膜下内、または脳室内投与のための組成物および処方物は、緩衝液、希釈剤、およびその他の適切な添加剤（例えば、透過促進剤、キャリア化合物、および他の薬学的に受容可能なキャリアもしくは賦形剤が含まれるが、これらに限定されない）もまた含み得る滅菌水溶液を含み得る。本発明の薬学的組成物には、溶液、エマルジョン、およびリポソーム含有処方物が含まれるが、これらに限定されない。これらの組成物は、種々の組成物から生成され得、それには、予め形成された液体、自己乳化固体、および自己乳化半固体が含まれるが、これらに限定されない。

【０２４８】

本発明の薬学的組成物は、単位用量形態で都合よく提示され得るが、薬学産業界で周知の従来の技術にしたがって調製され得る。このような技術には、活性成分を、薬学的キャリアまたは賦形剤と結合させる工程が含まれる。一般的に、その処方物は、活性成分を液体キャリアまたは微細に分割した固体キャリアまたはその両方と均一にかつ密接に結合させることによって、そして次いで、必要に応じて、その生成物を成型することによって調製される。

【０２４９】

本発明の組成物は、任意の多数の可能な投薬形態（例えば、錠剤、カプセル、

液体シロップ、ソフトゲル、坐剤、および浣腸が含まれるが、これらに限定されない。）へと処方され得る。本発明の組成物はまた、水性または非水性のまたは混合した媒体中における懸濁液として処方され得る。水性懸濁液はさらに、懸濁液の粘度を増大する物質（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび／またはデキストラン）を含み得る。その懸濁液はまた、安定剤を含有し得る。

【０２５０】

本発明の１つの実施形態において、薬学的組成物は、フォーム（ｆｏａｍ）として処方されそして使用され得る。薬学的フォームには、エマルジョン、マイクロエマルジョン、クリーム、ジェリー、およびリポソームのような処方物が含まれるが、これらに限定されない。これらの処方物は性質において基本的に類似であるが、精製産物の組成および一貫性において様々でありうる。このような組成物および処方物の調製は、一般に、薬学および処方の分野の当業者に公知であり、そして本発明の組成物の処方に適用され得る。

【０２５１】

（エマルジョン）

本発明の組成物は、エマルジョンとして調製および処方され得る。エマルジョンは、代表的には、通常０．１μｍの直径を超える液滴の形態において、別の液体に分散された１つの液体の異種系である。（Ｉｄｓｏｎ、Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ, Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ, Ｒｉｅｇｅｒ ａｎｄ Ｂａｎｋｅｒ（編）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ, Ｉｎｃ.、New Youk、N. Y. , 第1巻、１９９頁（１９８８）；Ｒｏｓｏｆｆ, Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ, Ｌｉｅｂｅｒｍａｍ、ＲｉｅｇｅｒおよびＢａｎｋｅｒ（編）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ, Ｉｎｃ. , New Ｙｏｒｋ, N. Y. , 第1巻、２４５頁（１９８８）；Ｂｌｏｃｋ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ, Ｌｉｅｂｅｒｍａｍ、ＲｉｅｇｅｒおよびＢａｎｋｅｒ（編）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ, Ｉｎｃ. , New Ｙｏｒｋ, N. Y. , 第2巻、３３５頁（１９８８）；Ｈｉｇｕｃｈｉら、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉ

ｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ、３０１頁（１９８５））。エマルジョンはしばしば、二相系であり、互いに親密に混合されそして分散される２つの混合することのできない液体相を含む。一般に、エマルジョンは、油中水（ｗ／ｏ）または水中油（ｏ／ｗ）の種類のいずれかであり得る。水性相が、大量の油相へと微細な液滴として微細に分割されそして分散される場合、得られる組成物は、油中水（ｗ／ｏ）エマルジョンと呼ばれる。あるいは、油相は、大量の水性相へと、微細な液滴として微細に分割され、そして分散される場合、その得られる組成物は、水中油（ｏ／ｗ）エマルジョンと呼ばれる。エマルジョンは、分散された相および活性薬物（これは、溶液として、水性相または油相で、またはそれ自体分離相として存在し得る）に加えて、さらなる組成物を含有し得る。乳化剤、安定剤、色素、および抗酸化剤のような薬学的賦形剤もまた、必要に応じて、エマルジョンにおいて存在し得る。薬学的エマルジョンはまた、２つ以上の相（例えば、油中水（ｏ／ｗ／ｏ）および水中油（ｗ／ｏ／ｗ）エマルジョンの場合）から構成される多数のエマルジョンであり得る。このような複雑な処方物は、しばしば、簡単な二成分エマルジョンが提供しない特定の利点を提供する。ｏ／ｗエマルジョンの個々の油滴が小さな水滴を包含する多数のエマルジョンは、ｗ／ｏ／ｗエマルジョンを構成する。同様に、油性の連続において安定化された水の小球における油滴の系は、ｏ／ｗ／ｏエマルジョンを提供する。エマルジョンは、安定性がわずかなまたはほとんどないことによって特徴付けられる。しばしば、エマルジョンのその分散されたかまたは不連続な相は、外部的なまたは連続した相へと十分に分散され、そしてこの形態において乳化剤およびその処方物の粘度の手段によって維持される。エマルジョンの相の例は、エマルジョンタイプの軟膏ベースおよびクリームの場合におけると同様に、半固体かまたは固体であり得る。エマルジョンの安定化の他の手段は、エマルジョンのいずれかの相に組み込み得る乳化剤の使用を含む。乳化剤は、広範に、４つのカテゴリーに分類されうる：合成界面活性剤、天然に存在する乳化剤、吸着ベース、および微細に分散された固体（Ｉｄｓｏｎ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｄｏｓａｇｅ　Ｆｏｒｍｓ，Ｌｉｅｂｅｒｍａｍ、ＲｉｅｇｅｒおよびＢａｎｋｅｒ（編）、Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅ

ｗ Ｙｏｒｋ, Ｎ. Ｙ. , 第1巻、１９９頁、（１９８８））。

【０２５２】

合成界面活性剤はまた、表面活性剤としても知られ、エマルジョンの処方物における広範な適用が見出されており、そして文献において検討されている（Ｒｉｅｇｅｒ, Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ, Ｌｉｅｂｅｒｍａｍ、ＲｉｅｇｅｒおよびＢａｎｋｅｒ（編）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ, Ｉｎｃ. , Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ, Ｎ. Ｙ. , 第1巻、２８５頁（１９８８）；Ｉｄｓｏｎ, Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ, Ｌｉｅｂｅｒｍａｍ、ＲｉｅｇｅｒおよびＢａｎｋｅｒ（編）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ, Ｉｎｃ. , Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ, Ｎ. Ｙ. , 第1巻、１９９頁（１９８８））。界面活性剤は、代表的には、両親媒性であり、そして親水性および疎水性の部分を含む。その界面活性剤の疎水性の性質に対する親水性の割合は、親水性／親油性バランス（ＨＬＢ）と呼ばれており、そして処方物の調製における界面活性剤の分類および選択における貴重なツールである。界面活性剤は、親水性基の性質に基づいて異なるクラスに分類され得る：非イオン性、アニオン性、カチオン性、および両親媒性（Ｒｉｅｇｅｒ, Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ, Ｌｉｅｂｅｒｍａｍ、ＲｉｅｇｅｒおよびＢａｎｋｅｒ（編）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ, Ｉｎｃ. , Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ, Ｎ. Ｙ. , 第1巻、２８５頁（１９８８））。

【０２５３】

エマルジョン処方物に使用される天然に存在する乳化剤には、ラノリン、蜜蝋、ホスファチド、レシチン、およびアカシアが含まれる。吸着ベースは、それらが水を吸い上げw／ｏエマルジョンを形成し得、なおそれらの半固体の一貫性（例えば、無水ラノリンおよび親水性ワセリン）を維持するように、親水性特性を有する。微細に分割された固体はまた、特に界面活性剤との組み合わせにおいて、および粘性の調製物において良好な乳化剤として使用されている。これらには、極性の無機固体（例えば、重金属の水酸化物）、非膨潤クレー（例えば、ベントナイト、アタパルガイト、ヘクロライト、カオリン、モンモリロナイト）、コロイド状ケイ酸アルミニウムおよびコロイド状ケイ酸マグネシウムアルミニウム

、顔料、および非極性固体（例えば、炭素またはグリセリルトリステアレート）が含まれる。

【０２５４】

広範な種々の非乳化材料もまた、エマルジョン処方物に含まれ、そしてエマルジョンの特性に寄与する。これらには、脂質、油、ワックス、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪エステル、湿潤剤、親水性コロイド、保存剤、および抗酸化剤が含まれる（Ｂｌｏｃｋ、Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ，Ｌｉｅｂｅｒｍａｍ、ＲｉｅｇｅｒおよびＢａｎｋｅｒ（編）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，第1巻、３３５頁、（１９８８）；Ｉｄｓｏｎ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ，Ｌｉｅｂｅｒｍａｍ、ＲｉｅｇｅｒおよびＢａｎｋｅｒ（編）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，第1巻、１９９頁、（１９８８））。

【０２５５】

親水性のコロイドまたは親水コロイドには、天然に存在するガムおよび多糖のような合成ポリマー（例えば、アカシア、寒天、アルギン酸、カラゲナン、グアーガム、カラヤガム、およびトラガカント）、セルロース誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロースおよびカルボキシプロピルセルロース）、および合成ポリマー（例えば、カルボマー、セルロースエーテル、およびカルボキシビニルポリマー）が含まれる。これらは、水中で分散または膨潤して、コロイド溶液を形成し、これは、強力な界面フィルムを、分散相の液滴の回りに形成することによって、そして外部相の粘度を増大することによってエマルジョンを安定化する。

【０２５６】

エマルジョンは、しばしば、容易に微生物の増殖を支持し得る炭化水素、タンパク質、ステロール、ホスファチドのような多数の成分を含有するので、これらの処方物は、しばしば、保存剤を組み込んでいる。エマルジョン処方物に含ませて一般的に使用される保存剤には、メチルパラベン、プロピルパラベン、４級アンモニウム塩、塩化ベンズアルコニウム、ｐ－ヒドロキシ安息香酸のエステル、およびホウ酸が含まれる。抗酸化剤もまた、処方物の悪化を防止するために、一

般的に、エマルジョン処方物に添加される。使用される抗酸化剤は、フリーラジカルスカベンジャー（例えば、トコフェロール、アルキル没食子酸塩、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、または還元剤（例えば、アスコルビン酸およびメタ亜硫酸水素塩）、および抗酸化共力剤（例えば、クエン酸、酒石酸、およびレシチン）であり得る。

【０２５７】

エマルジョン処方物の皮膚科学的、経口、および非経口経路での適用およびそれらの製造のための方法は、文献において検討されている（Ｉｄｏｓｎ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ，Ｌｉｅｂｅｒｍａｍ、ＲｉｅｇｅｒおよびＢａｎｋｅｒ（編）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，第1巻、１９９頁、（１９８８））。経口送達のためのエマルジョン処方物は、処方の簡易性、吸着の効力およびバイオアベイラビリティーの観点から、非常に広範に使用されている。（Ｒｏｓｏｆｆ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ，Ｌｉｅｂｅｒｍａｍ、ＲｉｅｇｅｒおよびＢａｎｋｅｒ（編）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，第1巻、２４５頁、（１９８８））；Ｉｄｓｏｎ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ，Ｌｉｅｂｅｒｍａｍ、ＲｉｅｇｅｒおよびＢａｎｋｅｒ（編）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，第1巻、１９９頁、（１９８８））。鉱油ベースの下剤、油溶性のビタミン、および高脂肪栄養素調製物は、一般に、経口的にｏ／ｗエマルジョンとして投与されている材料のなかのひとつである。

【０２５８】

（マイクロエマルジョン）

本発明の１つの実施形態において、オリゴヌクレオチドおよび核酸の組成物がマイクロエマルジョンとして処方される。マイクロエマルジョンは、単一の光学的に等方性かつ熱力学的に安定な液体溶液である水、油、および両親媒性の系として規定され得る（Ｒｏｓｏｆｆ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ，Ｌｉｅｂｅｒｍａｍ、ＲｉｅｇｅｒおよびＢａｎｋｅｒ（編）

、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ, Ｉｎｃ．, Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ, Ｎ. Ｙ．, 第１巻、２４５頁、（１９８８））。代表的なマイクロエマルジョンは、まず油を水性界面活性剤溶液中に分散し、次いで、十分な量の第４の成分（一般に、中間鎖長アルコール）を添加して、透明な系を形成することによって調製される系である。したがって、マイクロエマルジョンはまた、界面活性分子の界面フィルムによって安定化される２つの混和し得ない液体の熱力学的に安定な、等方的に明瞭な分散液として記載されてきた（ＬｅｕｎｇおよびＳｈａｈ、Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ ｏｆ Ｄｒｕｇｓ：Ｐｏｌｙｍｅｒｓ ａｎｄ Ａｇｇｒｅｇａｔｅ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｒｏｓｏｆｆ, Ｍ. 、編、ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ, Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１８５－２１５頁、（１９８９））。マイクロエマルジョンは、一般に、油、水、界面活性剤、共界面活性剤、および電解質を含む３つから５つの成分の組み合わせにより調製される。マイクロエマルジョンが、油中水（ｗ／ｏ）かまたは水中油（ｏ／ｗ）タイプのものであるか否かは、使用される油および界面活性剤の特性ならびに界面活性剤分子の極性ヘッドおよび炭化水素テールの構造および幾何学的パッキングに依存する（Ｓｃｈｏｔｔ, Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ, Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．, Ｅａｓｔｏｎ, Ｐａ, ２７１頁、（１９８５））。

【０２５９】

相ダイアグラムを使用する現象論的アプローチは、広範に研究されており、そして当業者にマイクロエマルジョンをどのように処方するかが理解しうる知識を生み出している（Ｒｏｓｏｆｆ、Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ, Ｌｉｅｂｅｒｍａｍ、ＲｉｅｇｅｒおよびＢａｎｋｅｒ（編）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ, Ｉｎｃ．, Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ, Ｎ. Ｙ．, 第１巻、２４５頁、（１９８８）；Ｂｌｏｃｋ、Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ, Ｌｉｅｂｅｒｍａｍ、ＲｉｅｇｅｒおよびＢａｎｋｅｒ（編）、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ, Ｉｎｃ．, Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ, Ｎ. Ｙ．, 第１巻、３３５頁、（１９８８））。従来のエマルジョンと比較して、マイクロエマルジョンはしばしば、自発的に形成される熱力学的に安定な液滴の処方物において水不溶性薬物を安定化する利点を提供する。

【０２６０】

マイクロエマルジョンの調製において使用される界面活性剤には、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Ｂｒｉｊ９６、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリグリセロール脂肪酸エステル、テトラグリセロールモノラウレート（ＭＬ３１０）、テトラグリセロールモノラウレート（ＭＯ３１０）、ヘキサグリセロールモノラウレート（ＰＯ３１０）、ヘキサグリセロールペンタオレエート（ＰＯ５００）、デカグリセロールモノカプレート（ＭＣＡ７５０）、デカグリセロールモノラウレート（ＭＯ７５０）、デカグリセロールセクイオレエート（ｄｅｃａｇｌｙｃｅｒｏｌ　ｓｅｑｕｉｏｌｅａｔｅ）（ＳＯ７５０）、デカグリセロールデカオレエート（ＤＡＯ７５０）の、単独、または共界面活性剤との組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。共界面活性剤は、通常、エタノール、１－プロパノール、および１－ブタノールのような短鎖のアルコールであり、界面流動性を、界面活性剤のフィルムに貫通することによって増大するよう働き、そしてその結果として、界面活性剤分子間で生成されるボイドスペースのために無秩序化されたフィルムを生成する。しかし、マイクロエマルジョンは、共界面活性剤を使用せずに調製され得、そしてアルコールを含まない自己乳化マイクロエマルジョンは当該分野で公知である。水性相は、代表的には、水、薬物、グリセロール、ＰＥＧ３００、ＰＥＧ４００、ポリグリセロール、プロピレングリコール、およびエチレングリコールの誘導体の水溶液、であり得るが、これらに限定されない。油相は、Ｃａｐｔｅｘ３００、Ｃａｐｔｅｘ３５５、Ｃａｐｍｕｌ　ＭＣＭ、脂肪酸エステル、中間鎖（Ｃ８－Ｃ１２）モノ、ジ、およびトリグリセリド、ポリオキシエチル化グリセリル脂肪酸エステル、脂肪アルコール、ポリグリコール化グリセリド、飽和ポリグリコール化Ｃ８－Ｃ１０グリセリド、植物油、およびシリコーン油が含まれるが、これらに限定されない。

【０２６１】

マイクロエマルジョンは、薬物の可溶性および薬物の増強した吸収の観点から特に興味深い。脂質ベースのマイクロエマルジョン（水中油型および油中水型の両方）が、薬物（ペプチドを含む）の経口バイオアベイラビリティーを増強することが提唱されている（Ｃｏｎｓｔａｎｔｉｎｉｄｅｓら，Ｐｈａｒｍａｃｅｕ

ｔｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１１：１３８５－１３９０（１９９４）；Ｒｉｔｓｃｈｅｌ，Ｍｅｔｈ．Ｆｉｎｄ．Ｅｘｐ．Ｃｌｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．１３：２０５（１９９３））。マイクロエマルジョンは、改善した薬物の可溶性、酵素加水分解からの薬物の保護、薬物吸収の可能な増強といった利点を付与し、それらの利点は、膜流動性および浸透性における界面活性剤誘導性変化、固体投与形態を超える調製の容易さ、経口投与の容易さ、改善した臨床効力、および減少した毒性に起因する（Ｃｏｎｓｔａｎｔｉｎｉｄｅｓら，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１１：１３８５（１９９４）；Ｈｏら，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．，８５：１３８－１４３（１９９６））。しばしば、マイクロエマルジョンは、その成分が室温で一緒にされた場合に、自然に形成し得る。これは、熱不安定性の薬物、ペプチドもしくはオリゴヌクレオチドを処方する場合に、特に有利であり得る。マイクロエマルジョンは、美容外科学適用および薬学適用の両方における活性成分の経皮送達において有効でもある。本発明のマイクロエマルジョン組成物およびマイクロエマルジョン処方物が、胃腸管からのオリゴヌクレオチドおよび核酸の全身吸収の増加を促進し、そして胃腸管、膣、口腔前庭ならびに他の投与領域内でのオリゴヌクレオチドおよび核酸の局所的細胞取り込みを改善することが、予期される。

【０２６２】

本発明のマイクロエマルジョンはまた、処方物の特性を改善するためそして本発明のオリゴヌクレオチドおよび核酸の吸収を増強するために、さらなる成分および添加物（例えば、ソルビタンモノステアレートおよび浸透増強剤）を含み得る。本発明のマイクロエマルジョンにおいて使用される浸透増強剤は、検討されたように、５つの広範な分類－界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、および非キレート非界面活性剤（Ｌｅｅら，Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ，ｐ．９２（１９９１））－のうちの１つに属するように分類され得る。

【０２６３】

（リポソーム） 薬物の処方について研究されそして使用されたマイクロエマルジョンに加え、組織された多くの界面活性剤構造が存在する。これらとしては

、単層、ミセル、二重層、および小胞が挙げられる。リポソームのような小胞は、その特異性およびそれが付与する作用期間が原因で、薬物送達の観点から、大きな興味を引き付けている。本発明において使用される場合、用語「リポソーム」は、球状二重層（単数もしくは複数）に配置された両親媒性脂質から構成された、小胞を意味する。

【０２６４】

リポソームは、親油性物質から形成される膜と水性内部とを有する、単膜小胞もしくは多膜小胞である。その水性部分は、送達されるべき組成物を含む。カチオン性リポソームは、細胞壁に融合し得る利点を有する。非カチオン性リポソームは、細胞壁と有効に融合し得ないが、インビボでマクロファージにより取り込まれる。

【０２６５】

インタクトな哺乳動物皮膚を横切るために、脂質小胞は、各々５０ｎｍ未満の直径を有する一連の微細な孔を、適切な経皮勾配の影響下で通り抜けなければならない。従って、高度に変形可能でありそしてこのような微細な孔を通り抜けることができる、リポソームを使用することが望ましい。

【０２６６】

リポソームのさらなる利点としては、天然のリン脂質から得られるリポソームは、生体適合性でありそして生分解性であること；リポソームは、広範な水溶性薬物および脂溶性薬物を取り込み得ること；リポソームは、代謝および分解からその内部区画中にカプセル化された薬物を保護し得ることが挙げられる（Ｒｏｓｏｆｆ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｄｏｓａｇｅ　Ｆｏｒｍｓ，Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，ＲｉｅｇｅｒおよびＢａｎｋｅｒ（編），Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，第1巻，２４５頁（１９８８））。リポソーム処方物の調製において重要な考慮点は、脂質表面の電荷、小胞の大きさ、およびリポソームの水性容積である。

【０２６７】

リポソームは、作用部位へと活性成分を転移および送達するために有用である。リポソームの膜は生体膜と構造的に類似するので、リポソームが組織に適用さ

れる場合、そのリポソームは、細胞膜と合併し始める。リポソームと細胞の合併が進行すると、リポソーム内容物が、細胞中へと移り、そこで活性因子が作用し得る。

【０２６８】

リポソーム処方物は、多くの薬物についての送達様式として広範な調査の焦点であった。局所投与について、リポソームが他の処方物を越えるいくつかの利点を示す証拠が増加している。このような利点としては、投与される薬物の高い全身吸収に関する副作用の低減、所望の標的での投与される薬物の蓄積の増加、ならびに広範な種類の薬物（親水性および疎水性の両方）を皮膚に投与する能力が挙げられる。

【０２６９】

いくつかの報告は、皮膚へ高分子量ＤＮＡを含む因子を送達するリポソームの能力を詳述している。鎮痛剤、抗体、ホルモンおよび高分子量ＤＮＡを含む化合物が、皮膚に投与されている。適用の大多数は、上皮の標的化を生じた。

【０２７０】

リポソームは、２つの広い種類に分かれる。カチオン性リポソームは、負に荷電したＤＮＡ分子と相互作用して安定な複合体を形成する、正に荷電したリポソームである。正に荷電したＤＮＡ／リポソーム複合体は、負に荷電した細胞表面に結合し、そしてエンドソーム内にインターナライズされる。エンドソーム内の酸性ｐＨに起因して、そのリポソームは、破裂し、細胞の細胞質中にその内容物を放出する（Ｗａｎｇら，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，１４７：９８０－９８５（１９８７））。

【０２７１】

ｐＨ感受性であるかもしくは負に荷電したリポソームは、ＤＮＡと複合体を形成せずにＤＮＡを捕捉する。ＤＮＡと脂質の両方が同じように荷電しているので、複合体形成ではなく反発が生じる。それにも関わらず、いくらかのＤＮＡは、これらのリポソームの水性内部に捕捉される。ｐＨ感受性リポソームは、チミジンキナーゼ遺伝子をコードするＤＮＡを培養中の細胞単層に送達するために使用されている。外因性遺伝子の発現が、標的細胞において検出された（Ｚｈｏｕら

，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，１９：２６９－２７４（１９９２））。

【０２７２】

リポソーム組成物の１つの主要な型は、天然由来のホスファチジルコリン以外のリン脂質である。天然のリポソーム組成物は、例えば、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）もしくはジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）から形成され得る。アニオン性リポソーム組成物は、一般に、ジミリストリルホスファチジルグリセロールから形成されるが、アニオン性融合性（ｆｕｓｏｇｅｎｉｃ）組成物は、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＥ）から主に形成される。リポソーム組成物の別の型は、ホスファチジルコリン（ＰＣ）（例えば、ダイズＰＣおよびタマゴＰＣ）から形成される。別の型は、リン脂質および／またはホスファチジルコリンおよび／またはコレステロールの混合物から形成される。

【０２７３】

いくつかの研究は、皮膚へのリポソーム薬物処方物の局所送達を評価している。インターフェロンを含むリポソームをモルモットの皮膚へと適用すると、皮膚ヘルペス潰瘍の減少を生じたが、他の手段を介して（例えば、溶液としてかもしくはエマルジョンとして）のインターフェロンの送達は、効果的でなかった（Ｗｅｉｎｅｒら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，２：４０５－４１０（１９９２））。さらに、さららなる研究が、水性の系を使用してインターフェロンを投与することに対するリポソーム処方物の一部として投与されるインタフェロンの効力を試験し、そしてそのリポソーム処方物が水性投与より優れていることを結論付けた（ｄｕ Ｐｌｅｓｓｉｓら，Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １８：２５９－２６５（１９９２））。

【０２７４】

非イオン性リポソーム系もまた、非イオン性界面活性剤およびコレステロールを含む特定の系において皮膚に薬物を送達することにおけるその有用性を決定するために試験された。Ｎｏｖａｓｏｍ ＴＭ１（グリセリルジラウレート／コレステロール／ポリオキシエチレン－１０－ステアリルエーテル）およびＮｏｖａ

ｓｏｍｅ　ＴＭ　ＩＩ（グリセリルジステアレート／コレステロール／ポリオキシエチレン－１０－ステアリルエーテル）を含む非イオン性リポソーム処方物が、シクロスポリン－Ａをマウス皮膚の真皮に送達するために使用された。結果は、このような非イオン性リポソーム系が、皮膚の異なる層にシクロスポリン－Ａを堆積するのを促進するのに効果的であったことを示した。

【０２７５】

リポソームはまた、「立体的に安定化された」リポソームを含み、これは、本明細書中で使用される場合、リポソームに組み込まれた場合にそれを欠くリポソームと比較して増加した循環寿命を生じる、１つ以上の特定の脂質を含むリポソームをいう。立体的に安定化されたリポソームの例は、リポソームの小胞形成脂質部分の一部が、（Ａ）１つ以上の糖脂質（例えば、モノシアロガングリオシドＧ［Ｍ１］）を含むか、または（Ｂ）１つ以上の親水性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）部分）で誘導体化されているリポソームである。いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、少なくとも、ガングリオシド、スフィンゴミエリンもしくはＰＥＧ誘導体化脂質を含む、立体的に安定化されたリポソームについて、これらの立体的に安定化されたリポソームの循環半減期の増加が、細網内皮系（ＲＥＳ）の細胞中への取り込みの減少に由来することが、当該分野で考えられている（Ａｌｌｅｎら，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，２２３：４２（１９８７）；Wuら，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５３：３７６５（１９９３））。

【０２７６】

１つ以上の糖脂質を含む種々のリポソームが、当該分野で公知である。Ｐａｐａｈａｄｊｏｐｏｕｌｏｓら（Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．５０７：６４（１９８７））は、モノシアロガングリオシドＧ［Ｍ１］、ガラクトセレブロシドサルフェートおよびホスファチジルイノシトールがリポソームの血液半減期を改善する能力を報告した。これらの知見は、Ｇａｂｉｚｏｎら（ＰＮＡＳ　８５：　６９４９　（１９８８））により説明された。米国特許第４，８３７，０２８号およびWO　８８／０４９２４は、（１）スフィンゴミエリンを含むリポソーム、および（２）ガングリオシドＧ［Ｍ１］もしくはガラクトセレブロシド

サルフェートエステルを含むリポソームを開示する。米国特許第５，５４３，１５２号は、スフィンゴミエリンを含むリポソームを開示する。１，２－ｓｎ－ジミリストイルホスファチジルコリンを含むリポソームが、ＷＯ　９７／１３４９９に開示される。これらの分子の合成バージョンが好ましい。

【０２７７】

１つ以上の親水性ポリマーで誘導体化した脂質を含む多くのリポソーム、その調製方法が、当該分野で公知である。Ｓｕｎａｍｏｔｏら（Ｂｕｌｌ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｊｐｎ．５３：２７７８（１９８０））は、ＰＥＧ部分を含む非イオン性界面活性剤である２Ｃ１２１５Ｇを含むリポソームを記載した。Ｉｌｌｕｍら（ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．１６７：７９（１９８４））は、ポリマー性グリコールを含むポリスチレン粒子の親水性コーティングが、血液半減期の有意な増加を生じることを記した。ポリアルキレングリコール（例えば、ＰＥＧ）をカルボキシル基に結合することにより改変された合成リン脂質が、Ｓｅａｒｓ（米国特許第４，４２６，３３０号および同第４，５３４，８９９号）により記載された。Ｋｌｉｂａｎｏｖら（ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．２６８：２３５（１９９０））は、ＰＥＧもしくはＰＥＧステアレートで誘導体化されたホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）を含むリポソームが、血液循環半減期の有意な増加を有すること示す実験を記載した。Ｂｌｕｍｅら（Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ　ｅｔ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ　Ａｃｔａ　１０２９：９１（１９９０））は、このような知見を、他のＰＥＧ誘導体化リン脂質（例えば、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）とＰＥＧとの組み合わせから形成されるＤＳＰＥ－ＰＥＧ）まで広げた。その外部表面上に共有結合したＰＥＧ部分を有するリポソームが、Ｆｉｓｃｈｅｒに対する欧州特許ＥＰ　０　４４５　１３１　Ｂ１およびＷＯ　９０／０４３８４において記載される。ＰＥＧで誘導体化されたＰＥを１～２０モルパーセント含むリポソーム組成物およびその使用法が、Ｗｏｏｄｌｅら（米国特許第５，０１３，５５６号および同第５，３５６，６３３号）ならびにＭａｒｔｉｎら（米国特許第５，２１３，８０４および欧州特許ＥＰ　０　４９６　８１３　Ｂ１）において記載される。他の多数の脂質－ポリマー結合体を含むリポソームが、ＷＯ　９１／０５５４５および米国特許第５，２２５，２１２号

（両方ともＭａｒｔｉｎら）およびWO　９４／２００７３（Ｚａｌｉｐｓｋｙら）において記載される。ＰＥＧ改変セラミド脂質を含むリポソームが、WO　９６／１０３９１（Ｃｈｏｉら）に記載される。米国特許第５，５４０，９３５号（Ｍｉｙａｚａｋｉら）および同第５，５５６，９４８号（Ｔａｇａｗａら）は、その表面上の機能的部分でさらに誘導体化され得るＰＥＧ含有リポソームを記載する。

【０２７８】

核酸を含む限定数のリポソームが、当該分野で公知である。WO　９６／４００６２（Ｔｈｉｅｒｒｙら）は、リポソーム中に高分子量核酸をカプセル化するための方法を記載する。米国特許第５，２６４，２２１（Ｔａｇａｗａら）は、タンパク質が結合したリポソームを開示し、そしてそのようなリポソームの内容物がアンチセンスＲＮＡを含み得ることを主張する。米国特許第５，６６５，７１０号（Ｒａｈｍａｎら）は、リポソーム中にオリゴデオキシヌクレオチドをカプセル化する特定の方法を記載する。WO　９７／０４７８７（Ｌｏｖｅら）は、ｒｅｆ遺伝子に標的化されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むリポソームを開示する。

【０２７９】

（トランスフェロソーム）　トランスフェロソームは、なお別の型のリポソームであり、そして薬物送達ビヒクルのための魅力的な候補である、高度に変形可能な脂質凝集物である。トランスフェロソームは、高度に変形可能であり、その小滴よりも小さい孔を通って容易に浸透し得る、脂質小滴として記載され得る。トランスフェロソームは、それが使用される環境に適合可能であり、例えば、それらは自己最適化し（皮膚の孔の形状に適応する）、自己修復し、しばしば断片化せずにその標的に到達し、そしてしばしば自己ローディングする（ｓｅｌｆ－ｌｏａｄｉｎｇ）。トランスフェロソームを生成するために、標準的リポソーム組成物に、表面縁（ｅｄｇｅ）アクチベーターを添加することが可能である。トランスフェロソームは、皮膚に血清アルブミンを送達するために使用された。血清アルブミンのトランスフェロソーム媒介送達は、血清アルブミンを含む溶液の皮下注射と同じ程度効果的であることが示された。

【０２８０】

界面活性剤は、エマルジョン（マイクロエマルジョンを含む）およびリポソームのような処方物における広範な適用が見いだされる。多くの異なる型の界面活性剤（天然および合成の両方）の特性を分類および評価の最も一般的方法は、親水性／疎水性バランス（ＨＬＢ）の使用による。親水基（「ヘッド」としても公知）の性質は、処方物において使用される異なる界面活性剤を分類するための最も有用な手段を提供する（Ｒｉｅｇｅｒ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．ｐ．２８５（１９８８））。

【０２８１】

界面活性剤分子がイオン化されていない場合、それは、非イオン性界面活性剤と分類される。非イオン性界面活性剤は、薬学的製品および美容外科学的製品における広範な適用が見出され、そして広範な範囲のｐＨ値にわたって使用可能である。一般に、そのＨＬＢ値は、その構造に依存して、２～約１８の範囲である。非イオン性界面活性剤としては、非イオン性エステル（例えば、エチレングリコールエステル、ポリエチレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、スクロースエステル、およびエトキシル化エステルが挙げられる。非イオン性アルカノールアミドおよびエステル（例えば、脂肪酸アルコールエトキシレート、プロポキシル化アルコール、およびエトキシル化／プロポキシル化ブロックポリマー）もまた、この種類に含まれる。ポリオキシエチレン界面活性剤は、非イオン性界面活性剤の種類の最も一般的メンバーである。

【０２８２】

界面活性剤分子が、水に溶解もしくは分散された場合に負電荷を有する場合、その界面活性剤は、アニオン性として分類される。アニオン性界面活性剤としては、石けんのようなカルボキシレート、アシルラクチレート、アミノ酸のアシルアミド、硫酸のエステル（例えば、硫酸アルキルおよびエトキシル化硫酸アルキル）、スルホネート（例えば、アルキルベンゼンスルホン酸、アシルイセチオネート、アシルタウレートおよびスルホスクシネート）ならびにホスホネートが挙

げられる。アニオン性界面活性剤の種類の最も重要なメンバーは、硫酸アルキルおよび石けんである。

【０２８３】

界面活性剤分子が水中に溶解もしくは分散した場合に正電荷を有する場合、その界面活性剤は、カチオン性として分類される。カチオン性界面活性剤としては、四塩化アンモニウム塩およびエトキシル化アミンが挙げられる。四塩化アンモニウム塩は、この種類で最も使用されるメンバーである。

【０２８４】

界面活性剤分子が正電荷もしくは負電荷のいずれかを有する能力を有する場合、その界面活性剤は、両性として分類される。両性界面活性剤としては、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、Ｎ－アルキルベタインおよびホスファチドが挙げられる。

【０２８５】

薬物製品、処方物およびエマルジョンにおける界面活性剤の使用が概説されている（Ｒｉｅｇｅｒ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，ｐ．２８５（１９８８））。

【０２８６】

（浸透増強剤）　１つの実施形態において、本発明は、動物の皮膚に核酸（特に、オリゴヌクレオチド）を効率的に送達することをもたらす、種々の浸透増強剤を使用する。ほとんどの薬物は、イオン化形態および非イオン化形態の両方で溶液中に存在する。しかし、通常は、脂質可溶性薬物もしくは親油性薬物のみが、細胞膜を容易に横切り得る。非親油性薬物でさえ、横切るべき膜が浸透増強剤で処理された場合は細胞膜を横切り得ることが、発見された。細胞膜を横切る非親油性薬物の拡散を補助することに加え、浸透増強剤はまた、親油性薬物の浸透性も増強する。

【０２８７】

浸透増強剤は、５つの広い分類（すなわち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、および非キレート非界面活性剤）の１つに属するように分類され得

る。（Ｌｅｅら, Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒ．Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ、ｐ．９２（１９９１））。上記の種類の浸透増強剤の各々が、下記でより詳細に記載される。

【０２８８】

界面活性剤：本発明に関連して、界面活性剤（もしくは「界面活性薬剤」）は、水溶液中に溶解した場合に、その溶液の表面張力またはその水溶液と別の脂質との間の界面張力を減少し、その結果、粘膜を通ってのオリゴヌクレオチドの吸収が増強する、化学的実体である。胆汁酸塩および脂肪酸に加え、これらの浸透増強剤としては、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン－９－ラウリルエステルおよびポリオキシエチレン－２０－セチルエステル（Ｌｅｅら, Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒ．Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ, ｐ．９２（１９９１））；ならびに過フルオロ化合物エマルジョン（例えば、ＦＣ－４３）（Ｔａｋａｈａｓｈｉら, Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４０：２５２（１９８８））が挙げられる。

【０２８９】

脂肪酸：浸透増強剤として作用する種々の脂肪酸およびその誘導体としては、例えば、以下が挙げられる：オレイン酸、ラウリン酸、カプリン酸（ｎ－デカン酸）、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、モノオレイン（１－モノオレオイル－ｒａｃ－グリセロール）、ジラウリン、カプリル酸、アラキドン酸、グリセロール１－モノカプレート、１－ドデシルアザシクロヘプタン－２－オン、アシルカルニチン、アシルコリン、そのＣ［１－１０］－アルキルエステル（例えば、メチル、イソプロピル、およびｔ－ブチル）、ならびのそのモノグリセリドおよびジグリセリド（すなわち、オレエート、ラウレート、カプレート、ミリステート、パルミテート、ステアレート、リノレエートなど）（Ｌｅｅら, Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒ．Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ ｐ．９２（１９９１）；Ｍｕｒａｎｉｓｈｉ, Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒ．Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ ７：１－３３（１９９０）；Ｅｌ Ｈａｒｉｒｉら, Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４４：６５１－６５４（１９９２））。

【０２９０】

胆汁酸塩：胆汁の生理学的役割としては、脂質および脂溶性ビタミンの分散および吸収の促進が挙げられる（Ｂｒｕｎｔｏｎ，Ｃｈａｐｔｅｒ　３８：Ｇｏｏｄｍａｎ&Ｇｉｌｍａｎ’ｓ　Ｔｈｅ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｂａｓｉｓ　ｏｆ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，９ｔｈ版．，Ｈａｒｄｍａｎら編，ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　ｐｐ．９３４－９３５（１９９６））。種々の天然の胆汁酸塩およびその合成誘導体が、浸透増強剤として作用する。従って、用語「胆汁酸塩」は、天然に存在する胆汁の成分のいずれかならびにその合成誘導体のいずれかを含む。本発明の胆汁酸塩としては、例えば、コール酸（またはその薬学的に受容可能なナトリウム塩、コール酸ナトリウム）、デヒドロコール酸（デヒドロコール酸ナトリウム）、デオキシコール酸（デオキシコール酸ナトリウム）、グルコール酸（グルコール酸ナトリウム）、グリコール酸酸（グリコール酸ナトリウム）、グリコデオキシコール酸（グリコデオキシコール酸ナトリウム）、タウロコール酸（タウロコール酸ナトリウム）、タウロデオキシコール酸（タウロデオキシコール酸ナトリウム）、ケノデオキシコール酸（ケノデオキシコール酸ナトリウム）、ウルソデオキシコール酸（ＵＤＣＡ）、タウロ－２４，２５－ジヒドロフシジン酸ナトリウム（ＳＴＤＨＦ）、グリコジヒドロフシジン酸ナトリウムおよびポリオキシエチレン－９－ラウリルエステル（ＰＯＥ）（Ｌｅｅら，Ｃｒｉｔｉｃａｌ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　ｉｎ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　Ｄｒｕｇ　Ｃａｒｒｉｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，頁９２（１９９１）；Ｓｗｉｎｙａｒｄ，Ｃｈａｐｔｅｒ　３９：Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ版．，Ｇｅｎｎａｒｏ編，Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，頁７８２－７８３（１９９０）；Ｍｕｒａｎｉｓｈｉ，Ｃｒｉｔｉｃａｌ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　ｉｎ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　Ｄｒｕｇ　Ｃａｒｒｉｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，７：１－３３（１９９０）；Ｙａｍａｍｏｔｏら，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．２６３：２５（１９９２）；Ｙａｍａｓｈｉｔａら，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．７９：５７９－５８３（１９９０））。

【０２９１】

キレート剤：本発明と関連して使用される場合、キレート剤とは、金属イオンと錯体を形成することによって溶液からその金属イオンを除去する化合物として定義され、その結果、粘膜を通るオリゴヌクレオチドの吸収が増強される。本発明における透過増強剤としてのそれらの使用に関して、キレート剤は、ＤＮａｓｅインヒビターとしても作用する、追加の利点を有する。なぜなら、多くの特徴付けされたＤＮＡヌクレアーゼは、触媒に二価金属イオンを必要とし、従って、キレート剤によって阻害されるからである（Ｊａｒｒｅｔｔ，Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．６１８：３１５－３３９（１９９３））。本発明のキレート剤として、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（ＥＤＴＡ）、クエン酸、サリチラート（例えば、サリチル酸ナトリウム、５－メトキシサリチラートおよびホモバニラート）、コラーゲンのＮ－アシル誘導体、β－ジケトンのラウレス－９（ｌａｕｒｅｔｈ－９）およびＮ－アミノアシル誘導体（エナミン）（Ｌｅｅら、Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ、９２頁（１９９１）；Ｍｕｒａｎｉｓｈｉ、Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ、７：１－３３（１９９０）；Ｂｕｕｒら、Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌ．１４：４３－５１（１９９０））が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２９２】

非キレート非界面活性剤：本明細書中で使用される場合、非キレート非界面活性剤の透過増強化合物は、キレート剤としても界面活性剤としても有意な活性を示さないが、にもかかわらず、消化系粘膜を通るオリゴヌクレオチドの吸収を増強する化合物として定義され得る（Ｍｕｒａｎｉｓｈｉ、Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ、７：１－３３（１９９０））。このクラスの透過増強剤としては、例えば、不飽和環状尿素、1－アルキル－アルカノン誘導体および１－アルケニルアザシクロ－アルカノン誘導体（Ｌｅｅら、Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ、９２頁（１９９１））；ならびに非ステロイド性抗炎症剤（例えば、ジク

ロフェナクナトリウム、インドメタシンおよびフェニルブタゾン）（Ｙａｍａｓｈｉｔａら、Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．３９：６２１－６２６（１９８７））が挙げられる。

【０２９３】

細胞レベルでオリゴヌクレオチドの取り込みを増強する薬剤もまた、本発明の薬学的組成物および他の組成物に添加され得る。例えば、カチオン性脂質（例えば、リポフェクチン（Ｊｕｎｉｃｈｉら、米国特許第５，７０５，１８８号））カチオン性グリセロール誘導体、およびポリカチオン性分子（例えば、ポリリジン（Ｌｏｌｌｏら、ＰＣＴ出願ＷＯ９７／３０７３１））もまた、オリゴヌクレオチドの細胞の取り込みを増強することが公知である。

【０２９４】

他の薬剤が、投与された核酸の透過を増強するために利用され得、これらには、グリコール（例えば、エチレングリコールおよびプロピレングリコール）、ピロール（例えば、２－ピロール）、アゾン、およびテルペン（例えば、リモネンおよびメントン）が挙げられる。

【０２９５】

（キャリア）　本発明の特定の組成物はまた、処方物中にキャリア化合物を含む。本明細書中で使用される場合、「キャリア化合物」または「キャリア」とは、核酸、または不活性（すなわち、それ自体で生物学的活性を保持しない）であるが、例えば、生物学的に活性な核酸の分解または循環からの核酸の排除の促進による、生物学的活性を有する核酸のバイオアベイラビリティを減少するインビボプロセスによって認識される、核酸のアナログを言及し得る。核酸およびキャリア化合物の同時投与（代表的には、後者の物質が過剰である）は、肝臓、腎臓または他の循環外貯蔵所において回収される核酸の量の実質的な減少を生じ得、これは、おそらく、共通のレセプターに対するキャリア化合物と核酸との間の競合に起因する。例えば、肝組織における部分的なホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの回収は、ポリイノシン酸、硫酸デキストラン、ポリシチジル酸または４－アセトアミド－４’イソチオシアノ－スチルベン－２，２’－ジスルホン酸と同時に投与された場合に、減少され得る（Ｍｉｙａｏら、Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ

Ｒｅｓ．Ｄｅｖ．５：１１５－１２１（１９９５）；Ｔａｋａｋｕｒａら、Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　＆　Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｖ．６：１７７－１８３（１９９６））。

【０２９６】

（賦形剤）　キャリア化合物とは対照的に、「薬学的キャリア」または「賦形剤」は、１以上の核酸を動物に送達するための、薬学的に受容可能な溶媒、懸濁剤または任意の他の薬理学的に不活性なビヒクルである。賦形剤は、液体または固体であり得、そして、所定の薬学的組成物の核酸および他の成分と組み合わせた場合に、所望のバルク、コンシステンシーなどを提供するように、細心の計画した投与様式と共に、選択される。代表的な薬学的キャリアとしては、結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）；充填剤（例えば、ラクトースおよび他の糖、微結晶セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレートまたはリン酸水素カルシウムなど）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、ステアリン酸金属、硬化植物油、トウモロコシデンプン、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど）；崩壊剤（例えば、デンプン、グリコール酸ナトリウムデンプンなど）；および湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなど）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２９７】

核酸と有害には反応しない、非経口投与に適切な薬学的に受容可能な有機賦形剤または無機賦形剤もまた、本発明の組成物を処方するために使用され得る。適切な薬学的に受容可能なキャリアとしては、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２９８】

核酸の局所投与のための処方物としては、滅菌および非滅菌の、水溶液、一般的な溶媒（例えば、アルコール）中の非水性溶液、または液体または固体のオイ

ル基剤中の核酸の溶液が挙げられ得る。これらの溶液はまた、緩衝剤、希釈剤および他の適切な添加剤を含み得る。核酸と有害には反応しない、非経口投与に適切な薬学的に受容可能な有機賦形剤または無機賦形剤が、使用され得る。

【０２９９】

適切な薬学的に受容可能な賦形剤としては、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３００】

（他の成分）　本発明のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗遺伝子組成物は、薬学的組成物に従来的に見い出される他の補助成分を、それらの当該分野で確立された使用レベルで、さらに含み得る。従って、例えば、組成物は、さらなる適合性の薬学的に活性な材料（例えば、止痒剤、収斂剤、局所麻酔剤または抗炎症剤のような）を含み得るか、または、本発明の組成物の種々の投薬形態を物理的に処方する際に有用なさらなる材料（例えば、色素、矯味矯臭剤、保存剤、酸化防止剤、乳白剤、濃化剤および安定剤）を含み得る。しかし、このような材料は、添加される場合、本発明の組成物の成分の生物学的活性を、過度に干渉するべきではない。これらの処方物は、滅菌され得、そして所望の場合に、処方物の核酸と有害には相互作用しない補助剤（例えば、潤滑剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧を調整するための塩、緩衝剤、着色剤、矯味矯臭剤および／または芳香物質など）と混合され得る。

【０３０１】

水性懸濁液は、この懸濁液の粘性を増加する物質（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび／またはデキストラン）を含み得る。懸濁液はまた、安定剤を含み得る。

【０３０２】

（投与）　治療組成物の処方およびそれらのその後の投与は、当業者の範囲内にあると考えられる。投薬は、処置される疾患状態の重篤度および応答性に依存

し、処置過程は、数日間から数ヶ月間、あるいは治癒がもたらされるかまたは疾患状態の軽減が達成されるまで継続する。最適な投薬スケジュールは、患者の身体における薬物蓄積の測定から算出され得る。当業者は、最適な投薬量、投薬方法および反復率を容易に決定し得る。最適な投薬量は、個々のオリゴヌクレオチドの相対効力に依存して変化し得、そして一般に、インビトロおよびインビボ動物モデルにおいて効果的であることが見い出されるＥＣ５０に基づいて推測され得る。一般に、投薬量は、０．０１μｇ／ｋｇ体重～１００ｇ／ｋｇ体重であり、１日、１週間、１ヶ月または１年に１回以上、あるいは２～２０年毎に１回でさえ、与えられ得る。好ましい投薬量は、０．００５～３５ｍｇ／ｋｇ体重であり、さらにより好ましくは、０．０５～２０ｍｇ／ｋｇ体重、そしてなおより好ましくは、０．０１～１０ｍｇ／ｋｇ体重である。首尾よい処置の後、患者に、その疾患状態の再発を予防するための維持療法を受けさせることが望ましくあり得る。ここでは、オリゴヌクレオチドが、維持量で投与され、これは、１日に１回以上～２０年毎に１回で、０．０１μｇ／ｋｇ体重～１００ｇ／ｋｇ体重の範囲である。

【０３０３】

（Ｇ．薬物候補のスクリーニング）　本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ペプチドを模倣する化合物（アゴニスト）またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの効果を妨げる化合物（アンタゴニスト）を同定するための、化合物をスクリーニングする方法を包含する。アンタゴニスト薬物候補についてのスクリーニングアッセイは、本明細書中に同定された遺伝子によってコードされるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドと結合または複合体化する化合物、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードする遺伝子およびｍＲＮＡと結合または複合体化する化合物、あるいはさもなければ、他の細胞タンパ

ク質とのこれらのコードされるポリペプチドの相互作用を干渉する化合物を、同定するために設計される。これらのスクリーニングアッセイには、化学ライブラリーの高スループットスクリーニングまたは超高スループットスクリーニングに適するアッセイが挙げられ、これらのアッセイは、化学ライブラリーを、抗遺伝子（アンチセンスまたはセンス）および小分子薬物候補の同定に特に適切なものにする。

【０３０４】

ポリペプチド標的化アッセイは、種々の形式で行われ得、これらには、タンパク質－タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ、標的核酸結合アッセイ、および細胞ベースのアッセイが挙げられ、これらは、当該分野で特徴付けられている。薬物候補に、本明細書中に同定された核酸によってコードされるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドを、これら２つの成分が相互作用するのを可能にするに十分な条件下でかつ十分な時間の間、接触させる。

【０３０５】

結合アッセイにおいて、この相互作用は、結合であり、そして形成された複合体が、この反応混合物において単離または検出され得る。特定の実施形態において、本明細書中に同定された遺伝子によってコードされるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、あるいは薬物候補を、固相（例えば、マイクロタイタープレート）上に共有結合または非共有結合を介して固定する。非共有結合は、一般に、この固体表面を、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの溶液を用いてコートし、そして乾燥させることによって達成される。あるいは、固定されるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドに特異的な、固定された抗体（例えば、モノクローナル抗体）を使用して、このポリペプチドを固体表面に固着させ得る。この

アッセイは、この固定していない成分（これは、検出可能な標識で標識され得る）を、この固定した成分（例えば、この固着させた成分を含有するコートした表面）に添加することによって行われる。反応が完了すると、反応されなかった成分を除去し（例えば、洗浄によって）、そしてその固体表面上の固着した複合体を検出する。その元々固定されていない成分が、検出可能な標識を保持する場合、表面上に固定された標識の検出は、複合体化が生じたことを示す。その元々固定されていない成分が、標識を保持しない場合、複合体化は、例えば、その固定された複合体を特異的に結合する、標識した抗体を使用することによって検出され得る。

【０３０６】

候補化合物が、本明細書中に同定された遺伝子によってコードされる特定のＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチドと相互作用するが、これらに結合しない場合、このポリペプチドとの相互作用を、タンパク質－タンパク質相互作用を検出するための周知の方法によってアッセイし得る。このようなアッセイとしては、従来のアプローチ（例えば、架橋形成、共免疫沈降、および勾配またはクロマトグラフィーカラムによる共精製）が挙げられる。さらに、タンパク質－タンパク質相互作用は、ＣｈｅｖｒａｙおよびＮａｔｈａｎｓ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：５７８９－５７９３（１９９１）によって開示されるような、Ｆｉｅｌｄｓおよび共同研究者（ＦｉｅｌｄｓおよびＳｏｎｇ、Ｎａｔｕｒｅ（Ｌｏｎｄｏｎ）、３４０：２４５－２４６（１９８９）；Ｃｈｉｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：９５７８－９５８２（１９９１））によって記載される、酵母ベースの遺伝子系を使用してモニターされ得る。多くの転写活性化因子（例えば、酵母のＧＡＬ４）は、２つの物理的に異なるモジュラードメインから構成され、１つは、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。上記の刊行物に記載されている酵母発現系（一般には、「ツーハイブリッドシステム」と呼ばれる）は、この特性を利用し、そして２つのハイブリッドタンパク質を使用する。そのうちの１つにおいては、標的タンパク質が、ＧＡＬ

４のＤＮＡ結合ドメインに融合され、そしてもう一方においては、候補活性化タンパク質が、活性化ドメインに融合されている。ＧＡＬ４活性化プロモーターの制御下にあるＧＡＬ１－ｌａｃＺレポーター遺伝子の発現は、タンパク質－タンパク質相互作用を介するＧＡＬ－４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が、β－ガラクトシダーゼに対する色素生成性基質を用いて検出される。このツーハイブリッド技術を使用して２つの特異的なタンパク質間でのタンパク質－タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（ＭＡＴＣＨＭＡＫＥＲ™）は、Ｃｌｏｎｔｅｃｈから市販されている。このシステムはまた、特異的なタンパク質の相互作用に関与しているタンパク質ドメインをマップするため、およびこれらの相互作用に重要なアミノ酸残基を特定するために拡大され得る。

【０３０７】

本明細書中で同定されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする遺伝子と他の細胞内または細胞外成分との相互作用を干渉する化合物は、以下のように試験され得る：通常は、遺伝子産物と細胞内または細胞外成分の相互作用および結合を可能にする条件下でかつ時間の間、この２つの産物を含有する反応混合物を調製する。結合を阻害する候補化合物の能力を試験するために、反応は、試験化合物の非存在下および存在下で行われる。さらに、プラシーボを、第３の反応混合物に加え、ポジティブコントロールとして使用し得る。混合物中に存在する試験化合物と細胞内または細胞外成分との間の結合（複合体の形成）は、本明細書中の上記のようにモニターされる。試験化合物を含有する反応混合物中ではなく、コントロール反応物中での複合体の形成は、この試験化合物が、試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を干渉することを示す。特に有用なアッセイ系は、チップのようなマイクロアレイアッセイであり、このチップ上で、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２遺伝子配列に基づく、核酸フラグメントライブラリーが合成される。

【０３０８】

本明細書中に記載される任意のポリヌクレオチド配列に由来するオリゴヌクレオチドまたはより長いフラグメントが、マイクロアレイにおける標的として使用され得る。このマイクロアレイを使用して、多くの遺伝子の発現レベルを同時にモニターし得（転写物画像を生成し得る）、遺伝子改変体、変異体および多型を同定し得、効果的な核酸結合分子（例えば、アンチセンス分子、調節タンパク質、リボソームまたはポリメラーゼ）を同定し得る。この情報は、遺伝子の機能を決定するため、疾患の遺伝的根拠を理解するため、疾患を診断するため、治療分子（例えば、アンチセンス）を同定するため、および治療剤を開発しそしてその活性をモニターするため、に使用され得る。

【０３０９】

１つの実施形態において、マイクロアレイは、当該分野で公知の方法（例えば、ＷＯ９５／１１９９５（Ｃｈｅｅら）、Ｌｏｃｋｈａｒｔ，Ｄ．Ｊ．ら（Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１４：１６７５－１６８０（１９９６））、およびＳｃｈｅｎａ，Ｍ．ら（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９３：１０６１４－１０６１９（１９９６））またはＷＯ９９／２４４６３に記載される方法）に従って、調製および使用され得る。

【０３１０】

マイクロアレイは、好ましくは、固体支持体に固定された多くの固有の一本鎖核酸配列（通常は、合成アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはｃＤＮＡのフラグメント）から構成される。これらのオリゴヌクレオチドは、好ましくは、約５～６０ヌクレオチド長、より好ましくは、約８～３０ヌクレオチド長、さらにより好ましくは、約１５～３０ヌクレオチド長、さらにより好ましくは、１５～２５ヌクレオチド長、そして最も好ましくは、約２０～２５ヌクレオチド長である。特定の型のマイクロアレイについて、ほんの７～１０ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドの使用が好ましくあり得る。マイクロアレイは、既知の５’（または３’）配列または非翻訳化領域を含むオリゴヌクレオチド、全長配列を含む連続的なオリゴヌクレオチド、または非翻訳化領域を含む配列の長さにわたる特定の領域から選択された固有のオリゴヌクレオチドを含み得る。マイクロアレイにおいて使用されるポリヌクレオチドは、その配列の少なくともフラグメントが既

知である、目的の遺伝子（好ましくは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２遺伝子）に特異的なオリゴヌクレオチドであり得るか、または特定の細胞型または組織型あるいは正常状態、発症状態または疾患状態に共通する、１以上の未同定ｃＤＮＡに特異的なオリゴヌクレオチドであり得る。特定の状況下では、マイクロアレイ上でオリゴヌクレオチドの対を使用することが適切である。これらの対は、１ヌクレオチド（好ましくは、この配列の中央に位置する）を除いて同一である。（１個によってミスマッチである）対にある第２のオリゴヌクレオチドは、コントロールとして作用する。オリゴヌクレオチド対の数は、２～１，０００，０００の範囲であり得る。マイクロアレイはまた、ＤＮＡ二重鎖形態のフラグメントを含み得、これは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ゲノムＤＮＡに結合する分子を同定するために特に有用である。

【０３１１】

マイクロアレイのための既知の配列に対するオリゴヌクレオチドを生成するために、目的の遺伝子を、コンピューターアルゴリズムを使用して試験する。このアルゴリズムは、このヌクレオチド配列の５’末端またはより好ましくは３’末端で開始する。このアルゴリズムは、その遺伝子に対して固有であり、ハイブリダイゼーションに適切な範囲内のＧＣ含量を有し、そしてハイブリダイゼーションを干渉し得る推定二次構造を欠く、規定された長さのオリゴマーを同定する。

【０３１２】

１つの局面において、これらのオリゴヌクレオチドは、例えば、光指向型化学カップリング手順およびインクジェット適用装置（例えば、ＷＯ９５／２５１１６（Ｂａｌｄｅｓｃｈｗｅｉｌｅｒら）に記載のような）を使用することによって、基板表面上の指定の領域に合成される。基板は、紙、ナイロンまたは任意の他の型の膜、フィルター、チップ、ガラススライド、あるいは任意の他の適切な固体支持体であり得る。別の局面において、ドットプロットまたはスロットプロットに類似する「グリッド（ｇｒｉｄｄｅｄ）」アレイ（ＨＹＢＲＩＤＯＴ装置、ＧＩＢＣＯ／ＢＲＬ）を、真空系、熱、ＵＶ、機械的または化学的な結合手

順を使用して、基板の表面にｃＤＮＡフラグメントまたはオリゴヌクレオチドを整列または連結するために使用し得る。最も好ましい実施形態において、予め規定された異なる領域の各々は、その異なる領域の互いに物理的に離される。なお別の局面において、アレイは、自分の手で、または入手可能なデバイス、材料および機械（ＢＲＩＮＫＭＡＮＮマルチチャネルピペッターまたはロボット装置）を使用して、作製され得る。このようなアレイは、８、２４、９６、３８４、１５３６または６１４４個のオリゴヌクレオチド、または市販の装置の効率的な使用を導く２～１，０００，０００の任意の他の数のヌクレオチドを含み得る。１つの好ましい実施形態において、アレイは、その固体支持体の表面に結合された少なくとも１，０００個の異なるオリゴヌクレオチド、そしてより好ましくは、少なくとも１０，０００個の異なるオリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、好ましくは、リンカー基を介して、その固体支持体の第１の表面に結合される。予め規定された異なる領域におけるオリゴヌクレオチドは、少なくとも約２０％純粋であり、より好ましくは、少なくとも５０％純粋であり、さらにより好ましくは、８０％純粋であり、そして最も好ましくは、９０％純粋である。

【０３１３】

１つの実施形態では、このアレイは、少なくとも第１の表面を有する平面状の、非多孔性の固体支持体、およびこの固体支持体の第１の表面に、平方ｃｍあたり４００異なるオリゴヌクレオチドを超える密度で付着した、複数の異なるオリゴヌクレオチドを含み、ここで、この異なるオリゴヌクレオチドの各々が異なる予め規定された領域内の固体支持体の表面に付着し、異なる決定可能な配列を有し、そして少なくとも６ヌクレオチドの長さであり、上記で論議したような好適な長さをもち、ここで、この異なるオリゴヌクレオチドの少なくとも１つが、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２配列である。この実施形態において、各異なるオリゴヌクレオチドは、長さが約６～約２０ヌクレオチド、より好ましくは長さが少なくとも１０ヌクレオチド、そして最も好ましくは長さが少なくとも２０ヌクレオチドである。最も好ましい実施形態では、上記異なる予め規定された領域の各々は、この異なる領域の互いから物理的に分離されている

。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、リンカー基により固体支持体の第１の表面に付着している。異なる予め規定された領域にあるオリゴヌクレオチドは、少なくとも２０％純粋であり、より好ましくは少なくとも５０％純粋であり、なおより好ましくは少なくとも８０％純粋であり、そして最も好ましくは少なくとも９０％純粋である。

【０３１４】

マイクロアレイを用いる試料分析は、生物学的試料からポリヌクレオチドを抽出することによって実施され得る。この生物学的試料は、任意の身体体液（血液、尿、唾液、粘液質、胃液など）、培養細胞、生検試料、またはその他の組織調製物から得られる。試料から抽出されたポリヌクレオチドを用い、プローブとして、マイクロアレイ上の核酸に相補的である核酸配列を生成し得る。マイクロアレイがｃＤＮＡからなる場合、アンチセンスＲＮＡ（ａＲＮＡ）が適切なプローブである。従って、１つの局面では、ｍＲＮＡを用いてｃＤＮＡを生成し、これは次に、そして蛍光ヌクレオチドの存在下で、フラグメントまたはオリゴヌクレオチドａＲＮＡプローブを生成するために用いられる。これらの蛍光標識されたプローブをマイクロアレイとインキュベートし、その結果、プローブ配列がマイクロアレイのｃＤＮＡオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする。別の局面では、プローブとして用いられる核酸配列は、ハイブリダイゼーション技法の領域で周知である制限酵素、ＰＣＲ技法、およびＯＬＩＧＯＬＡＢＥＬＬＩＮＧ™またはＴＲＡＮＳＰＲＯＢＥ™キット（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）を用いて生成されたポリヌクレオチド、フラグメント、および相補的またはアンチセンス配列を含み得る。代替のマイクロアレイ実施形態では、オリゴヌクレオチド（好ましくはアンチセンス分子）が支持体上で採用され、そして標的ｃＤＮＡはアッセイの可溶性結合成分である。

【０３１５】

インキュベーション条件は、ハイブリダイゼーションが正確な相補的マッチでか、または種々の程度のより少ない相補性で生じるように調節される。ハイブリダイズしなかったプローブを除去した後、スキャナーを用いて蛍光のレベルおよびパターンを決定する。スキャンされたイメージは、マイクロアレイ上の各オリ

ゴヌクレオチド配列の相補性の程度および相対的豊富さを決定するために調査される。検出システムを用いて、すべての別個の配列について、ハイブリダイゼーションの不在、存在、および量を同時に測定し得る。このデータは、試料間の配列、変異、改変、または多形の大規模相関研究または機能分析のために用いられ得る（Ｈｅｌｌｅｒ、Ｒ．Ａ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９４：２１５０－５５（１９９７））。

【０３１６】

遺伝子マッピングには、遺伝子またはクローン化されたＤＮＡフラグメントを、ＤＮＡフラグメントの整列アレイにハイブリダイズさせ、そしてアレイに付与されたＤＮＡエレメントの同一性が、検出されるアレイの画素または画素のパターンにより明瞭に確立される。ゲノムの物理的マップを構築することでは、固定化されたクローン化ＤＮＡフラグメントのアレイを、その他のクローン化ＤＮＡフラグメントとハイブリダイズし、プローブ混合物中のクローン化フラグメントが重複し、そしてそれ故、アレイ上の固定化クローンに連続しているか否かを確立する。例えば、Ｍｅｉｅｒ－Ｅｗｅｒｔら（Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．３５（２－３）：１９１－２０３（１９９４））は、このような適用を開示する。

【０３１７】

固定化ＤＮＡフラグメントのアレイはまた、遺伝子診断のために用いられ得る。例えば、変異遺伝子（単数または複数）の複数形態を含むアレイは、遺伝子の固定化バージョンの１つのみと優先的に相互作用する患者のＤＮＡの標識混合物でプローブされ得る。この相互作用の検出は医療診断を提供し得る。固定化ＤＮＡフラグメントのアレイはまた、ＤＮＡプローブ診断において用いられ得る。ヒトのＤＮＡまたはＲＮＡ含有試料のような試料の遺伝子型を明瞭に決定するかまたは同定するために、試験試料の同一性が、ヒトを含む異なる生物からのＤＮＡを含むアレイにこの試料をハイブリダイズすることにより明瞭に確立され得る。ここで、ＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２遺伝子配列の１つ以上がアレイ中に含まれる。ｃＤＮＡおよびＲＮＡのような、目的のその他の遺伝子分子がアレイ上に固定化され得るか、それに代わって、アレイに付与さ

れる標識プローブ混合物として用いられ得る。

【０３１８】

１つの実施形態では、可能なアゴニストは、免疫グロブリンのＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドとの融合に結合するポリペプチドまたは小分子を含み、そして、特に、制限されずに、ポリおよびモノクローナル抗体ならびに抗体フラグメント、単鎖抗体、抗イディオタイプ抗体、ならびにこのような抗体のキメラもしくはヒト化バージョンまたはフラグメント、ならびにヒト抗体および抗体フラグメントを含む、抗体である。あるいは、可能なアンタゴニストは、緊密に関連するタンパク質またはペプチド、例えば、ＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２結合タンパク質または基質を認識するが、影響を与えず、それによってＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの作用を競争的に阻害するＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの変異形態であり得る。

【０３１９】

その他の可能なＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドアンタゴニストは、本明細書に記載されるように、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチ遺伝子（アンチセンスまたはセンス）構築物であり、ここで、例えば、このアンチセンス分子は、標的となるＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ｍＲＮＡにハイブリダイズすることによりｍＲＮＡの翻訳を直接低減するように作用するか、またはこのセンスまたはアンチセンス分子は、ＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ゲノムＤＮＡに（代表的には三重ヘリックス形成により）ハイブリダイズすることによりｍＲＮＡの転写を低減

し、両方の手段は、ＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のタンパク質翻訳を防ぐか、または低減する。例えば、本明細書の成熟ＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の５’コード部分は、長さが約５～６０塩基対のアンチセンスＲＮＡまたはＤＮＡまたはＰＮＡオリゴヌクレオチドを設計するために用いられる。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、インビボでｍＲＮＡにハイブリダイズし、そしてＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドへのｍＲＮＡ分子の翻訳をブロックする（アンチセンス－－Ｏｋａｎｏ、Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．、５６：５６０（１９９１））；Ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ　ａｓ　Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ　ｏｆ　Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ（ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ：Ｂｏｃａ　Ｒａｔｏｎ、ＦＬ、１９８８）。ＰＮＡセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドは、転写に関与する遺伝子の領域に相補的であるように設計され（三重ヘリックス－－Ｌｅｅら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、６：３０７３（１９７９）；Ｃｏｏｎｅｙら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４１：４５６（１９８８）；Ｄｅｒｖａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５１：１３６０（１９９１）を参照のこと）、それによって、ＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの転写および産生を防ぐ。上記のオリゴヌクレオチドはまた細胞に送達され得、このアンチ遺伝子分子がインビボで発現されてＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの産生を阻害し得る。アンチセンスＤＮＡが用いられるとき、翻訳開始部位由来のオリゴデオキシヌクレオチド、例えば、標的遺伝子ヌクレオチド配列の約－１０～＋１０間位置が好適である。

【０３２０】

リボザイムは、ＲＮＡの特異的な切断を触媒し得る酵素性のＲＮＡ分子である

。リボザイムは、相補性の標的ＲＮＡに対する配列特異的なハイブリダイゼーション、それに続く内部核酸溶解性の切断によって作用する。可能性のあるＲＮＡ標的中の特異的なリボザイム切断部位は、公知の技術によって同定され得る。さらなる詳細については、Ｒｏｓｓｉ，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，４：４６９－４７１（１９９４）、およびＰＣＴ国際公開番号第WO９７／３３５５１号（１９９７年9月１８日に公開された）を参照のこと。

【０３２１】

本明細書で論議されるように、転写を阻害するために使用される三重ヘリックス形成における核酸分子は、一本鎖であり、そしてデオキシヌクレオチドから構成され得る。このような分子は、ＤＮＡまたはＲＮＡ中に天然には見出されない骨格結合を有し得る。好適な形態はＰＮＡである。ＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２遺伝子と三重鎖を形成するような分子もまた、本明細書で論議されるように適切に標的化されるとき、ＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２転写をアップレギュレートするためのアゴニストとして作用し得る。

【０３２２】

可能なアゴニストは、ＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチドの活性部位、タンパク質結合部位、またはその他の関係する結合部位（例えば、コファクター結合部位、基質結合部位）に結合し、それによってＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチドの通常の生物学的活性をブロックする小分子を含む。小分子の例は、限定されないで、小ペプチドまたはペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、および合成の非ペプチド有機または無機化合物を含む。

【０３２３】

これら小分子は、本明細書で論議される１つ以上のスクリーニングアッセイに

より、および／または当業者に周知の任意のその他のスクリーニング技法により同定され得る。

例えば、このＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２アゴニストは、本明細書に記載のような内皮細胞の増殖または管形成を刺激または低減する能力についてスクリーニングされ得る。簡単に述べれば、この増殖アッセイでは、ヒト臍帯静脈内皮細胞が得られ、そして９６ウェル平底培養プレート（Ｃｏｓｔａｒ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）中で培養され、そして細胞の増殖を促進するために適切な反応混合物が補填される。スクリーニングされる化合物が添加され、そして３７℃におけるインキュベーションの後、培養を３－Ｈ－チミジンでパルスし、そしてグラスファイバーフィルター（ｐｈＤ；Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｗａｔｅｒｔｏｗｎ、ＭＡ）上に回収する。３つの重複する培養の平均３－Ｈ－チミジン取り込み（ｃｐｍ）を、液体シンチレーションカウンター（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｉｒｖｉｎｅ、ＣＡ）を用いて決定する。有意な３－（Ｈ）チミジン取り込みは、内皮細胞増殖の刺激を示す。アンタゴニストについてアッセイするため、本明細書に記載のアッセイが実施され得る。例えば、上記のアッセイでは、スクリーニングされる化合物が添加され、そしてその３－（Ｈ）チミジン取り込みを阻害する能力が決定される。

【０３２４】

本明細書で提供される疾患または症状の処置に有用な組成物は、制限することなく、標的遺伝子産物の発現および／または活性を阻害する抗体、小有機および無機分子、ペプチド、ホスホペプチド、アンチセンスおよびリボザイム分子、三重ヘリックス分子などを含む。

【０３２５】

本発明のＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドおよび核酸分子は、本明細書に記載のように、血管形成または脈管形成の発生または進行を検出、モニター、分析、または同定するために特に有用であり、これらは、例えば、手術後のような外傷後の血管修復および形成において、または癌、腫

瘍増殖、または血管新生のような障害または症状の間で生じ得る。内皮細胞が血管形成への前駆体構造である内皮細胞管様構造に分化する血管形成は、外傷、腫瘍増殖および転移、慢性関節リウマチ、乾癬、アテローム硬化症、糖尿病性網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、年齢関連黄斑変性、血管腫、移植角膜組織の免疫拒絶、および慢性炎症を含む種々の疾患および障害の重要成分である。脈管形成を低減することにより、本発明は、腫瘍を支援する血管系を低減し、腫瘍サイズまたは成長を阻害し、そして哺乳動物の腫瘍負荷を低減する。逆に、脈管形成を増大することにより、本発明は、損傷組織を支援する血管系を増加または回復する。従って、本発明は、これらおよびその他の関連症状における血管形成または脈管形成の発生または進行を検出し、モニターし、分析し、同定し、または処置するため、および、これらおよびその他の関連する症状を処置するために有用な薬物、例えば、アンチセンス、小分子、抗体を同定するための手段を提供する。

【０３２６】

種々のアッセイを用いて、血管形成活性について本明細書のポリペプチドを試験し得る。このようなアッセイは、以下の実施例で提供されるものを含む。

【０３２７】

組織生成活性のアッセイは、制限することなく、ＷＯ９５／１６０３５（骨、軟骨、腱）；ＷＯ９５／０５８４６（神経、ニューロン）、およびＷＯ／９１／０７４９１（皮膚、内皮）に記載のアッセイを含む。

【０３２８】

創傷治癒活性のアッセイは、例えば、Ｗｉｎｔｅｒ、Ｅｐｉｄｅｒｍａｌ Ｗｏｕｎｄ Ｈｅａｌｉｎｇ、Ｍａｉｂａｃｈ、ＨＩおよびＲｏｖｅｅ、ＤＴ、編（Ｙｅａｒ Ｂｏｏｋ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ、Ｉｎｃ．Ｃｈｉｃａｇｏ）７１－１１２頁に記載のアッセイ、Ｅａｇｌｓｔｅｉｎおよび Ｍｅｒｔｚ、Ｊ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．、７１：３８２－３８４（１９７８）の論文によるその改変法を含む。

【０３２９】

（細胞を基礎にしたアッセイ）

腫瘍のような血管形成障害の細胞を基礎にしたアッセイおよび動物モデルを用いて、本明細書の血管形成または血管抑制アッセイの知見を確認し、そしてさらに本明細書で同定された遺伝子と、所望されない血管形成細胞増殖の発症および病因との間の関係を理解し得る。例えば、内皮細胞、腫瘍細胞の所望または所望されない血管形成細胞増殖の発症および病理学における、本明細書で同定された遺伝子産物の役割は、本明細書にある、ＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、またはそのアゴニストまたはアンタゴニストにより刺激または阻害されると同定された細胞または細胞株を用いることによって試験され得る。このような細胞は、例えば、以下の実施例で提示されるものを含む。

【０３３０】

異なるアプローチでは、特定の血管形成活性または障害に関与することが知られる細胞型の細胞が、本明細書のｃＤＮＡでトランスフェクトされ、そしてこれらｃＤＮＡの過度増殖を誘導するかまたは増殖を阻害する能力が分析される。血管形成障害が癌である場合、適切な腫瘍細胞は、例えば、Ｂ１０４－１－１細胞株（ｎｅｕプロトオンコジーンでトランスフェクトされた安定ＮＩＨ－３Ｔ３細胞株）およびｒａｓでトランスフェクトされたＮＩＨ－３Ｔ３細胞のような安定腫瘍細胞を含み、これらは所望の遺伝子でトランスフェクトされ、そして腫瘍形成増殖についてモニターされ得る。次いで、このようなトランスフェクト細胞株を用い、ポリまたはモノクローナル抗体または抗体組成物の腫瘍形成増殖を阻害する能力を、形質転換細胞の増殖に対する細胞抑制もしくは細胞傷害性活性を奏することによるか、または抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を媒介することによって試験し得る。本明細書で同定された遺伝子のコード配列でトランスフェクトされた細胞は、さらに、癌のような血管形成障害の処置のための候補薬物を同定するために用いられ得る。

【０３３１】

別のアッセイでは、増殖因子の存在下で三次元ゲル中において管形成を起こすヒト臍帯内皮細胞（ＨＵＶＥＣＳ）は、インビボでの内皮細胞の新脈管形成環境を模倣し、正常条件および腫瘍性条件の両方における新脈管形成および脈管形成

についての十分に認められた系を提供する（例えば、Ｄａｖｉｓら，Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ．１９９６　２２４：３９－５１（１９９６）およびその中の実施例を参照のこと）。例えば、１つの管形成アッセイでは、内皮細胞をＩ型コラーゲンの三次元コラーゲン格子中に懸濁させ、そして急速な形態形成を受けさせる。４時間以内に、多数の小胞が、大半の内皮細胞中で観察される。２４時間目には、管様構造の形成が観察され得る。そして４８時間目には、管様構造の相互接続ネットワークが観察される。この管形成アッセイおよび他の管形成アッセイにおいて、タンパク質合成のインヒビター（シクロヘキシミド）およびｍＲＮＡ合成のインヒビター（アクチノマイシンＤ）は、管形成を完全にブロックする。三次元ゲルが、管への内皮細胞の分化および融合に必須であり；ゼラチン表面またはプラスチック上で増殖するＨＵＶＥＣＳは、管形成を受けない。ＨＵＶＥＣＳは、ゼラチンもしくはコラーゲンフィルム（非誘導的）またはコラーゲンゲル（誘導的）のいずれかにおいて、正常な新脈管形成または腫瘍誘導因子を刺激するための増殖因子の添加を伴ってかまたは伴わずに、管形成に対して誘導的または非誘導的な種々の条件下で増殖され得る。ＨＵＶＥＣ細胞は、本明細書中のｃＤＮＡ（または、それらのアンチセンス）でトランスフェクトされ得、そして過剰増殖もしくは管形成を誘導するこれらの核酸の能力、または増殖もしくは管形成を阻害するこれらの核酸の能力が分析される。本明細書中で同定される遺伝子のコード配列を発現するＨＵＶＥＣ細胞はさらに、薬物候補を同定するために使用され得る。ＲＣＲが、３Ｄゲルにおいて培養された内皮細胞中および任意の他の細胞または生物体中でのＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のｍＲＮＡの発現を検出するために使用され得る。さらに、トランスジェニック動物（上記のような）における腫瘍に由来する初代培養物が、本明細書中の細胞ベースのアッセイにおいて使用され得るが、安定な細胞株が好ましい。トランスジェニック動物から継続的（ｃｏｎｔｉｎｕｏｕｓ）な細胞株を導き出すための技術は、当該分野において周知である。例えば、Ｓｍａｌｌら，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，５：６４２－６４８（１９８５）を参照のこと。

【０３３２】

癌については、種々の周知の動物モデルが、腫瘍の発達および病因における本明細書中で同定された遺伝子の役割をさらに理解するために、そして低分子アンタゴニストのような候補治療剤（ネイティブなＰＲＯ－Ｃ－MG．２，ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２，ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５，ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２ポリペプチドの抗体および他のアンタゴニストを含む）の効力を試験するために使用され得る。このようなモデルのインビボでの性質は、それらの、特にヒト患者における応答を予想させる。腫瘍および癌（例えば、乳癌、結腸癌、前立腺癌、肺癌など）の動物モデルとしては、非組換えおよび組換え（トランスジェニック）動物の両方が挙げられる。非組換え動物モデルとしては、例えば、げっ歯類（例えば、マウスモデル）が挙げられる。このようなモデルは、標準的な技術（例えば、皮下注射、尾静脈注射、脾臓移植、腹腔内移植、腎被膜の下での移植、または同所（ｏｒｔｈｏｐｉｎ）移植（例えば、結腸組織に移植された結腸癌細胞））を使用して、同系マウス中に腫瘍細胞を導入することによって作製され得る。例えば、ＰＣＴ公開番号WO　９７／３３５５１（１９９７年9月１８日付公開）を参照のこと。おそらく、腫瘍学的研究において最も頻繁に使用される動物種は、免疫欠損マウス、そして特にヌードマウスである。胸腺欠損／発育不全を有するヌードマウスが、ヒト腫瘍異種移植片の宿主として首尾よく作用し得るという観察によって、この目的のためのその広範な用途が導き出された。常染色体の劣性ｎｕ遺伝子が、非常に多数のヌードマウスの別個の類似遺伝子系統（例えば、ＡＳＷ，Ａ／Ｈｅ，ＡＫＲ，ＢＡＬＢ／ｃ，Ｂ　１０．ＬＰ，Ｃ１７，Ｃ３Ｈ，Ｃ５７ＢＬ，Ｃ５７，ＣＢＡ，ＤＢＡ，ＤＤＤ，Ｉ／ｓｔ，ＮＣ，ＮＦＲ，ＮＦＳ，ＮＦＳ／Ｎ，ＮＺＢ，ＮＺＣ，ＮＺＷ，Ｐ，ＲＩＩＩ，およびＳＪＬを含む）に導入されている。さらに、ヌードマウス以外の遺伝性免疫学的欠損を有する広範な種々の他の動物が飼育され、そして腫瘍異種移植片のレシピエントとして使用されている。さらなる詳細として、例えば、Ｔｈｅ　Ｎｕｄｅ　Ｍｏｕｓｅ　ｉｎ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｅ．ＢｏｖｅｎおよびＢ．Ｗｉｎｏｇｒａｄ編（ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，１９９１）を参照のこと。

【０３３３】

このような動物に導入された細胞は、既知の腫瘍／癌細胞株（例えば、上記に列挙された腫瘍細胞株および例えば、Ｂ　１０４－１－１細胞株（ｎｅｕプロトオンコジーンでトランスフェクトされた、安定なＮＩＨ－３Ｔ３細胞株）；ｒａｓトランスフェクトされた、ＮＩＨ－３Ｔ３細胞；Ｃａｃｏ－２（ＡＴＣＣ　ＨＴＢ－３７）；または、中程度に十分に分化した、ＩＩ段階のヒト結腸腺癌細胞株，ＨＴ－２９（ＡＴＣＣ　ＨＴＢ－３８）のいずれか）由来であり得るか、または腫瘍および癌由来であり得る。腫瘍または癌のサンプルは、外科手術を受けた患者から、標準的な条件（液体窒素中での凍結および保存を含む）下で得られ得る。Ｋａｒｍａｌｉら，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，４８：６８９－６９６（１９８３）。

【０３３４】

腫瘍細胞は、種々の手順によって、ヌードマウスのような動物中に導入され得る。マウスの皮下（ｓ．ｃ．）腔は、腫瘍移植に非常に適切である。腫瘍は、固形塊として、トロカールを使用して生検針として、または細胞懸濁物として、ｓ．ｃ．で移植され得る。固形塊またはトロカール移植については、適切なサイズの腫瘍組織断片が、ｓ．ｃ．腔中に導入される。細胞懸濁物は、原発性腫瘍または適切な腫瘍細胞株から新たに調製され、そして皮下に注射される。腫瘍細胞はまた、皮下移植物として注射され得る。この位置において、接種物は、皮膚の結合組織の下部とｓ．ｃ．組織との間に配置される。

【０３３５】

乳癌の動物モデルは、例えば、本質的に、Ｄｒｅｂｉｎら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８３：９１２９－９１３３（１９８６）に記載されるように、ラット神経芽細胞腫細胞（ここから、ｎｅｕオンコジーンが最初に単離された）またはｎｅｕ形質転換ＮＩＨ－３Ｔ３細胞を、ヌードマウス中に移植することによって作製され得る。

【０３３６】

同様に、結腸癌の動物モデルは、動物（例えば、ヌードマウス）中で結腸癌細胞を継代すること、これらの動物中において腫瘍の出現を導くことによって作製され得る。ヌードマウスにおけるヒト結腸癌の同所移植モデルが、例えば、Ｗａ

ｎｇら，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，５４：４７２６－４７２８（１９９４）およびＴｏｏら，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，５５：６８１－６８４（１９９５）に記載されている。このモデルは、ＡｎｔｉＣａｎｃｅｒ，Ｉｎｃ．，（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）によって販売される、いわゆる「ＭＥＴＡＭＯＵＳＥ」™に基づいている。

【０３３７】

動物中において生じた腫瘍は、取り出され得、そしてインビトロで培養され得る。次いで、インビトロ培養物由来の細胞が動物中に継代される。このような腫瘍は、さらなる試験または薬物スクリーニングのための標的として供され得る。あるいは、継代から生じた腫瘍が単離され得、そして前継代細胞または１回以上の継代後に単離された細胞由来のＲＮＡが、目的の遺伝子の示差的発現について分析され得る。このような継代技術は、任意の既知の腫瘍細胞株または癌細胞株を用いて実施され得る。

【０３３８】

例えば、Ｍｅｔｈ　Ａ，ＣＭＳ４，ＣＭＳ５，ＣＭＳ２１，およびＷＥＨＩ－１６４は、ＢＡＬＢ／ｃ雌性マウスの化学的に誘導された線維肉腫であり（ＤｅＬｅｏら，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１４６：７２０（１９７７））、そして種々の薬剤の抗腫瘍活性を研究するための高度に制御可能なモデル系を提供する。Ｐａｌｌａｄｉｎｏら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３８：４０２３－４０３２（１９８７）。簡潔には、腫瘍細胞が、細胞培養物中でインビトロにおいて増殖される。動物への注射前に、細胞株を洗浄し、そして緩衝液中に、約１０×１０^{6}～１０×１０^{7}細胞／ｍｌの細胞密度で懸濁する。次いで、この動物に、皮下的に１０～１００μｌの細胞懸濁液を注射し、１～３週間で腫瘍が出現するのを可能にする。

【０３３９】

さらに、マウスのルイス肺（３ＬＬ）癌腫（これは、最も徹底的に研究された実験的腫瘍の１つである）が、治験腫瘍モデルとして使用され得る。この腫瘍モデルの効力は、肺の小細胞癌腫（ＳＣＣＬ）を有すると診断されたヒト患者の処置における有益な効力と相関した。この腫瘍は、罹患マウス由来の腫瘍断片の注

射または培養物中で維持された細胞の注射で、正常マウス中に導入され得る。Ｚｕｐｉら、Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　４１：補遺４、３０（１９８０）。腫瘍が、たとえ単一細胞の注射からでも開始され得るという証拠、および非常に高い割合の感染腫瘍細胞が生存するという証拠が示されている。この腫瘍モデルに関するさらなる情報については、Ｚａｃｈａｒｓｋｉ、Ｈａｅｍｏｓｔａｓｉｓ　１６：３００－３２０（１９８６）を参照のこと。

【０３４０】

移植された腫瘍を有する動物モデルにおける試験化合物の効力を評価する１つの方法が、処理前および処理後に腫瘍のサイズを測定することである。伝統的に、移植された腫瘍のサイズは、二次元または三次元でスライドカリパスを用いて測定されてきた。二次元に限定された測定は、腫瘍のサイズを正確に反映しない；従って、これは通常、数学式を使用することによって、対応する容量へと変換される。しかし、腫瘍サイズの測定は、非常に不正確である。薬物候補の治療的効力は、処理に誘導される増殖遅延および特異的増殖遅延として、より良好に記載され得る。腫瘍増殖の説明における別の重要な変数が、腫瘍容量倍加時間である。腫瘍増殖の計算および記載についてのコンピュータープログラムもまた利用可能である（例えば、ＲｙｇａａｒｄおよびＳｐａｎｇ－Ｔｈｏｍｓｅｎ，Ｐｒｏｃ．６th Ｉｎｔ．Ｗｏｒｋｓｈｏｐ　ｏｎ　Ｉｍｍｕｎｅ－Ｄｅｆｉｃｉｅｎｔ　Ａｎｉｍａｌｓ，WuおよびＳｈｅｎｇ編（Ｂａｓｅｌ，１９８９），３０１頁に報告されたプログラム）。しかし、処理後の壊死応答および炎症応答は、少なくとも最初に、腫瘍サイズの増加を実際に生じさせ得ることに留意のこと。従って、これらの変化は、形態学的方法およびフローサイトメトリー分析の組合せによって、注意深くモニターされることが必要である。

【０３４１】

さらに、組換え（トランスジェニック）動物モデルは、トランスジェニック動物を作製するための標準的技術を使用して、本明細書中で同定されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２遺伝子のコード部分を、目的の動物のゲノム中に導入することによって操作され得る。トランスジェニック操作のため

の標的として供され得る動物としては、制限されないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、および非ヒト霊長類（例えば、ヒヒ、チンパンジー、およびサル）が挙げられる。このような動物に導入遺伝子を導入するための当該分野において公知の技術としては、以下が挙げられる：前核微量注入（米国特許第４，８７３，１９１号）；生殖細胞系へのレトロウイルス媒介性遺伝子移入（例えば、Ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｐｕｔｔｅｎら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｉ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８２：６１４８－６１５（１９８５））；胚幹細胞中における遺伝子ターゲッティング（Ｔｈｏｍｐｓｏｎら，Ｃｅｌｌ，５６：３１３－３２１（１９８９））；胚のエレクトロポレーション（Ｌｏ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，３：１８０３－１８１４（１９８３））；および精子媒介性遺伝子移入。Ｌａｖｉｔｒａｎｏら，Ｃｅｌｌ，５７：７１７－７３（１９８９）。概説として、例えば、米国特許第４，７３６，８６６号を参照のこと。

【０３４２】

本発明の目的のために、トランスジェニック動物は、それらの細胞の部分においてのみ導入遺伝子を有する動物を含む（「モザイク動物」）。導入遺伝子は、単一導入遺伝子としてか、またはコンカテマー（例えば、頭－頭または頭－尾タンデム）においてのいずれかで組み込まれ得る。特定の細胞型への導入遺伝子の選択的導入はまた、例えば、Ｌａｓｋｏら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：６２３２－６３６（１９９２）の技術に従うことによって、可能である。

【０３４３】

トランスジェニック動物中での導入遺伝子の発現は、標準的技術によってモニターされ得る。例えば、サザンブロット分析またはＰＣＲ増幅を使用して、導入遺伝子の組み込みを確認し得る。次いで、ｍＲＮＡ発現のレベルを、インサイチュハイブリダイゼーション、ノーザンブロット分析、ＰＣＲ、または免疫化学のような技術を使用して分析し得る。動物をさらに、腫瘍または癌の発達の徴候について試験する。

【０３４４】

あるいは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２，ＰＲＯ－Ｃ－Ｍ

Ｇ．４５，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする内因性遺伝子と、動物の胚性細胞中に導入された同じポリペプチドをコードする改変ゲノムＤＮＡとの間の相同組換えの結果として、本明細書中で同定されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする遺伝子の欠損または改変を有する「ノックアウト」動物が、構築され得る。例えば、特定のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードするｃＤＮＡを使用して、確立された技術に従い、このポリペプチドをコードするゲノムＤＮＡをクローン化し得る。特定のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードするゲノムＤＮＡの一部は欠失され得るか、または別の遺伝子（例えば、組み込みをモニターするために使用され得る選択可能マーカーをコードする遺伝子）で置換され得る。代表的には、数キロベースの未改変隣接ＤＮＡ（５’末端および３’末端の両方）が、ベクター中に含まれる。相同組換えベクターの説明については、例えば、ＴｈｏｍａｓおよびＣａｐｅｃｃｈｉ，Ｃｅｌｌ，５１：５０３（１９８７）を参照のこと。ベクターは、胚幹細胞株中に（例えば、エレクトロポレーションによって）導入され、そして導入されたＤＮＡが、内因性ＤＮＡと相同的に組換えられた細胞が選択される。例えば、Ｌｉら，Ｃｅｌｌ，６９：９１５（１９９２）を参照のこと。次いで、選択された細胞を、動物（例えば、マウスまたはラット）の胚盤胞中に注射して、凝集キメラを形成する。例えば、Ｂｒａｄｌｅｙ，Ｔｅｒａｔｏｃａｒｃｉｎｏｍａｓ ａｎｄ Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｅ．Ｊ．Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ編（ＩＲＬ：Ｏｘｆｏｒｄ，１９８７），１１３－１５２頁を参照のこと。次いで、キメラ胚を、適切な偽妊娠性の雌性養母動物中に移植し得、そしてこの胚を、「ノックアウト」動物を作製するための期間にもちこむ。生殖細胞系中に相同組換えされたＤＮＡを有する子孫は、標準的技術によって同定され得、そして動物のすべての細胞が相同組換えされたＤＮＡを含む動物を育種するために使用

され得る。ノックアウト動物はまた、本発明のアンチセンス分子を投与することによって、当該分野において周知のように作製され得る。このようなアンチセンス分子を含む動物は、本発明の実施形態として特に意図される。ノックアウト動物は、例えば、特定の病理学的状態に対して防御するその能力によって、そしてＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの不在（ノックアウト）に起因する病理学的状態のその発達によって、特徴付けられ得る。

【０３４５】

本明細書中で同定されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドおよび他の薬物候補を特異的に結合する抗体の効力はまた、自然発生性動物腫瘍の処置において試験され得る。このような研究のための適切な標的が、ネコ口腔扁平上皮癌（ＳＣＣ）である。ネコ口腔ＳＣＣは、非常に侵襲性であり、この種で報告されている口腔腫瘍の６０％より多くを説明する、ネコの最も一般的な口腔悪性腫瘍である悪性腫瘍である。これは稀に、遠位に転移するが、これの低い転移発生率は、単に、この腫瘍を有するネコの生存時間の短さを反映し得る。これらの腫瘍は、通常、外科手術に従い難い。これは主に、ネコ口腔の解剖学的構造が理由である。現在までに、この腫瘍に対する有効な処置は存在していない。この研究に参加する前に、各ネコは、完全な臨床試験および生検を受け、そしてコンピュータ連動断層撮影（ＣＴ）によって走査された。舌下口腔扁平上皮癌を有すると診断されたネコは、この研究から除外した。舌は、このような腫瘍の結果として麻痺となり得、そしてたとえこの処置によって腫瘍が殺傷されたとしても、この動物は、それら自身で食餌し得ない。各ネコを、長期間にわたって繰り返し処理する。腫瘍の写真を、処置期間の間毎日、そしてその後の再検査ごとに撮影する。処理後、各ネコは、さらにＣＴ走査を受けた。ＣＴ走査および胸部Ｘ線写真を、その後８週間毎に評価する。このデータを、コントロール群に対して比較した場合の生存、応答および毒性における差異について評価する。陽性の応答は、好ましくは、生活の質の改善および／または寿命の増加を伴う、腫瘍後退の証拠を必要とし得る。

【０３４６】

さらに、他の自然発生性動物腫瘍（例えば、イヌ、ネコ、およびヒヒの線維肉腫、腺癌、リンパ腫、軟骨腫、または平滑筋肉腫）もまた試験され得る。当然のことながら、イヌおよびネコにおける乳腺癌（ｍａｍｍａｒｙ　ａｄｅｎｏｃａｒｃｉｎｏｍａ）は、それらの出現および挙動がヒトにおける乳腺癌と非常に類似しているので、好ましいモデルである。しかし、これらのモデルの使用は、動物におけるこの型の腫瘍の稀な発生率によって制限される。当該分野において公知の他のインビトロおよびインビボでの新脈管形成試験もまた、本発明において適切である。

【０３４７】

（Ｈ．抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体，抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体，抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体，抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体）

本発明はさらに、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体，抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体，抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体，抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体を提供する。例示的な抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、二重特異的抗体、およびヘテロ結合体抗体が挙げられる。

【０３４８】

（１．ポリクローナル抗体）

抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体，抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体，抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体，抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体は、ポリクローナル抗体を含み得る。ポリクローナル抗体を調製する方法は、当業者に公知である。ポリクローナル抗体は、哺乳動物中で、例えば、免疫薬剤および所望される場合には、アジュバントの１回以上の注射によって惹起され得る。代表的には、免疫薬剤および／またはアジュバントは、複数回の皮下または腹腔内注射によって哺乳動物に注射される。免疫薬剤は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはその融合タンパク質を

含み得る。免疫される哺乳動物中で免疫原性であることが公知のタンパク質に対して免疫薬剤を結合させることが有用であり得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、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、およびダイズトリプシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。使用され得るアジュバントの例としては、フロイント完全アジュバント、およびＭＰＬ－ＴＤＭアジュバント（モノホスホリル脂質Ａ、合成のトレハロースジコリノミコレート（ｄｉｃｏｒｙｎｏｍｙｃｏｌａｔｅ））が挙げられる。免疫プロトコールは、過度の実験を行うことなく、当業者によって選択され得る。

【０３４９】

（２．モノクローナル抗体）

抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体，抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体，抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体，抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体は、あるいは、モノクローナル抗体であり得る。モノクローナル抗体は、ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５（１９７５）によって記載されているような、ハイブリドーマ方法を使用して調製され得る。ハイブリドーマ方法においては、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物が、代表的には、抗体を産生するかまたは抗体を産生し得るリンパ球を誘発する免疫薬剤で免疫される。これらは、免疫薬剤に対して特異的に結合する。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫され得る。

【０３５０】

免疫薬剤は、代表的には、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５，ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはその融合タンパク質を含む。一般には、末梢血リンパ球（「ＰＢＬ」）が、ヒト起源の細胞が所望される場合に使用されるか、または脾臓細胞もしくはリンパ節細胞が、非ヒト哺乳動物供給源が所望される場合に使用されるかのいずれかである。次いで、リンパ球は、適切な融合剤（例えば、ハイブリドーマ細胞を形成するためのポリエチレングリコール）を使用して、不死化細胞株と融合される（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅ

ｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，（１９８６）、５９－１０３頁）。不死化細胞株は、通常は、形質転換された哺乳動物細胞であり、特に、げっ歯類、ウシ、およびヒト起源の骨髄腫細胞である。通常は、ラットまたはマウスの骨髄腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、融合されていない不死化細胞の増殖または生存を阻害する１つ以上の物質を含有する、適切な培養培地中で培養され得る。例えば、親細胞が、酵素である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またはＨＰＲＴ）を欠失している場合は、ハイブリドーマのための培養培地は、代表的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含む（「ＨＡＴ培地」）。これらの物質は、ＨＧＰＲＴ欠損細胞の増殖を妨げる。

【０３５１】

好ましい不死化細胞株は、効率よく融合し、選択された抗体を産生する細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支持する細胞株であり、そしてこれらは、ＨＡＴ培地のような培地に対して敏感である。より好ましい不死化細胞株は、マウスの骨髄腫株である。これらは、例えば、Ｓａｌｋ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｃｅｌｌ Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｃｅｎｔｅｒ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ およびアメリカンタイプカルチャーコレクション、Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖｉｒｇｉｎｉａから入手することができる。ヒトの骨髄腫およびマウス－ヒトのヘテロ骨髄腫細胞株もまた、ヒトのモノクローナル抗体の産生について記載されている（Ｋｏｚｂｏｒ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３３：３００１（１９８４）；Ｂｒｏｄｅｕｒら、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，（１９８７）、５１－６３頁）。

【０３５２】

ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、次いで、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２に対して指向されたモノクローナル抗体の存在に

ついてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって、またはインビトロでの結合アッセイ（例えば、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）もしくは酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）によって決定される。このような技術およびアッセイは、当該分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Ｍｕｎｓｏｎおよび Ｐｏｌｌａｒｄ，Ａｎａｌ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０７：２２０（１９８０）のＳｃａｔｃｈａｒｄ分析によって決定され得る。

【０３５３】

所望されるハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンは、限界稀釈手順によってサブクローン化され得、そして標準的な方法によって増殖させられ得る（Ｇｏｄｉｎｇ、前出）。この目的についての適切な培養培地としては、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地およびＲＰＭＩ－１６４０培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物中で腹水としてインビボで増殖され得る。

【０３５４】

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、培養培地から単離または精製され得るか、あるいは例えば、プロテインＡ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ，ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーのような、従来の免疫グロブリン精製手順によって腹水液から単離または精製され得る。

【０３５５】

モノクローナル抗体はまた、米国特許第４，８１６，５６７号に記載されているような組換えＤＮＡ方法によって作製され得る。本発明のモノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、従来手順を使用して容易に単離されそして配列決定され得る（例えば、マウスの抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に対して特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなＤＮＡの好ましい供給源として作用する。一旦単離されると、ＤＮＡは、発現ベクター中に配置され得、これは次いで、サルのＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、または骨髄腫細

胞（これらはそうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない）のような宿主細胞中に、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を得るために、トランスフェクトされる。ＤＮＡはまた、例えば、相同なマウスの配列の代わりに、ヒトの重鎖および軽鎖の定常ドメインのコード配列で置きかえることによって（米国特許第４，８１６，５６７号；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、前出）、あるいは、非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全てまたは一部を、免疫グロブリンのコード配列に対して共有的に連結することによって、改変され得る。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で置換され得るか、またはキメラの二価抗体を作製するために、本発明の抗体の１つの抗原結合部位の可変ドメインで置換され得る。

【０３５６】

抗体は、一価の抗体であり得る。一価の抗体を調製するための方法は、当該分野で周知である。例えば、１つの方法としては、免疫グロブリン軽鎖および改変された重鎖の組換え発現が挙げられる。重鎖は、一般には、重鎖の架橋を防ぐために、Ｆｃ領域中の任意の点で短縮される。あるいは、関連するシステイン残基が、別のアミノ酸残基で置換されるか、または架橋を防ぐように欠失させられる。

【０３５７】

インビトロでの方法もまた、一価の抗体を調製するために適切である。そのフラグメント（特に、Ｆａｂフラグメント）を産生するための抗体の設計は、当該分野で公知の慣用的な技術を使用して達成され得る。

【０３５８】

（３．ヒト抗体およびヒト化抗体）

本発明の抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５抗体、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４抗体または抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体はさらに、ヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、キメラの免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはそれらのフラグメント（例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、または抗体の他の抗原結合サブ配列）である。これらは、非ヒト免疫グ

ロブリンに由来する最小の配列を含む。ヒト化抗体としては、ヒトの免疫グロブリン（レシピエント抗体）（その中で残基が、レシピエントの相補性決定領域（ＣＤＲ）を形成する）が、所望される特異性、親和性、および能力を有している非ヒト種（例えば、マウス、ラット、またはウサギ）のＣＤＲ（ドナー抗体）に由来する残基で置換される。いくつかの例においては、ヒトの免疫グロブリンのＦｖフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体においても導入されたＣＤＲまたはフレームワーク配列においても見出されない残基を含み得る。一般には、ヒト化抗体は、少なくとも１つの、そして代表的には２つの可変ドメインを実質的に全て含む。ここでは、非ヒト免疫グロブリンのものに対応する全てのまたは実質的に全てのＣＤＲ領域、およびＦＲ領域の全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部、代表的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含む（Ｊｏｎｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ，３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３－３２９（１９８８）；およびＰｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．，２：５９３－５９６（１９９２））。

【０３５９】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。一般には、ヒト化抗体は、非ヒト供給源に由来するそれに導入された１つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、「輸入」残基と呼ばれる。これらは代表的には、「輸入」可変ドメインから得られる。ヒト化は、本質的には、Ｗｉｎｔｅｒおよび共同研究者らの方法に従って、ヒト抗体の対応する配列でげっ歯類のＣＤＲ配列を置換することによって、行われ得る（Ｊｏｎｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ、３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｉｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３－３２７（１９８８）；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３９：１５３４－１５３６（１９８８））。従って、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体である（米国特許第４，８１６，５６７号）。ここでは、実質的に完全ではないヒトの可変ドメインが、非ヒト種に由来する

対応する配列によって置換されている。実際、ヒト化抗体は、代表的には、その中のいくつかのＣＤＲ残基および可能性のあるいくつかのＦＲ残基が、げっ歯類の抗体中の同様の部位に由来する残基によって置換されているヒト抗体である。

【０３６０】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーを含む、当該分野で公知の種々の技術を使用して産生され得る（ＨｏｏｇｅｎｂｏｏｍおよびＷｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：３８１（１９９１）；Ｍａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１（１９９１））。ＣｏｌｅらおよびＢｏｅｒｎｅｒらの技術もまた、ヒトのモノクローナル抗体の調製のために利用可能である（Ｃｏｌｅら、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ、７７頁（１９８５）およびＢｏｅｒｎｅｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４７（１）：８６－９５（１９９１））。同様に、ヒト抗体は、トランスジェニック動物（例えば、内因性の免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活化されているマウス）にヒトの免疫グロブリン遺伝子座を導入することによって、作製され得る。チャレンジの際には、ヒト抗体の産生が観察され、これは、遺伝子の再配置、アセンブリ、および抗体のレパートリーを含む全ての点においてヒトで見られるものに非常に類似している。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、および以下の科学文献に記載されている：Ｍａｒｋｓら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０，７７９－７８３（１９９２）；Ｌｏｎｂｅｒｇら、Ｎａｔｕｒｅ ３６８、８５６－８５９（１９９４）；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｎａｔｕｒｅ ３６８，８１２－８１３（１９９４）；Ｆｉｓｈｗｉｌｄら、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４，８４５－５１（１９９６）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４，８２６（１９９６）；ＬｏｎｂｅｒｇおよびＨｕｓｚａｒ，Ｉｎｔｅｒｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６５－９３（１９９５）。

【０３６１】

（４．二重特異的抗体）

二重特異的抗体は、モノクローナル抗体（好ましくは、ヒト抗体またはヒト化抗体）である。これは、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。この場合においては、１つの結合特異性は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２に対してであり、他方は、任意の他の抗原に対して、そして好ましくは、細胞表面タンパク質またはレセプターまたはレセプターサブユニットに対してである。

【０３６２】

二重特異的抗体を作製するための方法は、当該分野で公知である。伝統的には、二重特異的抗体の組換え産生は、２つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現に基づく。ここでは、２つの重鎖は異なる特異性を有する（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ およびＣｕｅｌｌｏ、Ｎａｔｕｒｅ，３０５：５３７－５３９（１９８３））。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな組合せに起因して、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、１０個の異なる抗体分子の可能性のある混合物を生じる。これらのうちの１つだけが、正確な二重特異的構造を有する。正確な分子の精製は、通常は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって達成される。同様の手順が、１９９３年5月１３日に公開された第WO９３／０８８２９号、およびＴｒａｕｎｅｃｋｅｒら、EMBO Ｊ．，１０：３６５５－３６５９（１９９１）に開示されている。

【０３６３】

所望される結合特異性を有する抗体の可変ドメイン（抗体－抗原結合部位）は、免疫グロブリンの定常ドメイン配列に対して融合され得る。融合体は、好ましくは、ヒンジ、ＣＨ2、およびＣＨ３領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖の定常ドメインを有する。融合体の少なくとも１つの中に存在している軽鎖の結合に必要な部位を含む第１の重鎖定常領域（ＣＨ１）を有することが、好ましい。免疫グロブリン重鎖融合体（および、所望される場合には、免疫グロブリン軽鎖）をコードするＤＮＡは、別の発現ベクター中に挿入され、そして適切な宿主生物体中に同時トランスフェクトされる。二重特異的抗体の生成のさら

なる詳細については、例えば、Ｓｕｒｅｓｈら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１２１：２１０（１９８６）を参照のこと。

【０３６４】

第WO９６／２７０１１号に記載されている別のアプローチに従うと、抗体分子の対の間の境界は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体の割合を最大にするように操作され得る。好ましい境界は、抗体の定常ドメインのＣＨ３領域の少なくとも一部を含む。この方法においては、第１の抗体分子の境界に由来する１つ以上の小さいアミノ酸側鎖が、より大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置換される。大きな側鎖と同一であるかまたはそれと同様の大きさを補う「孔」が、より小さい側鎖（例えば、アラニンまたはスレオニン）でより大きなアミノ酸側鎖を置換することによって、第２の抗体分子の境界上に作製される。これによって、ホモ二量体のような、他の所望されない最終生成物を上回るヘテロニ量体の収量を増大させるための機構を提供する。

【０３６５】

二重特異的抗体は、全長の抗体または抗体フラグメント（例えば、Ｆ（ａｂ’）$_2$二重特異的抗体）として調製され得る。抗体フラグメントから二重特異的抗体を生成するための技術は、文献に記載されている。例えば、二重特異的抗体は、化学的な連結を使用して調製され得る。Ｂｒｅｎｎａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ２２９：８１（１９８５）は、インタクトな抗体がタンパク質分解によって切断されてＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを生じる手順を記載する。これらのフラグメントは、近隣のジチオールを安定化させ、そして分子内ジスルフィド形成を防ぐために、ジチオールを複合体化する薬剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在化で還元される。生成されたＦａｂ’フラグメントは、次いで、チオニトロベンゾエート（ＴＮＢ）誘導体に転換される。Ｆａｂ－ＴＮＢ誘導体の１つが、次いで、メルカプトエチルアミンでの還元によってＦａｂ－チオールに再転換され、そして二重特異的抗体を形成するように等量の他のＦａｂ－ＴＮＢ誘導体と混合される。産生された二重特異的抗体は、酵素の選択的な固定化のための薬剤として使用され得る。

【０３６６】

Ｆａｂ’フラグメントは、Ｅ．ｃｏｌｉから直接回収され得、そして二重特異的抗体を形成するように化学的にカップリングされ得る。Ｓｈａｌａｂｙら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７５：２１７－２２５（１９９２）は、完全にヒト化された二重特異的抗体Ｆ（ａｂ’）$_2$分子の産生を記載している。それぞれのＦａｂ’フラグメントは、Ｅ．ｃｏｌｉから別々に分泌され、そして二重特異的抗体を形成するようにインビトロでの直接的な化学的なカップリングに供される。このように形成された二重特異的抗体は、ＥｒｂＢ２レセプターを過剰に発現する細胞および正常なヒトのＴ細胞に対して結合し得、そしてヒトの乳房腫瘍細胞標的に対してヒトの細胞傷害性のリンパ球の溶解活性を誘発する。

【０３６７】

組換え細胞培養物から直接二重特異的抗体フラグメントを作製しそして単離するための種々の技術もまた、記載されている。例えば、二重特異的抗体は、ロイシンジッパーを使用して産生されている。Ｋｏｓｔｅｌｎｙら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８（５）：１５４７－１５５３（１９９２）。ＦｏｓおよびＪｕｎタンパク質に由来するロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって、２つの異なる抗体のＦａｂ’部分に対して連結された。抗体のホモ二量体は、ヒンジ領域で還元されて単量体を形成し、そして次いで、抗体のヘテロニ量体を形成するように再度酸化された。この方法はまた、抗体ホモ二量体の産生のためにも利用され得る。Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：６４４４－６４４８（１９９３）によって記載されているダイアボディー技術は、二重特異的抗体フラグメントを作製するための別の機構を提供する。フラグメントは、同じ鎖上の２つのドメイン間での対合を可能にするには短すぎるリンカーによって軽鎖可変ドメイン（V_L）に連結された重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。従って、１つのフラグメントのV_HおよびV_Lドメインが、別のフラグメントの相補的なV_LおよびV_Hドメインと対合し、それによって２つの抗原結合部位を形成するするように仕向けられる。単鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）二量体の使用により二重特異的抗体を作製するための別のストラテジーもまた、報告されている。Ｇｒｕｂｅｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５２：５３６８（１９９４）。

【０３６８】

２つを超える結合価を有する抗体が意図される。例えば、三重特異的抗体が調製され得る。Ｔｕｔｔら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０（１９９１）。

【０３６９】

例示的な二重特異的抗体は、本明細書中の所定のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド上の２つの異なるエピトープに結合し得る。あるいは、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２ポリペプチドアーム、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２ポリペプチドアーム、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５ポリペプチドアーム、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４ポリペプチドアームまたは抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドアームが、Ｔ細胞レセプター分子（例えば、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ２８、またはＢ７）、またはＩｇＧのＦｃレセプター（Ｆｃ　Ｒ）（例えば、ＦｃＲＩ（ＣＤ６４）、Ｆｃ　ＲＩＩ（ＣＤ３２）、およびＦｃ　ＲＩＩＩ（ＣＤ１６）のような、白血球上の分子を誘発するように結合するアームと結合され得る。その結果、細胞は、特定のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドを発現する細胞に対する細胞性の防御機構に対して集中されられる。二重特異的抗体はまた、特定のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドを発現する細胞に対して細胞傷害性薬剤を局在化させるために使用され得る。これらの抗体は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２結合アーム、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２結合アーム、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５結合アーム、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４結合アームまたはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２結合アーム、およびＥＯＴＵＢＥ、ＤＰＴＡ、ＤＯＴＡ、またはＴＥＴＡのような細胞傷害性薬剤または放射性核種キレーターに結合するアームを保有する。目的の別の二重特異的的抗体は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドに結合し、そしてさらに組織因子（ＴＦ）に結合する。

【０３７０】

（５．ヘテロ結合体抗体）

ヘテロ結合体抗体もまた、本発明の範囲内である。ヘテロ結合体抗体は、２つの共有的に連結された抗体から構成される。このような抗体は、例えば、所望されない細胞に対して免疫システムの細胞を標的化するため（米国特許第４，６７６，９８０号）、そしてＨＩＶ感染の処置のため（第WO９１／００３６０号；同第WO９２／２００３７３号；第ＥＰ　０３０８９号）に提案されている。抗体が、架橋剤を含む方法を含む、合成タンパク質化学における公知の方法を使用してインビトロで調製され得ることが意図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を使用して、またはチオエーテル結合を形成することによって、構築され得る。この目的のための適切な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル－４－メルカプトブチルイミデート、ならびに、例えば、米国特許第４，６７６，９８０号に開示されている試薬が挙げられる。

【０３７１】

（６．エフェクター機能の操作）

例えば、ガンの処置における抗体の有効性を増強するために、エフェクター機能に関して本発明の抗体を改変することが所望され得る。例えば、システイン残基が、Ｆｃ領域に導入され得、それによってこの領域中での鎖間ジスルフィド結合形成を可能にする。このように生成されたホモ二量体抗体は、改善されたインターナライゼーション能力、ならびに／または増大させられた補体によって媒介された細胞殺傷、および抗体依存性の細胞性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を有し得る。Ｃａｒｏｎら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７６：１１９１－１１９５（１９９２）およびＳｈｏｐｅｓ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：２９１８－２９２２（１９９５２）を参照のこと。増強された抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体もまた、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の架橋リンカーを使用して調製され得る。あるいは、二重のＦｃ領域を有し、そしてそれによって増強された補体溶解およびＡＤＣＣ能力を有し得る抗体が、操作され得る。Ｓｔｅｖｅｎｓｏｎら、Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｓｉｇｎ，３：２１９－２３０（１９８９）を参照のこと。

【０３７２】

（７．免疫結合体）

本発明はまた、化学療法剤、毒素（例えば、酵素的に活性である、細菌、真菌、植物、または動物起源の毒素、あるいはそれらのフラグメント）あるいは放射活性な同位元素（すなわち、放射活性結合体）のような細胞傷害性の薬剤に対して結合体化した抗体を含む、免疫結合体に関する。

【０３７３】

このような免疫結合体の生成に有用な化学療法剤が、上記に記載されている。使用され得る酵素的に活性な毒素およびそれらのフラグメントとしては、以下が挙げられる：ジフテリアのA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、エキソトキシンA鎖（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン（ｍｏｄｅｃｉｎ）A鎖、α－サリシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ　ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチン（ｄｉａｎｔｈｉｎ）タンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃａ　ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、およびＰＡＰ－Ｓ）、ｍｏｍｏｒｄｉｃａ　ｃｈａｒａｎｔｉａインヒビター、カルシン（ｃａｒｃｉｎ）、クロチン（ｃｒｏｔｉｎ）、ｓａｐａｏｎａｒｉａ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓインヒビター、ゲロニン、ミトギリン（ｍｉｔｏｇｅｌｉｎ）、レストリクトシン（ｒｅｓｔｒｉｃｔｏｃｉｎ）、フェノマイシン（ｐｈｅｎｏｍｙｃｉｎ）、エノマイシン（ｅｎｏｍｙｃｉｎ）、およびトリコセシン（ｔｒｉｃｏｔｈｅｃｅｎｅ）。種々の放射性核種が、放射活性を結合された抗体の産生に利用可能である。例としては^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{131}Ｉｎ、^{90}Y、および^{186}Ｒｅが挙げられる。

【０３７４】

抗体と細胞傷害性薬剤との結合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤（例えば、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオール）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデート（ｄｉｍｅｔｈｙｌａｄｉｐｉｍｉｄａｔｅ）（ＨＣＬ））、活性なエステル（例えば、ジスクリンイミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス－アジド化合物（例えば、

ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン２，６－ジイソシアネート）、およびビス活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン））を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Ｖｉｔｅｔｔａら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３８：１０９８（１９８７）に記載されているように調製され得る。炭素－１４－標識１－イソチオシアネートベンジル－３－メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）が、抗体に対する放射性核種の結合のための例示的なキレート剤である。第ＷＯ９４／１１０２６号を参照のこと。

【０３７５】

別の実施形態においては、抗体は、腫瘍の予備標的化における利用のための「レセプター」（例えば、ストレプトアビジン）に対して結合され得る。ここでは、抗体－レセプター結合体が患者に対して投与され、続いて、キレート剤を使用して循環から結合していない結合体が除去され、次いで、細胞傷害性薬剤（例えば、放射性核種）に対して結合された「リガンド」（例えば、アビジン）の投与が行われる。

【０３７６】

（８．免疫リポソーム）

本明細書中に開示されている抗体はまた、免疫リポソームとして処方され得る。抗体を含有するリポソームが、Ｅｐｓｔｅｉｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８２：３６８８（１９８５）；Ｈｗａｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７：４０３０（１０９８）；ならびに米国特許第４，４８５，０４５号、および同第４，５４４，５４５号に記載されているように、当該分野で公知の方法によって調製される。循環時間が増強されたリポソームが、米国特許第５，０１３，５５６号に開示されている。

【０３７７】

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、およびＰＥＧで誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）を含有する脂質組成物を用いて、逆相蒸発方法によって生成され得る。リポソームは、所望の

直径を有するリポソームを得るために、規定された孔の大きさのフィルターを通じて押し出される。本発明の抗体のＦａｂ’フラグメントは、Ｍａｒｔｉｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２５７：２８６－２８８（１９８２）に記載されているように、ジスルフィド鎖間反応を通じてリポソームに対して結合体化され得る。化学療法剤（例えば、ドキソルビシン）が、必要に応じて、リポソーム中に含まれる。Ｇａｂｉｚｏｎら、Ｊ．Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔ．，８１（１９）：１４８４（１９８９）を参照のこと。

【０３７８】

（９．抗体の薬学的組成物）

本明細書中で同定されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドを特異的に結合する抗体、ならびに本明細書中で上記で開示されるスクリーニングアッセイによって同定された他の分子が、薬学的組成物の形態で種々の障害の処置のために投与され得る。

【０３７９】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドが細胞内にあり、そして抗体全体がインヒビターとして使用される場合は、インターナライズ抗体は好ましい。しかし、リポフェクションまたはリポソームもまた、細胞中に抗体または抗体フラグメントを送達するために使用され得る。抗体フラグメントが使用される場合は、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最も小さい阻害性フラグメントが好ましい。例えば、抗体の可変領域の配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持しているペプチド分子が設計され得る。このようなペプチドは、化学的に合成され得、および／または組換えＤＮＡ技術によって産生され得る。例えば、Ｍａｒａｓｃｏら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：７８８９－７８９３（１９９３）を参照のこと。本明細書中の処方物もまた、処置される特定の指標に必要である場合、１つを超える活性な化合物（好ましくは、互いに有害な影響を与えない相補活性を有する化合物）を含み得る。あるいは、またはさらに、この組成物は、その機能

を増強する薬剤（例えば、細胞傷害性薬剤、サイトカイン、化学療法剤、または増殖阻害因子）を含み得る。このような分子は、意図される目的のために有効である量で組合せられて、適切に存在する。

【０３８０】

有効成分はまた、例えば、コアセルベーション技術によって、または境界の重合（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース、またはゼラチンマイクロカプセル、およびポリ－（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）によって調製されたマイクロカプセル中に、コロイド状薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）中に、またはマイクロエマルジョン中に捕捉され得る。このような技術は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、前出に開示されている。

【０３８１】

インビボでの投与に使用される処方物は、滅菌でなければならない。これは、滅菌の濾過膜を通じた濾過によって容易に達成される。

【０３８２】

徐放調製物が調製され得る。徐放調製物の適切な例としては、抗体を含む固体の疎水性ポリマーの半透性のマトリクスが挙げられる。このマトリクスは、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルのような、成形された物の形態である。徐放マトリックスの例としては、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）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸およびγエチル－Ｌ－グルタミン酸のコポリマー、非分解性のエチレンビニルアセテート、分解性の乳酸－グリコール酸コポリマー（例えば、ＬＵＰＲＯＮ　ＤＥＰＯＴ（登録商標））（乳酸－グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なマイクロスフェア）、およびポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン－ビニルアセテートおよび乳酸－グリコール酸のようなポリマーは、１００日を越えて分子を放出することが可能であるが、特定のヒドロゲルは、より短い期間の間タンパク質を放出する。カプセル化された抗

体が長期間の間体内に留まる場合は、これらは、３７℃で水分に対する曝露の結果として、変性し得るかまたは凝集し得、それによって生物学的活性の欠失および免疫原性における可能性のある変化を生じる。合理的なスラテジーが、関与する機構に依存して安定化のために考案され得る。凝集機構が例えば、チオ－ジスルフィド交換を通じた分子内Ｓ－Ｓ結合の形成であると発見される場合は、安定化は、スルフヒドリル残基を改変すること、酸性の溶液から凍結乾燥させること、水分含有量を制御すること、適切な添加剤を使用すること、および特異的なポリマーマトリックス組成物を開発することによって達成され得る。

【０３８３】

（Ｉ．抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体の使用）

本発明の抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体は、種々の有用性を有する。例えば、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の診断アッセイ（例えば、特定の細胞、組織、または血清中でのその発現を検出すること）において使用され得る。当該分野で公知の種々の診断アッセイ技術（例えば、競合結合アッセイ、直接または間接的なサンドイッチアッセイ、および不均質な相または均質な相のいずれかの中で行われる免疫沈降アッセイ）が使用され得る（Ｚｏｌａ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．（１９８７）、１４７－１５８頁）。診断アッセイにおいて使用される抗体は、検出可能な部分を用いて標識され得る。検出可能な部分は、直接または間接的に、検出可能なシグナルを産生し得るはずである。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、または^{125}Ｉ）、蛍光、または化学発光化合物（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、またはルシフェリン）、あるいは酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、また

は西洋ワサビペルオキシダーゼ）であり得る。検出可能な部分に対して抗体を結合体化するための当該分野で公知の任意の方法が使用され得る。これらとしては、Ｈｕｎｔｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ，１４４：９４５（１９６２）；Ｄａｖｉｄら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１３：１０１４（１９７４）；Ｐａｉｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．，４０：２１９（１９８１）；およびＮｙｇｒｅｎ，Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．ａｎｄ Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．，３０：４０７（１９８２）によって記載されている方法が挙げられる。

【０３８４】

抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２抗体はまた、組換え細胞培養物または天然の供給源からのＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のアフィニティー精製のために有用である。このプロセスにおいては、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２に対する抗体は、適切な支持体（例えば、Ｓｅｐｈａｓｅｘ樹脂または濾紙）上に、当該分野で周知の方法を使用して固定化される。次いで、固定化された抗体は、精製されるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２を含むサンプルと接触させられ、その後、この支持体が、固定された抗体に結合させられているＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２を除く、サンプル中の実質的に全ての材料を除去する適切な溶媒で洗浄される。最後に、この支持体が、抗体からＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２を解離させる別の適切な溶媒で洗浄される。

【０３８５】

（Ｊ．診断剤としての遺伝子の使用）

本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－Ｍ

Ｇ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする遺伝子を診断剤として使用することに関する。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの変異形態の検出は、脈管形成疾患（例えば、腫瘍）または脈管形成疾患に対する感受性の診断を可能にする。なぜなら、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドにおける変異は、腫瘍を引き起こし得るからである。

【０３８６】

ヒトＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする遺伝子の変異を有する個体は、種々の技術によりＤＮＡレベルで検出され得る。診断のための核酸は、患者の細胞（例えば、血液、尿、唾液、組織生検、および剖検材料）から得られ得る。ゲノムＤＮＡが検出のために直接用いられ得るか、または分析する前にＰＣＲ（Ｓａｉｋｉら、Ｎａｔｕｒｅ，３２４：１６３－１６６（１９８６））を使用することにより酵素的に増幅され得る。ＲＮＡまたはＤＮＡはまた、同じ目的で使用され得る。例として、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする遺伝子に相補的なＰＣＲプライマーは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド変異を同定および分析するために使用され得る。例えば、欠失および挿入は、正常の遺伝子型と比較して、増幅した産物のサイズの変化により検出され得る。点変異は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする放射性標識ＲＮＡに、あるいは代わりに、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする放射性標識アンチセンスＤＮＡ配列に、増幅したＤＮＡをハイブリダイズすることにより同定され得る

。完全に適合した配列は、ＲＮａｓｅＡ消化により、または融解温度の差により不適合二重鎖から区別され得る。

【０３８７】

ＤＮＡ配列差に基づく遺伝子鑑定（ｇｅｎｅｔｉｃ　ｔｅｓｔｉｎｇ）は、変性剤ありまたはなしで、ゲル中のＤＮＡフラグメントの電気泳動移動度における変化の検出により達成され得る。小さな配列の欠失および挿入は、高分離ゲル電気泳動により可視化され得る。異なる配列のＤＮＡフラグメントは、変性ホルムアミド勾配ゲル上で区別され得、このゲル中で、異なるＤＮＡフラグメントの移動度は、特異的融解温度または部分的融解温度に従って、異なる位置でゲルに妨げられる。例えば、Ｍｙｅｒｓら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３０：１２４２（１９８５）を参照のこと。

【０３８８】

特定の位置における配列変化はまた、ヌクレアーゼ保護アッセイ（例えば、ＲＮａｓｅおよびＳ１保護アッセイ）または化学的切断法（例えば、Ｃｏｔｔｏｎら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．８５：４３９７－４４０１（１９８５））により明らかにされ得る。

【０３８９】

従って、特定のＤＮＡ配列の検出は、ハイブリダイゼーション、ＲＮａｓｅ保護、化学的切断、直接ＤＮＡ配列決定のような方法、または制限酵素（例えば、制限フラグメント長多型（ＲＦＬＰ））およびゲノムＤＮＡのサザンブロッティングの使用により、達成され得る。

【０３９０】

（Ｋ．ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドレベルを検出するための使用）

より従来的なゲル電気泳動およびＤＮＡ配列決定に加えて、インサイチュ分析により変異もまた検出され得る。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドをコードする核酸の発現は、腫瘍形成に関連した脈管疾患ま

たは新生血管形成に関連し得る。疑われる組織または腫瘍塊のサンプル（例えば、生検）を、抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド抗体と接触させて、腫瘍形成と関連した脈管疾患または新生血管形成を診断し得る。なぜなら、このＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドのレベルの変化は、このような障害を示し得るからである。競合アッセイが使用され得、ここで、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドに特異的な抗体は、固体支持体に結合され、そして標識したＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドおよび適切に処理した被験体由来サンプルを、固体支持体に通過させ、ここでこの固体支持体に結合した、検出されたレベルの量は、サンプル中のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドの量と相関し得る。

【０３９１】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２　ｍＲＮＡの発現は、本明細書中で開示されるように脈管形成と相関するので、別の実施形態において、本発明のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２特異的核酸は、腫瘍形成と関連した脈管疾患または新生血管形成を診断または検出するために、ＲＮＡ検出または定量法（例えば、インサイチュハイブリダイゼーションまたはＰＣＲ増幅）において使用され得る。

【０３９２】

（Ｌ．処置される脈管形成障害の型）

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、あるいは

それらに対するアゴニストまたはアンタゴニスト（本明細書中に記載の心臓血管アッセイ、脈管形成アッセイおよび内皮細胞アッセイにおいて活性を有する）は、種々の脈管形成障害（脈管に影響を及ぼす全身的疾患（例えば、糖尿病）が挙げられる）における治療的用途を有するようである。それらの治療的利用性としては、動脈、毛細管、静脈、および／またはリンパ管の疾患が挙げられる。従って、本発明の化合物は、所望でない過剰な新生血管形成により特徴付けられる疾患または障害の処置における使用を有する。血管または脈管形成機能不全としては、血管自体（例えば、動脈、毛細管、静脈、および／またはリンパ管）の疾患がさらに挙げられる。これは、脈管形成、心臓血管新生、および／または新生血管形成を刺激する徴候、ならびに脈管形成、心臓血管新生、および／または新生血管形成を阻害する徴候を含む。このような障害としては、以下が挙げられる：例えば、動脈の疾患（例えば、アテローム硬化症、高血圧、炎症性脈管炎、レーノー病、レーノー症候群、動脈瘤、および動脈再狭窄；静脈およびリンパ障害（例えば、血栓性静脈炎、リンパ管炎、およびリンパ水腫）；および他の脈管障害（例えば、末梢脈管疾患、血管腫瘍（例えば、血管腫（毛細管および海綿）、グロムス（ｇｌｕｍｕｓ）腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症状、血管内皮腫（ｈａｅｍａｎｇｉｏｅｎｄｏｔｈｅｌｉｏｍａ）、血管肉腫、血管周皮細胞腫（ｈａｅｍａｎｇｉｏｐｅｒｉｃｙｔｏｍａ）、カポジ肉腫、リンパ管腫、およびリンパ管肉腫）のような癌）、腫瘍脈管形成；外傷（例えば、創傷、熱傷、および他の傷害組織）、インプラント固定、瘢痕化、虚血再灌流傷害、慢性関節リウマチ、感染、網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、甲状腺過形成（ｔｈｙｒｏｉｄ　ｈｙｐｅｒｐｌａｓｉａ）、グレーブス病、組織移植、慢性炎症、肺の炎症、肥満、脳血管疾患、腎臓病（例えば、急性腎不全）、および骨粗鬆症）。これはまた、アンギナ、心筋梗塞（例えば、急性心筋梗塞および心不全（例えば、鬱血性心不全））もまた含み得る。

【０３９３】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、あるいはそれらに対するアゴニストまたはアンタゴニストはまた、創傷治癒または組織再

生および関連する治療（例えば、結合組織、皮膚、骨、軟骨、筋肉、肺、または腎臓のような組織の再増殖に関係がある）を刺激するために、脈管形成を刺激するために、および血管平滑筋および内皮細胞生成の増殖を促進するために、ならびに同種移植片および異種移植片の結果を改善する使用され得る。脈管形成（ａｎｇｉｏｇｅｎｅｓ）の増大は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドにより媒介され、あるいはアンタゴニストは、虚血組織に対して、および冠動脈狭窄に続く心臓における側副冠動脈発生に対して有益である。アンタゴニストは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドが例えば、創傷治癒または肺線維症の間の過剰な結合組織の生成を促進する場合、このようなポリペプチドの作用を阻害するために、例えば、このような生成を制限するために使用され得る。これは、急性心筋梗塞および心不全、脈管構造の他の外傷、および筋肉消耗病（ｍｕｓｃｌｅ　ｗａｓｔｉｎｇ　ｄｉｓｅａｓｅ）の処置を含む。

【０３９４】

さらに、本発明は、根底にある原因にかかわらず、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド、あるいはそれに対するアゴニストまたはアンタゴニストの治療的な有効量を投与することによる、心臓肥大の処置に関する。目的がヒト患者の処置である場合、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドは、好ましくは、組換えヒトＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド（ｒｈＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチド）である。心臓肥大のための処置は、その種々の段階（この段階は、種々の多様な病理学的状態から生じ得る）のいずれにおいても行われ得る。この病理学的状態としては、心筋梗塞、高血圧、肥大型心

筋症、および弁逆流が挙げられる。この処置は、根底にある心臓障害にかかわらず、心筋の構造的損傷ありなしにかかわらず、心臓肥大の進行の全ての段階に拡張される。

【０３９５】

任意の特定の徴候について分子自体またはそのアゴニストを使用するかどうかの決定は、この分子に対するアンタゴニストとは異なって、本明細書中に記載の分子が、心臓血管新生、内皮細胞の発生、または脈管形成を促進するか、あるいはこれらの状態を阻害するか否かに主に依存する。例えば、この分子が、脈管形成を促進する場合、この分子のアンタゴニストは、脈管形成を制限するか、もしくは予防することが所望される障害の処置に有用である。このような障害の例としては、以下が挙げられる：脈管腫瘍（例えば、血管腫）、腫瘍脈管形成、網膜、脈絡膜、または角膜における新生血管形成（糖尿病性網膜症または未熟児網膜症または黄斑変性および増殖性硝子体網膜症（ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｖｅ ｖｉｔｒｅｏｒｅｔｉｎｏｐａｔｈｙ）と関連する）、慢性関節リウマチ、クローン病、アテローム硬化症、卵巣過剰刺激（ｏｖａｒｉａｎ ｈｙｐｅｒｓｔｉｍｕｌａｔｉｏｎ）、乾癬、新生血管形成と関連する子宮内膜症、バルーン血管形成術に続く再狭窄、瘢痕組織過剰生成（例えば、外科手術後に形成されるケロイドにおいて見られる）、心筋梗塞後の線維症、または肺線維症と関連した線維症病変。

【０３９６】

過剰な子宮内膜脈管形成は、子宮内膜の病因における重要な機構として提唱された。子宮内膜症を有する女性の子宮内膜は、腹腔における増殖、付着（ｉｍｐｌａｎｔ）および成長する能力の増大を有する。子宮内膜症を有する患者の子宮内膜は、増強した内皮細胞増殖を示す。細胞接着分子であるインテグリンαβ３は、正常な女性と比較した場合、子宮内膜症を有する女性の子宮内膜において、より多くの血管において発現される。まとめると、これらの結果により、正常被験体と比較した場合に、子宮内膜症を有する女性において増加した子宮内膜脈管形成の証拠が提示される（Ｈｅａｌｙら、Ｈｕｍ．Ｒｅｐｒｏｄ．Ｕｐｄａｔｅ ４（５）：７３６－４０（１９８８））。子宮内膜症は、本明細書中で議論さ

れるように、脈管形成疾患のファミリーの１つである。本明細書中で教示されるように、脈管形成の阻害は、このような疾患を処置することにおいて利益を提供する。

【０３９７】

しかし、この分子が脈管形成を阻害する場合、上記の状態の処置のために直接使用されることが予測される。

【０３９８】

他方、この分子が新脈管形成を刺激する場合、新脈管形成が所望される徴候（例えば、末梢血管疾患、高血圧、炎症性血管塩、Ｒｅｙｎａｕｄ疾患およびＲｅｙｎａｕｄ現象、動脈瘤、動脈再狭窄、血栓静脈炎、リンパ管炎、リンパ水腫、創傷治療および組織の回復、虚血再灌流障害、アンギナ、心筋梗塞（例えば、急性心筋梗塞）、慢性心臓病、心臓不全（例えば、うっ血性心不全）ならびに骨粗しょう症に対してその分子自体（またはそのアゴニスト）で使用される。

【０３９９】

しかし、この分子が新脈管形成を阻害する場合、そのアンタゴニストは、そのアンタゴニストが、新脈管形成が所望されるこれらの状態の処置に使用される。

【０４００】

本明細書中に記載される特定のタイプの疾患（ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニスト）は、血管関連薬物処置のために有用であるとして、または障害の処置もしくは予防のための治療標的として役立つ。アテローム硬化症は、脂質の蓄積、平滑筋細胞の増殖、および動脈壁内の繊維性組織の形成に起因する、動脈中での内部肥厚による斑の蓄積によって特徴付けられる疾患である。これらの疾患は、任意の器官中の大、中、および小の動脈に影響を与え得る。内皮細胞および血管の平滑筋細胞の機能の変化は、これらの斑の蓄積および退化を調節するのに重要な役割を果たすことで公知である。

【０４０１】

高血圧は、全身動脈、肺動脈、または門脈静脈系における血圧の上昇によって

特徴付けられる。上昇した圧力は、障害性内皮機能および／または血管疾患に起因し得るか、または結果として障害性内皮機能および／または血管疾患になる。

【０４０２】

炎症性血管炎（ｖａｓｃｕｌｉｔｉｄｅｓ）としては、巨細胞性動脈炎、Ｔａｋａｙａｓｕ動脈炎、多発性動脈炎（細血管異常性形態）、Ｋａｗａｓａｋｉ病、微視的多発性血管炎、Ｗｅｇｅｎｅｒ肉芽腫症、および種々の感染関連血管障害（ヘーノホ‐シェーンライン紫斑病を含む）が挙げられる。変質の内皮細胞機能は、これらの疾患に重要であることが示されている。

【０４０３】

Ｒａｙｎａｕｄ疾患およびＲａｙｎａｕｄ現象は、寒さに曝された末端を介した循環の断続的異常障害によって特徴付けられる。変質の内皮細胞機能は、この疾患において重要であることが示されている。

【０４０４】

動脈瘤は、変質の内皮細胞および／または血管平滑筋細胞に関連する動脈樹または静脈樹の嚢胞状拡張または紡錘状拡張である。

【０４０５】

動脈再狭窄（動脈壁の再狭窄）は、内皮および血管の平滑筋細胞の機能および増殖における変質の結果として以下の血管形成が生じ得る。

【０４０６】

血栓静脈炎およびリンパ組織炎は、静脈およびリンパそれぞれの炎症疾患であり、それは、変質の内皮細胞機能に起因し得、および／または結果として変質の内皮細胞機能を生じ得る。同様に、リンパ水腫は、内皮細胞機能に起因する障害性リンパ管を含む状態である。

【０４０７】

本明細書中において、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストの別の使用は、癌、および好ましくは血管癌の予防または処置である。癌の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：腺癌、リンパ腫、芽腫、黒色腫、肉腫、および白血病。これら

の癌のより具体的な例としては、以下が挙げられる：扁平上皮癌、小細胞肺癌、非細胞肺癌、胃腸癌、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、膵臓癌、グリア芽細胞癌、頚部癌、肝臓癌（例えば、肝性癌）、膀胱癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮膜癌、唾液腺癌、腎臓癌（例えば、腎細胞癌およびＷｉｌｍｓ癌），基底細胞癌，黒色腫，前立腺癌，外陰癌，甲状腺癌，精巣癌，食道癌，頭部癌および頚部癌の種々のタイプ。本明細書において、処置のための好ましい癌は、胸部、直腸、肺、黒色腫、卵巣、および上記の腫瘍新脈管形成に記載されるような血管癌を含むその他であり、これには、増殖および／または転移し得る腫瘍の血管新生が挙げられる。このプロセスは、新しい血管の成長に依存する。さらに、好ましい新生物および腫瘍新脈管形成に関連する状態の例としては、以下が挙げられる：乳癌，胃癌，食道癌，結腸直腸癌，肝臓癌，莢膜腫，男性胚腫，頚部癌，子宮内膜癌，子宮内膜過形成，子宮内膜症，線維肉腫，絨毛癌，鼻咽頭癌，喉頭癌，胚芽腫，Ｋａｐｏｓｉ肉腫，黒色腫，皮膚癌，血管腫，海綿状血管腫，血管芽腫，膵臓癌，網膜芽腫，星状細胞腫，受精卵核芽癌，神経鞘腫，乏突起膠腫，髄芽腫，神経芽腫，横紋筋肉腫，骨原性肉腫，平滑筋腫，　尿路癌，　甲状腺癌，Ｗｉｌm腫瘍，腎細胞癌，前立腺癌，母斑症に関連する異常血管増殖，水腫（例えば、脳腫瘍に関連する），ならびにメグズ症候群。本明細書中に含まれる、処置のための良性血管腫瘍のファミリーとしては、血管系の細胞エレメントの異常な増殖および成長に特徴付けられる。例えば、リンパ管は、通常、新生児において生じる、先天性、しばしば嚢胞性、リンパ性の形成異常である、リンパ系の良性腫瘍である。嚢胞性腫瘍は、隣接組織に増殖する傾向がある。通常、嚢胞性腫瘍は、頚部領域および腋窩領域において生じる。これらはまた、末端の軟部組織において生じ得る。主な症状は、拡張、しばしば網状、結合性組織によって取り囲まれた構造リンパ管およびリンパ球である。リンパ管腫は、不適切に連結された胚性リンパ管またはそれらの欠損によって生じると考えられる。この結果は、障害性局所リンパ廃液法（Ｇｒｉｅｎｅｒら、Ｌｙｍｐｈｏｌｏｇｙ　４：１４０－１４４（１９７１））である。

【０４０８】

本発明の方法の１実施形態において、ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－M

Ｇ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２アゴニストは、哺乳動物の腫瘍負荷を下げるのに必要な哺乳動物（例えば、ヒト患者）に投与される。新血管形成を阻害することによって、この化合物は、所望されない過剰の新生血管形成によって特徴付けられる疾患または障害の処置に有用であり、これには、以下が挙げられる：腫瘍、特に、本明細書中に記載されるような固体悪性腫瘍、および非新生物性障害（アンギナ、心筋梗塞（急性心筋梗塞）、および心不全（例えば、うっ血性心不全）が挙げられる）、乾癬、肥満および他の増殖網膜症（早熟の網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、甲状腺高血圧（Ｇｒａｖｅ疾患）、角膜移植および他の組織移植、慢性炎症、肺炎症、ネフローゼ症候群、子かん前症、腹水、心内膜液浸出（例えば、汎心炎に関連する）、胸水、リウマチ様動脈炎、アテローム硬化症、血管腫、肥胖病、および加齢性黄斑変性。

【０４０９】

加齢性黄斑変性（ＡＭＤ）は、高齢者における過酷な視覚損失の主な原因である。ＡＭＤの浸出形態は、慢性新生血管形成および網膜色素上皮細胞脱離によって特徴付けられる。慢性新血管形成は予後の劇的な悪化に関連するので、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストは、ＡＭＤの重篤度を抑えるのに有用であると期待される。

【０４１０】

創傷治癒および組織修復のような外傷の処置はまた、本明細書中のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストのための標的使用である。新しい血管の形成および退化は、組織の治癒および修復のために本質的である。このカテゴリーは、以下が挙げられる：骨、軟骨、腱、靱帯、および／または神経組織の成長または退化、ならびに創傷治癒および組織の修復および置換、火傷、切開、および潰瘍の処置。骨が、通常、形成されない状態において軟骨および／または骨の成長を誘導する、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．

６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストは、ヒトおよび他の動物の骨折ならびに軟骨の損傷または欠損の治癒に適用される。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストを使用するようなこのような調製物は、皮下骨折および開放骨折の減少において、ならびに人工関節の改良された固定化においてまた予防的に使用され得る。先天性、腫瘍誘導、または発癌性、切除誘導頭蓋顔面欠損などの修復に寄与する骨原性剤によって誘導された新規の骨形成は、美容形成手術において有用である。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストは、未治療創傷（褥瘡性潰瘍、血管不全に関する潰瘍、外科的創傷および外傷性創傷などが挙げられるが、これらに限定されない）の良好なまたは迅速な閉鎖を促進するために利用され得る。

【０４１１】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストはまた、他の組織（例えば、器官（例えば、膵臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚、または内皮）、筋肉（平滑、骨格、または心臓）、血管（血管内皮）組織）の発生または退化のため、あるいはこのような組織を含む細胞の増殖を促進するための活性を示し得る。この所望される効果の一部は、通常の組織が退化するのを可能にする繊維性の傷の阻害または調整により得る。

【０４１２】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストはまた、肺または肝臓線維症、種々の組織における再灌流障害、および全身性サイトカインのダメージから生じる状態に有用であり得る。また、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストはまた、前駆体組織または最上由来の上記組織の分化を促

進または阻害するため、あるいは上記の組織の増殖を阻害するために有用であり得る。

【０４１３】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストはまた、歯周疾患の処理および他の歯回復プロセスにおいて有用であり得る。このような薬剤は、骨形成細胞を引き付けるため、骨形成細胞の成長を刺激するため、または骨形成細胞の前駆体の分化を誘導するための環境を提供する。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストはまた、骨粗しょう症または変形性関節症において、例えば、骨の刺激および／または軟骨の修復を介して、または炎症プロセスによって媒介される炎症もしくは組織破壊のプロセスを遮断することによって有用であり得る。なぜならば、骨の代謝回転および成長の調整に重要な役割を果たすからである。

【０４１４】

本明細書のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストに起因し得る別の組織再生活性のカテゴリーは、腱／靭帯形成である。組織が正常に形成されない環境において、腱／靭帯様組織または他の組織形成は、ヒトおよび他の動物において、腱または靭帯断裂、変形、および他の腱または靭帯組断裂での適用を有する。このような調整は、腱または靭帯組織に対する損傷を予防する際の予防的使用、ならびに骨または他の組織に対する腱または靭帯の改善された固定化においての使用を有し得る。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストにより誘導される新規の腱／靭帯様組織形成は、先天性、腫瘍誘導、または他の起源の他の腱もしくは靭帯損傷の回復に寄与し、そしてまた、腱または靭帯の結合または回復のための美容形成外科において有用であり得る。本明細書

中の組成物は、腱または靭帯形成細胞を引き付けるため、腱または靭帯形細胞の増殖を刺激するため、腱または靭帯形成細胞の前駆体の分化を促進するため、または組織の修復に影響を与えるために、エキソビボ次にインビボで腱／靭帯細胞または前駆体の組織を誘導するために提供し得る。本明細書中の組成物は、腱炎、手根管症候群、および腱または靭帯欠損において有用であり得る。この組成物はまた、当該分野で周知のキャリアのような適切なマトリクスおよび／または隔離剤を含み得る。

【０４１５】

虚血再灌流は、別の徴候である。内皮細胞の機能障害は、次の虚血再灌流障害を発生する事象の後遺症の惹起および制御の両方において重要であり得る。

【０４１６】

リウマチ様動脈炎は、さらなる徴候である。血管系を介した炎症細胞の血管成長および標的は、リウマチ様動脈炎および動脈の血清陰性形態において重要な成分である。

【０４１７】

上記のように、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストが本明細書中に記載され、これは、内皮細胞の機能、増殖、および／または形成を変化させるか、または影響を与えることが示されており、これは、上記の多くのまたは全ての障害の病因学および病理学において重要な役割を果たし、これらのプロセスを増強または阻害するための治療標的としてまたはこれらの障害において標的する血管関連薬物のために有用であり得る。

【０４１８】

（Ｍ．投与プロトコール、スケジュール、用量、および処方）

本発明の分子ならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストは、上記のように種々の障害および疾患のための予防剤および治療剤として薬学的に有用である。抗原化合物（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、好ましくは、上記のように処方されそして投与される。

【０４１９】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストは、適切な純度の任意の薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１６版、Ｏｓｏｌ，Ａ．編（１９８０））を含む所望の分子を、凍結乾燥した処方物または水溶液の形態で混合することによって、保存のために調製される。適切なキャリア、賦形剤、または安定剤は、使用される用量および濃度でレシピエントに対して非毒性であり、そして以下を含む：緩衝液（例えば、リン酸、クエン酸、および他の有機酸）；抗酸化剤（アスコルビン酸およびメチオニン）；保存剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンズアルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン（例えば、メチルまたはプロピルパラベン）；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；およびｍ－クレゾール）；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、またはイムノグロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン）；モノサッカリド、ジサッカリド、および他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリン）；キレート剤（例えば、ＥＤＴＡ）；糖（例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール）；脂質（例えば、カチオン性脂質）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；金属錯体（例えば、Ｚｎタンパク質錯体）；および／または非イオン性界面活性剤（例えば、ＴＷＥＥＮ™、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ™またはポリエチレングリコール（ＰＥＧ））。

【０４２０】

このようなキャリアのさらなる例としては、以下が挙げられる：イオン交換樹脂、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レクチン、血清タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン）、緩衝物質（例えば、リン酸、グリシン、ソルビン酸、

ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩、または電解質（例えば、硫酸カリウム、硫酸水素二ナトリウム、硫酸水素カリウム、塩化ナトリウム、鉛塩、コロイダルシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースベース物質、およびポリエチレングリコール））。アンタゴニストの局所またはゲルベースの形態のためのキャリアとしては、以下が挙げられる：ナトリウムカルボキシメチルセルロースまたはメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリアクリレート、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンブロックポリマー、ポリエチレングリコールおよびウッドワックスアルコール。全ての投与のために、従来の貯蔵形態が適切に使用される。このような形態には、例えば、マイクロカプセル、ナノカプセル、リポソーム、軟膏剤、吸入形態、鼻スプレー、舌下錠剤、および徐放調製物が挙げられる。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはアンタゴニストもしくはアゴニストは、代表的に、約０．１ｍｇ／ｍｌ～１００ｍｇ／ｍｌの濃度でこのようなビヒクル中で処方される。

【０４２１】

インビボ投与のために使用される、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはアンタゴニストは、滅菌されなければならない。これは、凍結乾燥および再構成の前、またはその後に、滅菌濾過膜を介して濾過することによって容易に達成される。本明細書中に記載の治療組成物は、一般に、滅菌アクセスポート、例えば、静脈内溶液バックまたは皮下組織注入針によって刺されたストッパーを有するバイアルを有する容器に配置される。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドは、通常、全身的に投与される場合、凍結形態または溶液中に保存される。凍結形態において、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストは、代表的に、使用時に、適切な希釈剤と共に再構築のための

他の成分と組合せて処方される。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはアンタゴニストの液体処方物の例は、続く注入のための単回用量バイアル中に充填した滅菌、透明、無色の非保存溶液である。繰返し使用のために適切な保存薬学的組成物は、例えば主に、徴候および以下のポリペプチドのタイプに依存して含み得る：ａ）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドまたはそのアンタゴニストもしくはアゴニスト；ｂ）溶液中のポリペプチドまたは他の分子の最大の安定度の範囲でｐＨ（好ましくは、４～８）を維持し得る緩衝液；ｃ）凝集を誘導する攪拌に対してポリペプチドまたは分子を主に安定化するための洗浄剤／界面活性剤；ｄ）等張剤；ｅ）フェノール、ベンジルアルコールおよびベンズエトニウムハライド（例えば、クロリド）の群から選択される保存剤；およびｆ）水。

【０４２２】

使用した界面活性剤は、非等張性であり、それは、例えば、ポリソルベート（例えば、ＰＯＬＹＳＯＲＢＡＴＥ™（ＴＷＥＥＮ™）２０、８０など）またはポリキサマー（例えば、ＰＯＬＹＸＡＭＥＲ™１８８）であり得る。非等張性界面活性剤の使用は、ポリペプチドを変性することなく、表面圧を剪断するように、処方物を曝すことを可能にする。さらに、このような界面活性剤含有処方物は、肺性使用および針なしジェット注入銃で使用されるデバイスのような、エアロゾルデバイスにおいて使用され得る。

【０４２３】

等張化剤（ｉｓｏｔｏｎｉｆｉｅｒ）は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドまたはこれらに対するアンタゴニストの液体組成物の等張性を確実にするために存在し得、これらとしては、多価糖アルコール、好ましくは３価以上の多価糖アルコール（例えば、グリセリン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、およびマンニトール）が挙げられる。これらの糖アルコールは、単独または組み合わせて使用され得る。ある

いは、塩化ナトリウムまたは他の適切な無機塩が使用されて、この溶液を等張性にし得る。

【０４２４】

例えば、この緩衝液は、所望のｐＨに依存して、アセテート緩衝液、シトレート緩衝液、スクシネート緩衝液またはホスフェート緩衝液であり得る。本発明の１つの型の液体処方物のｐＨは、約４～８の範囲で、好ましくはおおよそ生理学的ｐＨの範囲で緩衝化される。

【０４２５】

保存剤のフェノール、ベンジルアルコール、およびハロゲン化ベンゼトニウム（例えば、塩化ベンゼトニウム）は、使用され得る抗菌剤であることが公知である。

【０４２６】

塩を形成し下文において有用である分子の薬理学的に受容可能な塩の例としては、アルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩）、アルカリ土類金属塩（例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩）、アンモニウム塩、有機塩基塩（例えば、ピリジン塩、トリエチルアミン塩）、無機酸塩（例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩）、および有機酸塩（例えば、酢酸塩、シュウ酸塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩）が挙げられる。

【０４２７】

投与経路は、例えば、静脈内経路、腹腔内経路、大脳内経路、脳脊髄内経路、眼内経路、関節内経路、滑液内経路、鞘内経路、動脈内経路、もしくは病変内経路による注射または注入、経口投与、局所投与、あるいは徐放システムによるような、公知の方法に従う。本発明の化合物はまた、腫瘍内経路、腫瘍周囲経路、病変内経路、病変周囲経路にによって適切に投与され、局所治療効果ならびに全身治療効果を発揮する。腹腔内経路は、例えば、卵巣腫瘍の処置において特に有用であると予想される。この処方物はまた、反復の静脈内（ｉ．ｖ．）、皮下（ｓ．ｃ．）、もしくは筋内（ｉ．ｍ．）注射としてか、または鼻腔内送達もしくは肺内送達に適切なエアロゾル処方物として投与され得る（肺内送達に関しては、例えば、ＥＰ　２５７，９５６を参照のこと）。ペプチドまたは小さい分子が

アンタゴニストまたはアゴニストとして使用される場合、これらは、好ましくは液体または固体の形態で経口投与される。

【０４２８】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドはまた、徐放性調製物の形態で投与され得る。徐放性調製物の適切な例としては、タンパク質を含む固体の疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、成形された物（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態である。徐放性のための組換えタンパク質のマイクロカプセル化は、ヒト増殖ホルモン（ｒｈＧＨ）、インターフェロン－（ｒｈＩＦＮ－）、インターロイキン－２、およびMNｒｇｐｌ２０を用いて好首尾に実行されている。Ｊｏｈｎｓｏｎら、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．、２：７９５－７９９（１９９６）；Ｙａｓｕｄａ、Ｂｉｏｍｅｄ．Ｔｈｅｒ．、２７：１２２１－１２２３（１９９３）；Ｈｏｒａら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、８：７５５－７５８（１９９０）；Ｃｌｅｌａｎｄ「Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｓｉｎｇｌｅ Ｉｍｍｕｎｉｚａｔｉｏｎ Ｖａｃｃｉｎｅｓ Ｕｓｉｎｇ Ｐｏｌｙｌａｃｔｉｄｅ Ｐｏｌｙｇｌｙｃｏｌｉｄｅ Ｍｉｃｒｏｓｐｈｅｒｅ Ｓｙｓｔｅｍｓ」Ｖａｃｃｉｎｅ Ｄｅｓｉｇｎ：Ｔｈｅ Ｓｕｂｕｎｉｔ ａｎｄ Ａｄｊｕｖａｎｔ Ａｐｐｒｏａｃｈ、ＰｏｗｅｌｌおよびＮｅｗｍａｎ、編（Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ：Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９９５）４３９－４６２頁；ＷＯ ９７／０３６９２、ＷＯ ９６／４００７２、ＷＯ ９６／０７３９９；および米国特許第５，６５４，０１０号。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、Ｌａｎｇｅｒら、Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．、１５：１６７－２７７（１９８１）およびＬａｎｇｅｒ、Ｃｈｅｍ．Ｔｅｃｈ．、１２：９８－１０５（１９８２）によって記載されるようなポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号、ＥＰ ５８，４８１）、Ｌ－グルタミン酸とγエチル－Ｌ－グルタメートのコポリマー（Ｓｉｄｍａｎら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ、２２：５４７－５５６（１９８３））、非分解性エチレン

ビニルアセテート（Ｌａｎｇｅｒら、前出）、分解性乳酸－グリコール酸コポリマー（例えば、Ｌｕｐｒｏｎ　Ｄｅｐｏｔ™（乳酸－グリコール酸コポリマーおよびロイプロリドアセテート（ｌｅｕｐｒｏｌｉｄｅ　ａｃｅｔａｔｅ）から構成される注射可能なミクロスフェア））、およびポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸（ＥＰ　１３３，９８８）が挙げられる。ポリ乳酸－グリコール酸（ＰＬＧＡ）コポリマーを用いて開発された徐放性処方物は、その生体適合性および広範な生物分解性特性に起因して、好ましい。ＰＬＧＡの分解産物（乳酸およびグリコール酸）は、ヒト体内で迅速に清澄され得る。さらに、このポリマーの分解可能性は、その分子量および組成に依存して月から年に調節され得る。Ｌｅｗｉｓ「Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　ｒｅｌｅａｓｅ　ｏｆ　ｂｉｏａｃｔｉｖｅ　ａｇｅｎｔｓ　ｆｒｏｍ　ｌａｃｔｉｄｅ／ｇｌｙｃｏｌｉｄｅ　ｐｏｌｙｍｅｒ」：Ｍ．Ｃｈａｓｉｎ　ａｎｄ　Ｒ．Ｌａｎｇｅｒ（編）Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ　Ｐｏｌｙｍｅｒｓ　ａｓ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ：Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、１９９０）１－４１頁。

【０４２９】

エチレン－ビニルアセテートおよび乳酸－グリコール酸のようなポリマーは、１００日にわたって分子を放出し得るが、特定のヒドロゲルはタンパク質をより短い期間で放出する。カプセル化されたタンパク質が長期間の間体内に留まる場合は、これらは、３７℃で水分に対する暴露の結果として、変性し得るかまたは凝集し得、それによって生物学的活性の欠失および免疫原性における可能性のある変化を生じる。合理的なスラテジーが、関与する機構に依存してタンパク質安定化のために考案され得る。凝集機構が例えば、チオ－ジスルフィド交換を通じた分子内Ｓ－Ｓ結合の形成であると発見される場合は、安定化は、スルフヒドリル残基を改変すること、酸性の溶液から凍結乾燥させること、水分含有量を制御すること、適切な添加剤を使用すること、および特異的なポリマーマトリックス組成物を開発することによって達成され得る。

【０４３０】

徐放性のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド

組成物としてはまた、リポソーム的に捕捉されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドが挙げられる。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドを含むリポソームは、それ自体が公知の方法によって調製される：ＤＥ　３，２１８，１２１；Ｅｐｓｔｅｉｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８２：３６８８－３６９２（１９８５）；Ｈｗａｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７７：４０３０－４０３４（１９８０）；ＥＰ　５２，３２２；ＥＰ　３６，６７６；ＥＰ　８８，０４６；ＥＰ　１４３，９４９；ＥＰ　１４２，６４１；日本特許出願８３－１１８００８；米国特許第４，４８５，０４５号および同第４，５４４，５４５号；ならびにＥＰ　１０２，３２４。通常、リポソームは、小さい（約２００～８００オングストローム）単層状型であり（ここで、脂質内容物は約３０ｍｏｌ．％コレステロールよりも大きい）、選択された部分は最適な治療に調整される。

【０４３１】

治療有効量のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、アゴニスト、またはこれらに対するアンタゴニストは、当然、以下のような因子：処置（予防を含む）される病理学的状態、投与方法、処置に使用される化合物の型、関与する任意の同時治療、患者の年齢、体重、一般的な医学状態、病歴などに依存して変化し、そしてその投与は、十分に当業者の医師の範囲内である。従って、療法士は、投薬量を滴定し、そして最大の治療効果を得るのに必要とされるように投与経路を改変することが必要である。本治療の進行は、適切な臨床診断方法によって容易にモニターされる。動物実験は、ヒトの治療に有効な用量の決定のための信頼できる指針を提供する。有効用量の種間のスケーリングが、Ｍｏｒｄｅｎｔｉ，Ｊ．およびＣｈａｐｐｅｌｌ，Ｗ．「Ｔｈｅ ｕｓｅ ｏｆ ｉｎｔｅｒｓｐｅｃｉｅｓ ｓｃａｌｉｎｇ ｉｎ ｔｏｘｉｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ」Ｔｏｘｉｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｎｅｗ Ｄｒｕｇ Ｄ

ｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ，Ｙａｃｏｂｉら編、Ｐｅｒｇａｍｏｎ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　１９８９、４２－９６頁によって主張された原理に従って行われ得る。

【０４３２】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、そのアゴニストもしくはそのアンタゴニストのインビボでの投与が使用される場合は、通常の投与量は、投与の経路に依存して、１日当たり約１０ｎｇ／ｋｇから１００ｍｇ／ｋｇの哺乳動物の体重まで、またはそれ以上で、好ましくは、約１μｇ／ｋｇ／日から１０ｍｇ／ｋｇ／日で変化し得る。送達の特定の投与量および方法についての指針は、以下の文献に提供される。例えば、米国特許第４，６５７，７６０号；同第５，２０６，３４４号；または同第５，２２５，２１２号を参照のこと。異なる処方物が、異なる処置化合物および異なる障害について有効であると予想される。例えば、１つの器官または組織を標的化する投与は、別の器官または組織を標的化する様式とは異なる様式での送達を必然的に伴い得る。

【０４３３】

別の処方は、形成された物品中に本発明の化合物を組み込む工程を包含する。このような物品は、内皮細胞増殖、新脈管形成、および腫瘍浸潤および転移を調節するのに用いられ得る。この治療方法は、インプラントまたはデバイスとして、局所的、全身的、または局部的に、組成物を投与する工程を包含する。投与された場合、使用のための治療組成物は、パイロジェンフリーの、生理学的に受容可能な形態である。さらに、この組成物は、標的部位への送達のために、所望に応じてカプセル化されるか、または粘性形態で注射されてもよい。局所投与は、創傷治癒、組織修復、ならびに皮膚および口腔の病変および癌に適切であり得る。

【０４３４】

キットは、上記の障害および表記の診断および処置に有用である、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、またはそのアゴニ

ストもしくはアンタゴニストを含む製品を少なくとも含む。この製品は、例えば、ボトル（ビン）、バイアル、シリンジ、試験管、インプラントおよびポンプを含む、容器であり得る。この容器は、ガラス、またはプラスチックのような種々の材料から形成され得る。この容器は、状態を診断または処置するために有効である組成物を有し、そして滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、この容器は、皮下注射針によって穿刺可能な栓を有する静脈溶液バッグまたはバイアルであり得る）。この組成物中の活性因子は、本発明の化合物である。この容器上、または容器に関連するラベルは、この組成物が選り抜きの状態を診断または処置するために用いられることを示す。このキットはさらに第二の容器を備える。この第二容器は、薬学的に受容可能な緩衝液（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水、リンゲル液、およびデキストロース溶液）を含む。この容器はさらに、商業上および使用者の観点から所望される他の物（他の緩衝液、稀釈液、フィルター、ニードル、シリンジ、および使用上の注意を記載した添付文書を含む）を含み得る。このキットはまた、本明細書に記載の別の活性な因子を含む第二または第三の容器を含み得る。

【０４３５】

（Ｎ．併用療法）

問題の障害を予防または処置するのにおける、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド、またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストの有効性は、活性な因子を連続して、またはそれらの目的のために有効である別の因子と組合せて（同じ組成物中または別の組成物中のいずれかで）投与することによって、改善され得る。新脈管形成の正の調節因子としては、ａＦＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＧＦ－α、ＴＧＦ－β、ＨＧＦ、ＴＮＦ－α、アンギオゲニン、ＩＬ－８など（例えば、Ｆｏｌｋｍａｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：１０９３１～１０９３４（１９９２）およびＫｌａｇｓｂｒｕｎら、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．，５３：２１７～２３９（１９９１））、およびＶＥＧＦ（Ｆｅｒｒａｒａら、Ｅｎｄｏｃｒ．Ｒｅｖ．１８：４～２５（１９９７））が挙げられる。負の調節因子としては、トロンボスポンジン（Ｇｏｏｄら

、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，８７：６６２４～６６２８（１９９０））、プロラクチンの１６キロダルトンN末端フラグメント（Ｃｌａｐｐら、Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ，１３３：１２９２～１２９９（１９９３））、アンギオスタチン（Ｏ’Ｒｅｉｌｌｙら、Ｃｅｌｌ，７９：３１５～３２８（１９９４））、およびエンドスタチン（Ｏ’Ｒｅｉｌｌｙら、Ｃｅｌｌ，８８：２７７～２８５（１９９６））が挙げられる。疾患を予防または処置するのにおけるアゴニストの有効性は、このアゴニストを連続的に、またはこれらの目的に有効であるなお別の因子（例えば、免疫付着因子、リボザイム、アンチセンス因子、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）、酸性もしくは塩基性の線維芽増殖因子（ＦＧＦ）の新脈管形成活性を阻害もしくは中和し得る抗体、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、または肝細胞増殖因子）、組織因子の凝血活性を阻害もしくは中和し得る抗体、プロテインＣまたはプロテインＳ（１９９１年2月２１日公開、Ｅｓｍｏｎら、ＰＣＴ特許公開番号WO　９１／０１７５３、を参照のこと）、ＨＥＲ２レセプターに結合し得る抗体（１９８９年7月２７日公開、Ｈｕｄｚｉａｋら、ＰＣＴ特許公開番号　WO　８９／０６６９２、を参照のこと）、または１つ以上の従来の治療剤（例えば、アルキル化剤、葉酸拮抗薬、核酸代謝の代謝拮抗薬、抗生物質、ピリミジンアナログ、５－フルオロウラシル、シスプラチン、プリンヌクレオシド、アミン、アミノ酸、トリアゾールヌクレオシド、コルチコステロイドおよびタンパク質（例えば、アンギオスタチン、エンドスタチン、トロンボスポンジン、および第４血小板因子）など）と組合せて投与することによって改善され得る。例えば、腫瘍の血管新生は、併用療法でブロックされ得る。併用療法では、１つ以上のアンタゴニストが、例えば、腫瘍の壊死またはその転移病巣（もしあれば）を観察することによって決定されたとおり、治療上有効な量で腫瘍保有患者に投与される。この治療は、さらなる有利な効果が観察されなくなるか、または臨床評価で微小な腫瘍も転移病巣も示されなくなる時点まで、続けられる。このアンタゴニストは、単独でか、または補助因子（例えば、αインターフェロン、βインターフェロン、もしくはγインターフェロン、抗ＨＥＲ２抗体、ヘレグリン、抗ヘレグリン抗体、D因子、インターロイキン１（ＩＬ－１、インターロイキン２（ＩＬ－２）、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因

子（ＧＭ－ＣＳＦ））、または腫瘍中の微小血管凝血を促進する因子（例えば、抗プロテインＣ抗体、抗プロテインＳ抗体、またはＣ４ｂ結合タンパク質（Ｅｓｍｏｎら、ＰＣＴ特許公開番号ＷＯ　９１／０１７５３））と組合せて投与される。このような他の因子は、投与される組成物中に存在しても良く、または別々に投与されても良い。また、このアンタゴニストは、適切に連続して投与されるか、または温熱療法または放射線療法（照射または放射性物質の投与のいずれかを含む）と組合せて投与され得る。化学療法剤の例としては、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、マイトマイシン、ナイトロジェン・マスタード、クロラムブシル、メルファラン、シクロフォスファミド、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン（ＣＡ）、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）、フルオクスウリジン（５－ＦＵｄＲ）、メトトレキセート（ＭＴＸ）、コルヒチン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド、テニポシド、シスプラチン、およびジエチルスチルベストロール（ＤＥＳ）のような抗癌剤が挙げられるがこれらに限定されない。一般的には、Ｍｅｒｃｋ　Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｄｉａｇｎｏｓｉｓ　ａｎｄ　Ｔｈｅｒａｐｙ、第１５版、Ｂｅｒｋｏｗら編、１９８７，Ｒａｈｗａｙ，Ｎ．Ｊ．第１２０６～１２２８頁を参照のこと。

【０４３６】

この補助剤は、それらの有効性が種々であるので、従来の様式でマトリックススクリーニングにより腫瘍に対するそれらの影響を比較することが所望される。例えば、本発明のアンタゴニストおよび補助剤の投与は、所望の臨床効果が達成されるまで繰り返される。固形腫瘍が四肢または全身循環からの単離を受けやすい他の部位において見出される場合、本明細書中に記載される治療剤は、単離された腫瘍または器官に投与される。好ましい実施形態において、ＦＧＦ、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）またはＶＦＧＦアンタゴニスト（例えば、抗ＦＧＦ、抗ＶＥＧＦ、または抗ＰＤＧＦの中和抗体）は、本発明のアンタゴニスト化合物とともに患者に投与される。アンタゴニストでの処置は、創傷治癒または新生血管形成の間に一時中断され得、あるいは本発明のアゴニストは、このような利益を促進するために用いられ得る。

【０４３７】

他の指示において、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドあるいはそれらのアゴニストは、問題の欠損、創傷、または組織の処置に有益な他の薬剤と組み合わせられうる。これらの薬剤としては、本明細書中で議論されるように、ＥＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ－αまたはＴＧＦ－β、ＩＧＦ、ＦＧＦ、およびＣＴＧＦのような種々の増殖因子が挙げられる。

【０４３８】

さらに、癌を処置するために用いられるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドあるいはそれらのアンタゴニストは、上記で同定された細胞傷害性薬剤、化学療法剤、または増殖阻害薬剤とともに組合されうる。また、癌の処置に関しては、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２ポリペプチドあるいはそれらのアンタゴニストは、照射または放射活性物質の投与を含むか否かに拘わらず、連続的に、または放射線処置と組み合わせて適切に投与される。

【０４３９】

本発明の特定の好ましい実施形態は、以下を含む薬学的組成物を提供する：（ａ）１以上の抗遺伝子（ａｎｔｉｇｅｎｅ）化合物、および（ｂ）非抗遺伝子機構により機能する１以上の他の薬剤（例えば、議論される化学療法剤、脈管形成薬剤、または血管静止薬剤（ａｎｇｉｏｓｔａｔｉｃ　ａｇｅｎｔ））。2以上の組み合わせた化合物は、ともに、または逐次的に用いられ得る。

【０４４０】

別の関連する実施形態において、本発明の組成物は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２核酸に標的化される、１以上の抗遺伝子化合物（特にオリゴヌクレオチド）および第２の核酸標的に標的化される、１以上のさらなる抗遺伝子化合物を含みうる。抗遺伝子化合物の多数の例は、当該分野で公知で

ある。２以上の組み合わせた化合物は、ともに、または逐次的に用いられ得る。例えば、Ｉｍら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５９（４）：８６５－９００（１９９９）は、アンチセンスＶＥＧＦを用いた腫瘍増殖の阻害を報告した。この組換えアデノウイルスベクターＡｄ５ＣＭＶは、アンチセンス方向で野生型ＶＥＧＦ１６５　ｃＤＮＡのコード配列を有した。Ｕ－８７　ＭＧ悪性神経膠腫細胞のこのベクターでの感染は、内因性ＶＥＧＦ　ｍＲＮＡのレベルの減少を生じ、そしてＶＥＧＦタンパク質の標的化された二次形態の生成を強く減少させた。ヌードマウスで確立されたアンチセンスＶＥＧＦベクターの病変内注入を用いたｓ．ｃ．でのヒト神経膠腫腫瘍の処置は、腫瘍増殖を阻害した。Ｓｈａｒｍａら（Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０２（８）：１５９９－６０８（１９９８））は、構成性ＣＭＶ駆動アンチセンス構築物またはドキソルビシン誘導性アンチセンス構築物のいずれかを用いることによってパールカン発現をブロックすることにより、結腸癌腫細胞の増殖が顕著に弱められたことを報告した。ヒト結腸癌腫細胞により誘導された腫瘍異種移植片および高侵襲性マウス黒色腫細胞により誘導された腫瘍同種移植片両方において、パールカン抑制は、腫瘍増殖および新生血管形成の実質的な阻害を引き起こした。適切なヒト腫瘍または腫瘍細胞株異種移植片またはマウス同種移植片と組み合わせて、マウス系はまた、最大限に有効なＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の抗遺伝子化合物についてインビボでスクリーニングするための迅速な手段を提供する。

【０４４１】

本発明の化合物と組み合わせて投与される治療剤の有効量は、医師または獣医師の決定である。投薬量の投与および調節は、処置される状態の最大の管理を達成するために行われる。この用量は、さらに、使用される治療剤の型および処置される特定の患者のような因子に依存する。代表的には、少なくとも開始点として使用される量は、所定の治療剤が本発明の化合物なしで投与される場合、この治療剤と同じ用量である。

【０４４２】

本発明に従って、新脈管形成、脈管および血管新生条件は、抗遺伝子治療に十

分に適している（例えば、Ｔｈｏｍａｓら，Ｒａｄｉｏｇｒａｐｈｉｃ　１８（６）：１３７３－９４（１９９８）を参照のこと）。従って、脈管壁への局所遺伝子移行は、本明細書中に記載される新脈管形成関連疾患および障害を処置するための約束された代替物を提供する。血管および脈管壁は、前もってのアクセス性および新規な経皮的なカテーテルベースの処置方法のために、遺伝子治療のための最も簡単な標識である。脈管および介在性の放射線医学の技術はまた、ウイルスまたは非ウイルスのベクターのいずれか、または合成オリゴ化合物の最少侵襲的な、容易にモニターされる遺伝子送達に理想的に適している。組換え遺伝子は、エキソビボおよびインビボで送達され得る；後者のアプローチは、周知の開口手術的な経皮的注入または血管内カテーテルベースの方法に関連し得る。貫通し、ヒドロゲルでコートされ、そして２重のバルーンカテーテルがまた容易に使用され得る。遺伝子移入ノためのカテーテルシステムは、目的の細胞に限定されるトランスフェクションを用いて、正確な解剖学的な位置にベクターを送達し得、そして遠位部位へのベクターの送達（ｓｈｅｄｄｉｎｇ）、治療剤の全身的効果、および送達方法からの罹患率を最少にする。一方で、動脈壁への遺伝子移行はまた、外膜から、およびいくつかの状況において、筋肉内遺伝子送達から達成され得る。約束された治療効果が、脈管内皮増殖因子、線維芽細胞増殖因子、チミジンキナーゼ、ｐ５３、ｂｃｌ－ｘ、一酸化窒素シンターゼ、および網膜芽細胞腫に対する遺伝子の移入を用いる再狭窄の動物モデルにおいて得られている。また、増殖停止ホメオボックス遺伝子および転写因子または細胞サイクル調節タンパク質に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが、有益な治療効果を有するように産生された。抗原技術を使用する抗脈管形成腫瘍治療は、広範な（ｂｒｏａｄ－ｓｐｅｃｔｒｕｍ）作用、低い毒性、および直接的な内皮標的化の場合においては、薬物耐性の非存在を提供し得る。遺伝子治療は、強力な抗脈管形成物質の治療的徐放を達成するための潜在的な方法を提供する。より期間の投与のための代替（または組合せ治療）は、アンチセンス遺伝子を保有する組換えベクターである。例えば、脈管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）に対するアンギオスタイン、エンドスタインおよびアンチセンスｍＲＮＡ種をコードする遺伝子を保有するアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターは、試験された３つのヒト腫瘍細胞株に

効率的に形質導入した。ｒＡＡＶをコードするアンチセンスＶＥＧＦ　ｍＲＮＡでの形質導入は、内因性腫瘍細胞ＶＥＧＦの産生を阻害した（Ｎｇｕｙｅｎら，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，５８：（２４）：５６７３－７（１９９８））。以下の実施例は、例示のみの目的のために提供され、そしていずれの様式でも本発明の範囲を限定することを意図しない。

【０４４３】

本明細書に引用される全ての特許および参考文献は、本明細書中でその全体が参考として援用される。

【０４４４】

（実施例）

本実施例において言及する市販の試薬は、特に記載していない場合を除き、製造業者の使用説明書に従って使用した。以下の実施例中および本明細書中全体を通してＡＴＣＣ受託番号により示す細胞の供給源は、アメリカンタイプカルチャーコレクション（Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）である。

【０４４５】

（ヒトＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするｃＤＮＡクローンの単離）

３次元コラーゲンゲルの形成：内皮細胞による管形成は、新脈管形成および脈管形成の間の血管の発達における重要なプロセスである。ヒト臍帯内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）（増殖因子の存在下のコラーゲンゲル中で管形成を起こす）は、ニンビボで、内皮細胞の脈管形成環境を模倣し、新脈管形成および脈管形成についての十分に受容された系を提供する（正常および腫瘍性条件の両方で）。この３次元ゲルは、ゼラチンの表面上またはプラスチック上での増殖したＨＵＶＥＣが管形成を起こさないので、分化および内皮細胞の管への融合に必須である。

【０４４６】

簡潔には、ＨＵＶＥＣは、種々の条件下で増殖し、通常の脈管形成因子によるまたは腫瘍誘導因子による誘導を刺激する増殖因子の添加を伴って、または伴わず、管形成に対して誘導的または非誘導的である（コラーゲンフィルム（非誘導

的）またはコラーゲンゲル（誘導的）のいずれかにおいて）。示差的ｃＤＮＡスクリーニングを使用して、このプロセスに重要な遺伝子を同定した。内皮細胞遺伝子発現を定量化するために使用される特定の方法は、Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ａｎａｌｙｓｉｓ（ＱＥＡ；米国特許第５，８７１，６９７号）であった。ＨＵＶＥＣ総ＲＮＡが調製され、続いて、ｍＲＮＡ精製および二本鎖ｃＤＮＡ合成を行った。ｃＤＮＡを制限酵素対で消化して、ｃＤＮＡフラグメントを生成し、次いで、これらを、リンカーを用いて連結した。リンカーの特定の配列を保有するプライマー対を、ＰＣＲ反応における制限産物を増幅するために使用した。増幅産物の定量および同定は、調節遺伝子を明らかし、従って、新脈管形成に重要な遺伝子を同定した。

【０４４７】

管形成を以下のように達成した。コラーゲンゲルを、１０倍に濃縮したＭ１９９ストック、水、０．５３Ｍ　$NaHCO_3$、２００ｍＭ　Ｌ－グルタミン、Ｉ型コラーゲン、および１Ｍ　ＮａＯＨの１００：２７．７：５０：１０：７５０：６２．５の比（容量で）の氷冷溶液を一緒に混合することによって形成した。これを、ＨＵＶＥＣ細胞（3×10^6細胞／ｍｌの濃度での１Ｘ基礎培地中の）と、細胞１容量に対して４容量のゼラチン溶液の比で混合した。このゲルを、CO_2のないインキュベーター中での３７℃で３０分～１時間のインキュベーションによって形成させた。次いで、このゲルを、１％ＦＢＳ、１×ＩＴＳ、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、５０ｍｇ／ｍｌのアスコルビン酸、２６．５ｍＭ　$NaHCO_3$、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、および１００Ｕ／ｍｌストレプトマイシンを補充したＭ１９９からなる１Ｘ基礎培地に重ねた。管形成実験において、培養培地を、８０ｎＭ　ＰＭＡ、４０ｎＭ／ｍｌ　ｂＦＧＦおよび４０ｎＭ／ｍｌ　ＶＥＧＦで補充した。実験の並行セットにおいて、内皮細胞をＩ型コラーゲンの表面上、または８０ｎＭ　ＰＭＡ、４０ｎＭ／ｍｌ　ｂＦＧＦおよび４０ｎＭ／ｍｌ　ＶＥＧＦを伴うかまたは伴わない、１％ＦＢＳ、１×ＩＴＳ、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、５０ｍｇ／ｍｌのアスコルビン酸、２６．５ｍＭ　$NaHCO_3$、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、および１００Ｕ／ｍｌストレプトマイシンを補充したＭ１９９からなる１Ｘ基礎培地中のブタ皮膚ゼラチン（ＤＩＦＣＯ，ＵＳＡ）

上で培養した。示差的ｃＤＮＡスクリーニング実験（ＱＥＡ（または、Ｇｎｅｎ Ｃａｌｌｉｎｇ™, Ｃｕｒａｇｅｎ Ｃｏｒｐ.，ＵＳＡといわれる）による）について、ｍＲＮＡを、上記条件で、４時間、２４時間および４８時間インキュベートした細胞から単離した。

【０４４８】

以下のように、ｍＲＮＡを単離し、そしてｃＤＮＡを合成した。培地をコラーゲンのゲルの表面から吸引し、そしてこれらのゲルを、３容積のＴｒｉ－Ｒｅａｇｎｔ－ＬＳ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｅｎｔｅｒ, Ｃｉｎｃｉｎｎａｔｉ, ＯＨ）を含む５０ｍｌのポリペプチド管に断片化した。これらの管を、断続的に穏やかに攪拌しながら、２３℃で１０分間インキュベートした。これらの管を、全ての実験サンプルが回収されるまで、－８０℃で保存した。次いで、これらの管を、室温で解凍し、そしてｍＲＮＡを、製造者の使用書に従って、抽出した。ＲＮＡペレットを、ＤＥＰＣ処理水に再懸濁し、ＲＮＡ含量を、２６０ｎＭで分光光度法的に定量した。ＲＮＡサンプルを、－２０℃で保存した。ＧｅｎｅＣａｌｌｉｎｇ™分析のために使用するサンプルを、ドライアイス上でＣｕｒａｇｅｎ Ｃｏｒｐ.（Ｎｅｗ Ｈａｖｅｎ, ＣＴ）に送った。4時間、２４時間および４８時間の時点でのサンプルを、ＧｅｎｅＣａｌｌｉｎｇ™分析のために使用し、そして別個の実験において、８０ｎＭ ＰＭＡ、４０ｎＭ／ｍｌ ｂＦＧＦおよび４０ｎＭ／ｍｌ ＶＥＧＦで補充した１Ｘ基礎培地中のコラーゲンゲルにおいておよびＩ型コラーゲンの表面上で増殖させた、３０分、および2、4、8、１６、２４、３８ならびに４６．５時間の時点からのサンプル細胞を、Ｔａｑｍａｎ ＰＣＲ確認のために調製した。定量的な発現分析のために、ＤＮＡ汚染を、ＤＮＡｓｅ Ｉ（Ｐｒｏｍｅｇａ, Ｍａｄｉｓｏｎ, ＷＩ）で単離されたＲＮＡを処理することによって排除した。ポリ－Ａ＋ＲＮＡを、ビオチン化したオリゴ－ｄＴ－スオレプトアビジン磁気ビーズ方法（ＭＰＧ, ＬｉｎｃｏｌｎＰａｒｋ, ＮＪ）を使用するｍＲＮＡ精製キットを使用して全ＲＮＡの画分化、次いで、ｏｌｉｇｏ－ｄＴプライムされたｍＲＮＡ（Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ ＩＩ, Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）の逆転写によるｃＤＮＡ合成および第二の鎖合成によって調製した。末端リン酸除去を、Ａｒｔｉｃ

Ｓｈｒｉｍｐ Ａｌｋａｌｉｎｅ Ｐｈｏｓｐｈｔａｓｅ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を用いる処理、続いて、フェノール－クロロホルム抽出によるｃＤＮＡの精製によって達成した。ｃＤＮＡの収量を、ＰｉｃｏＧｒｅｅｎ色素（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｅｕｇｅｎｅ ＯＲ）を使用する蛍光比色法によって定量化した。二本鎖ＤＮＡを、６塩基対の認識部位を有する制限酵素の対を使用して消化した。４８より多い酵素対を、所定のＤＮＡにおける可能な配列のほとんどの代表的な包含が達成されるように、使用しそして選択した。特定のリンカーを使用するＰＣＲ増幅を、米国特許第５，８７１，６９７号に記載されるように実施した。最終ＤＮＡ産物を、９６℃に加熱することによって変性させ、そして６Ｍ尿素中の変性条件下で、超薄ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動にかけた。ＰＣＲ産物を、多色レーザー励起Ｎｉａｇａｒａ（Ｃｕｒａｇｅｎ Ｃｏｒｐ．，Ｈｅｗ Ｈｅａｖｅｎ ＣＴ）画像化システムを使用して産物上のＦＡＭ標識の存在によって可視化した。

【０４４９】

ＧｅｎｅＣａｌｌｉｎｇ分析は、完全一体化Ｗｅｂベースのインタラクティブバイオインフォマティクスデータ収集および分析スート（「ＧｅｎｅＳｃａｐｅ」と呼ばれる）を使用した。Ｎｉａｇａｒａゲルから得られたデータは、現在の統計的および数学的基準を使用する公的および独自のデータベースに対してＧｅｎｅＣａｌｌされ（ＧｅｎｅＣａｌｌｅｄ）（米国特許第５，８７１，６９７号）、そして遺伝子リストが、類似の遺伝子のリストであるｃＤＮＡフラグメントから生成され、これらの類似の遺伝子に、ｃＤＮＡフラグメントが、公知の配列においてそれを生成する制限酵素対のフラグメントのサイズおよび位置に基づいて、属し得る。遺伝子候補が得られ得ない場合、ｃＤＮＡフラグメントが、新規な推定遺伝子に属すると指定された。

【０４５０】

ＧｅｎｅＣａｌｌは、既知の遺伝子に属するｃＤＮＡフラグメントの可能性として規定された。ＧｅｎｅＣａｌｌは、目的の類似の遺伝子の既知の配列を使用して、以前に記載された（米国特許第５，８７１，６９７号；Ｓｈｉｍｋｅｔｓ

ら，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１７（８）：７９８－８０３（１９９９））ように毒作用プライマーを設計する毒作用反応において確認された。目的のｃＤＮＡフラグメントの切除は、ｃＤＮＡフラグメントがプライマーが設計される遺伝子に属することを確認した。

【０４５１】

ＧｅｎｅＣａｌｌがｃＤＮＡフラグメントについて得られなかった場合、新規な推定ｃＤＮＡフラグメントがＥ．ｃｏｌｉから溶出され、そして標準的なＴＡ－クローニングベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，ＣＡ）を使用して、Ｅ．ｃｏｌｉにサブクローニングされた。新規な推定ｃＤＮＡフラグメントを、次いで、配列決定し、そして得られた配列を、上記のような確認のための毒性プライマーを設計するために、使用した。

【０４５２】

独立した技術（Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ　ＲＴ－ＰＣＲ（Ｔａｑｍａｎ））によってＧｅｎｅＣａｌｌｉｎｇから発現データを確認するために、５’末端でレポーター蛍光色素および３’末端でクエンチャー蛍光色素で標識された遺伝子特異的ＰＣＲオリゴヌクレオチドプライマー対およびオリゴヌクレオチドプローブをＯｌｉｇｏ　４．０ソフトウェア（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｐｌｙｍｏｕｔｈ　ＭＮ）を使用して設計した。全ＲＮＡ（５０ｎｇ）を、５０ｍｌ　ＲＴ－ＰＣＲ反応混合物に、製造者のプロトコル（Ｒｏｃｈｅ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ．，Ｂｒａｎｃｈｂｕｒｇ，ＮＪ）に従って、添加した。熱サイクル条件は、４８℃で３０分間の１サイクル、９５℃で１０分間の１サイクル、９５℃で１５秒間の４０サイクル、６０℃で１分間のアニーリング、および２５℃で２分間の最終保持を含んだ。各遺伝子の発現についての標準曲線が、単層培養において増殖した静止ＨＵＶＥＣから単離された総ＲＮＡの標準調製物の一連の希釈によって生成された。データを、静止ＨＵＶＥＣ　ＲＮＡからの同じ遺伝子に対して規格化された折り畳み誘導として表現した。

【０４５３】

ＧｅｎｅＣａｌｌｉｎｇプロセスを、管形成における示差的に発現された遺伝

子の選択（ゲーティング）に使用した。実験設計を、８０ｎＭ　ＰＭＡ、４０ｎＭ／ｍｌ　ｂＦＧＦおよび４０ｎＭ／ｍｌ　ＶＥＧＦで補充した１Ｘ基礎培地中のＩ型コラーゲンの表面上で増殖した内皮細胞が管を形成しないが、むしろ単層として残っているという観察に基づいた。これらの細胞が、ゼラチン（変性コラーゲンの形態）上で増殖する場合、この結果がまた生じる。しかし、これらの細胞が、３次元コラーゲンゲル中に懸濁され、そして８０ｎＭ　ＰＭＡ、４０ｎＭ／ｍｌ　ｂＦＧＦおよび４０ｎＭ／ｍｌ　ＶＥＧＦで補充した１Ｘ基礎培地において増殖される場合、これらの細胞は、網目構造のような相互接続された管への同調的な分化を起こす。管状構造は、管腔様構造を含む。４時間で、大きな細胞内空胞を形成しているが、これらの細胞は、なおも丸い。２４時間で、これらの細胞は、細長くなり、そして多くの細胞が他の細胞と接触する。４８時間までに、これらの細胞は相互接続し、そして共通の管腔を共有する。この分化において役割を果たす遺伝子を選択するために、ＧｅｎｅＣａｌｌｉｎ差のアレイが、設定され、その結果、３－Ｄゲル環境において、２４時間と４時間との間、４８時間と４時間との間、または４８時間と２４時間との間で２倍より大きく変化したが、同じ２つの時間比較で２Ｄ（Ｉ型コラーゲンまたはゼラチンの表面）環境において変化しないかまたは２倍未満で変化したｃＤＮＡフラグメントが、優先的に選択されそして同定された。

【０４５４】

それらのＧｅｎｅＣａｌｌｉｎｇされたフラグメントによって同定された示差的に発現された遺伝子に対応する全長ｃＤＮＡが、以下のように調製されそして配列決定された。ｏｌｉｇｏ　ｄＴプライムされたｃＤＮＡライブラリーが、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ（Ｆａｓｔ　Ｔｒａｃｋ　２）からの試薬およびプロトコルを使用して、上記のようにヒトＨＵＶＥＣ細胞から単離されたｍＲＮＡから調製された。このＲＮＡを使用して、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ（Ｓｕｐｅｒ　Ｓｃｒｉｐｔ　Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｓｙｓｔｅｍ）からの試薬およびプロトコルを使用してベクターｐＲＫ５Ｄにおけるｏｌｉｇｏ　ｄＴプライムされたｃＤＮＡライブラリーを生成した。この手順において、二本鎖ｃＤＮＡを１０００ｂｐよりも大き

くサイズ決めし、そしてＳａｌＩ／Ｎｏｔｌ連結されたｃＤＮＡをＸｈｏＩ／Ｎｏｔｌ切断ベクターにクローニングした。ｐＲＫ５Ｄは、ＸｈｏＩ／Ｎｏｔｌ ｃＤＮＡクローニング部位に先行するｓｐ６転写開始部位、続いてＳｆｉＩ制限酵素部位を有するクローニングベクターである。

【０４５５】

上記のＧｅｎｅＣａｌｌフラグメントに基づくオリゴヌクレオチドプローブを、次いで、合成して、ＰＣＲによって、目的の配列を含むｃＤＮＡライブラリーを同定し、そして目的の示差的に発現された遺伝子についての全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用した。正方向ＰＣＲプライマーおよび逆方向ＰＣＲプライマーは、一般に、２０～３０ヌクレオチドの範囲であり、そしてしばしば、約１００～１０００ｂｐの長さのＰＣＲ産物を与えるように設計される。プローブ配列は、代表的に、４０～５５ｂｐの長さである。全長クローンについて、いくつかのライブラリーをスクリーニングするために、これらのライブラリーからのＤＮＡを、Ａｕｓｕｂｅｌら, Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ, Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ（１９９７）により、ＰＣＲプライマーを用いて、ＰＣＲ増幅によってスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを使用して、目的の遺伝子をコードするクローンを、プローブオリゴヌクレオチドおよびプライマー対の１つを使用して単離した。

【０４５６】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２．最初のＧｅｎｅＣａｌｌアセンブルされたフラグメント配列は、配列番号５であった。全長クローンを得るために、この配列に基づくオリゴヌクレオチドプローブは以下の通りであった：

【０４５７】

【化１】

正方向 PCR プライマー 5' GGACGACACGGTGCCGCTGACAGC 3'（配列番号６）
逆方向 PCR プライマー 5' GTTTTCCAGAGAAATTCCTCTTTGCACTCGA 3'（配列番号８）
ハイブリダイゼーションプローブ 5' GCCATCGAGGCGAGCCAGAGCCTGCAGTCCCACACGGAATATATTATTCGA 3'
（配列番号７）

ヌクレオチド位置６６－６８に明らかな翻訳開始部位およびヌクレオチド位置１７９４－１７９６に終止シグナルを有する単一のオープンリーディングフレームを含む全長クローンを同定した（配列番号１）。推定ポリペプチドは、５７７アミノ酸長であり、約６４９３５．０６ダルトンの計算された分子量および約９．９４の見積もられたｐＩを有する。配列番号２に示される全長ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２配列の分析は、種々の重要なポリペプチドドメインの存在を明らかにする。これらの重要なポリペプチドドメインに対して与えられた位置は、以下に記載されるような付近にある：アミノ酸位置５４－５８、４４１－４４５、および４６４－４６８のｃＡＭＰ－およびｃＧＭＰ－依存性タンパク質キナーゼリン酸化部位；アミノ酸位置３２－３６、５７－６１、１１０－１１４、１７９－１８３、１９０－１９４、２１６－２２０、２３３－２３７、４０２－４０６、４５２－４５６、４７０－４７４のカゼインキナーゼＩＩリン酸化部位；アミノ酸位置１１６－１２５および１１７－１２５のチロシンキナーゼリン酸化部位；アミノ酸位置４８９－４９５、５４５－５５１および５４９－５５５のＮ－ミリストイル化部位；アミノ酸位置２８９－３１１のロイシンジッパーパターン；アミノ酸位置１６－１２２のＰＸキナーゼドメイン；ならびにアミノ酸位置２３０－２８４からのｐｋｉｎａｓｅドメイン。この遺伝子は、ＧｅｎｅＣａｌｌｉｎｇアプローチによって決定される遺伝子発現において、４倍より大きい増加を有した。クローン１２は、ＧｅｎｅＣａｌｌｉｎｇにより＋２．５×である。

【０４５８】

クローンＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．２－１７７６は、１９９９年9月２８日にＡＴＣＣに寄託され、そしてＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９９を割り当てられた。

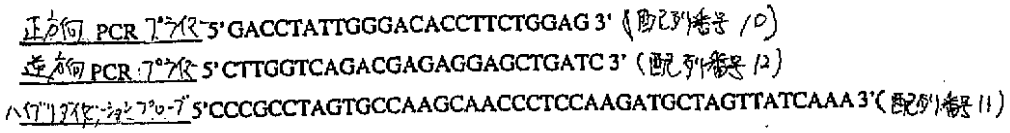
【０４５９】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２．最初のＧｅｎｅＣａｌｌアセンブリされたフラグメ

ント配列は、配列番号９であった。全長クローンを得るために、この配列に基づくオリゴヌクレオチド配列は、以下の通りであった：

【０４６０】

【化２】



ヌクレオチド位置４６５－４６７に明らかな翻訳開始部位およびヌクレオチド位置１８８４－１８８６に終止シグナルを有する単一のオープンリーディングフレームを含む全長クローンを同定した（配列番号３）。推定ポリペプチドは、４７４アミノ酸長であり、約５２５７３．３０ダルトンの計算された分子量および約６．６６の見積もられたｐＩを有する。配列番号４に示される全長ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２配列の分析は、種々の重要なポリペプチドドメインの存在を明らかにする。これらの重要なポリペプチドドメインに対して与えられた位置は、以下に記載されるような付近にある：アミノ酸位置１９９－２０３および３１６－３２０のｃＡＭＰ－およびｃＧＭＰ－依存性タンパク質キナーゼリン酸化部位；アミノ酸位置６１－６５、８１－８５、２０２－２０６、２６６－２７０、２９２－２９６、３２８－３３２、３５３－３５７、４１１－４１５、４５８－４６２４６３－４６７、４６７－４７１、および４６８－４７２のカゼインキナーゼＩＩリン酸化部位；アミノ酸位置１１２－１１８、１２２－１２８、１７７－１８３、２１８－２２４、２２４－２３０、２６２－２６８、２８７－２９３および３６４－３７０のＮ－ミリストイル化部位；ならびに、位置９９－１０４の潜在的な自己触媒ペプチドスプライシング部位（ＬＰＲＧｈＤ；Ｇｕら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８（１９９３）を参照のこと）。この遺伝子は、ＧｅｎｅＣａｌｌｉｎｇアプローチによって決定される遺伝子発現において、２．５倍より大きい増加を有した。

【０４６１】

クローンＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．１２－１７７６は、１９９９年9月２８日にＡＴＣＣに寄託され、そしてＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－７９８を割り当てられた。

【０４６２】

配列番号４に示される全長配列のＡＬＩＧＮ－２配列整列分析を使用する、Ｄａｙｈｏｆｆデータベース（バージョン３５．４５　ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ　３５）の分析は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２アミノ酸配列と以下のＤａｙｈｏｆｆ配列との間の配列同一性を明らかにした：登録番号Ｐ＿Ｙ００２８１。Ｐ＿Ｙ００２８１は、ＷＯ９９０６４２３において遺伝子２４によってコードされる３３７アミノ酸長のヒト推定分泌タンパク質として報告された。この３３７アミノ酸配列は、アミノ酸位置１３８－４７４からのＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２に一致する。ＷＯ９９０６４２３は、Ｐ＿Ｙ００２８１遺伝子が第一染色体にマッピングされ、そして主に脳で、そして卵巣および活性化Ｔ細胞でより低い程度に発現され、そしてその結果、脳の神経変性障害、免疫不全および再生における主な使用を見出されていることが主張されたことを主張する。

【０４６３】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５．最初のＧｅｎｅＣａｌｌアセンブリされたフラグメント配列は、配列番号２４であった。これは、ＥＳＴ登録番号ＡＡ４６１４８０に類似した。より長い配列を得るために、配列番号２４を使用して、公的なＥＳＴおよび他の配列データベース（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ）を検索した。この検索を、コンピュータプログラムＢＬＡＳＴまたはＢＬＡＳＴ－２（Ａｌｔｓｃｈｕｌら，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２６６：４６０－４８０）を使用して実施した。既知のタンパク質をコードしない好ましくは７０（または、いくつかの場合において、９０）またはそれより大きいＢＬＡＳＴスコアとの比較は、プログラム「Ｐｈｒａｐ」（Ｐｈｉｌ　Ｇｒｅｅｎ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｓｅａｔｔｌｅ，Ｗａｈｉｎｇｔｏｎ）を用いて、コンセンサスＤＮＡ配列にクラスター化およびアセンブルされた。この相同性スクリーンを使用して、コンセンサスＤＮＡ配列が、ｐｈａｒｐを使用する他の同定されたＥＳＴ配列に対してアセンブリされた。さらに、得られたこのコンセンサスＤＮＡ配列は、しばしば（いつもではないが）、ＢＬＡＳＴお

よびｐｈｒａｐの繰返しサイクルを使用して伸長されて、上に議論されたＥＳＴ配列の供給源を使用して、可能な限りコンセンサス配列を伸長した。

【０４６４】

次いで、ＧｅｎｅＣａｌｌｅｄ配列またはコンセンサス配列のいずれか、あるいは両方から、オリゴヌクレオチド配列を合成し、目的の配列を含むｃＤＮＡライブラリーをＰＣＲによって同定するために、およびＰＲＯポリペプチドの全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして、使用する。順方向および逆方向ＰＣＲプライマーは、一般に、２０～３０ヌクレオチドの範囲であり、そしてしばしば、約１００～１０００ｂｐ長のＰＣＲ産物を生じるように設計される。プローブ配列は、代表的には、４０～５５ｂｐ長である。いくつかの場合において、コンセンサス配列が約１～１．５ｋｂｐを超える場合に、さらなるオリゴヌクレオチドを合成する。全長クローンについていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、これらのライブラリー由来のＤＮＡを、ＰＣＲプライマー対を用いて、Ａｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，前出のよる、ＰＣＲ増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性ライブラリーを使用して、プローブオリゴヌクレオチドおよびこれらのプライマー対のうちの１つを用いて、目的の遺伝子をコードするクローンを単離する。全長クローンを得るために、好ましいオリゴヌクレオチドプライマーは、好ましくは、以下のとおりである：

順方向ＰＣＲプライマー　５’ａｔｇｃａｇｔｔｃｔｔｔｔｔｃａａｃｔｔｃｃ（配列番号２６）

逆方向ＰＣＲプライマー　５’ｃｔａｇａｇａｃｃａａｔｃｔａａｇｔａａ　３’（配列番号２７）。

プローブは、好ましくは、約１９～約１００塩基対の固有の領域であり得る。

【０４６５】

ｃＤＮＡクローンを単離するために使用するｃＤＮＡライブラリーを、市販の試薬（例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ製の試薬）を使用して、標準的な方法によって構築する。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、ＳａｌＩのヘミキナーゼ処理したアダプターに、平滑末

端化して連結し、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動によって適切にサイズ化し、そして適切なクローニングベクター（例えば、ｐＲＫＢまたはｐＲＫＤ；ｐＲＫ５Ｂは、ＳｆｉＩ部位を含まないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Ｈｏｌｍｅｓら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５３：１２７８－１２８０（１９９１）を参照のこと）に、その固有のＸｈｏＩ部位およびＮｏｔＩ部位に、規定した方向にクローニングする。

【０４６６】

（ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４）　最初のＧｅｎｅＣａｌｌ構築したフラグメント配列は、配列番号５であった。これは、ＥＳＴ登録番号ＡＡ９１３９３９に類似した。より長い配列を得るために、配列番号２４を使用して、公のＥＳＴデータベースおよび他の配列データベース（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ）を検索した。この検索は、コンピュータープログラムＢＬＡＳＴまたはＢＬＡＳＴ－２を使用して行った（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２６：４６０－４８０（１９９６））。既知のタンパク質をコードしなかった、好ましくは、７０（または、いくつかの場合においては、９０）以上のＢＬＡＳＴスコアでの比較から、プログラム「ｐｈａｒｐ」（Ｐｈｉｌ　Ｇｒｅｅｎ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｓｅａｔｔｌｅ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ）を用いて、コンセンサスＤＮＡ配列にクラスター化およびアセンブルした。この相同性スクリーニングを使用して、コンセンサスＤＮＡ配列を、ｐｈｒａｐを用いて、他の同定したＥＳＴ配列に対してアセンブルした。さらに、得られたコンセンサスＤＮＡ配列は、しばしば（常にではないが）、ＢＬＡＳＴおよびｐｈｒａｐの繰り返しサイクルを使用して伸長し、上記で議論したＥＳＴ配列の供給源を使用して、可能な限りコンセンサス配列を伸長した。全長クローンを得るために、好ましいオリゴヌクレオチドプライマーは、以下のとおりである：

順方向ＰＣＲプライマー　５’ａｔｇｇｔｇｇａｇｔｇｇａｇｇａｃｃｔｇ（配列番号２８）

逆方向ＰＣＲプライマー　５’ｃｔｃｃａａｃａｃｃａａｇｔａｃｔｃｔｔｇａ　３’（配列番号２９）。

プローブは、好ましくは、約１９～約１００塩基対の固有の領域であり得る。

【０４６７】

ｃＤＮＡクローンを単離するために使用したｃＤＮＡライブラリは、市販の試薬（例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡの試薬）を使用する標準的な方法により構築される。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムされ、ＳａｌＩ半キナーゼ処理された（ｈｅｍｉｋｉｎａｓｅｄ）アダプターに平滑に連結され、ＮｏｔＩで切断され、ゲル電気泳動により適切に大きさで分け、そして規定された方向で適切なクローニングベクター（例えば、ｐＲＫＢまたはｐＲＫＤ；ｐＲＫ５Ｂは、ＳｆｉＩ部位を含まないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Ｈｏｌｍｅｓら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５３：１２７８－１２８０（１９９１）を参照）中に独特なＸｈｏＩ部位およびＮｏｔＩ部位においてクローン化される。

【０４６８】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２．最初のＧｅｎｅＣａｌｌ組み立てフラグメント配列は配列番号５であった。これは、ＥＳＴアクセッション番号ａａ７７１９６０に類似していた。全長クローンを得るため、この配列に基づくオリゴヌクレオチドプローブは以下のとおりであり：

順方向ＰＣＲプライマー　５’ｇｃｔｇｃｔｔｃｔｔｇｇｔｔｇｇａａｇａｔｔｃｔｇｇ３’（配列番号２０）

逆方向ＰＣＲプライマー　５’ｃｃａｇａａｔｃｔｔｃｃａａｃｃａａｇａａｇｃａｇｃ３’（配列番号２１）

ハイブリダイゼーションプローブ　５’ｇｃａｔｃａｔｇｃｔｇｔｔｔｇａｃａｃｔｔｔｃｃｃａａｔｔａａａａｇｔｃｃｃｔｔｃａｔａａａａｃｔｔｔｇｃ３’（配列番号２２）、

そして逆方向ハイブリダイゼーションプローブはｇｇａｇｃｔｇｃｃａｔｔａｇａａｔｃａａｇａａｔｃｔｔｔｇｃ（配列番号２３）であった。

【０４６９】

ヌクレオチド７１位～７３位に見かけの翻訳開始部位を、そしてヌクレオチド２０６０位～２０６２位に停止コドンを有する、１つのオープンリーディングフ

レームを有する完全長クローンを同定した（配列番号１３）。推定ポリペプチドは６６３アミノ酸長である。配列番号１４に示される完全長ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明示される。このうち最も興味深いのは、Ｐｆａｍアルゴリズムにより決定される（非常に有意なＥ－値８．２×１０$^{-28}$およびスコア１０５．８を与える）、ほぼアミノ酸３４３からほぼアミノ酸４９４までの辺りのＲｈｏＧａｐドメインである。したがって、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２は、ＧＴＰａｓｅ活性化タンパク質（好ましくはＲｈｏ型のもの）としての活性を有すると考えられる。この点に関して、特に重要な領域（ＧＲＰａｓｅ活性化活性ドメインを含む）は、配列番号１４において、ほぼアミノ酸２０６位からほぼアミノ酸５５３位、ほぼアミノ酸３０７位からほぼアミノ酸５００位まで、そしてほぼアミノ酸３４１位からほぼアミノ酸５３３位までである。

【０４７０】

（実施例２：ハイブリダイゼーションプローブとしてのＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の使用）

以下の方法は、ハイブリダイゼーションプローブとしての、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするヌクレオチド配列の使用を記述する。

【０４７１】

完全長または成熟ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のコード配列を含むＤＮＡは、ヒト組織ｃＤＮＡライブラリまたはヒト組織ゲノムライブラリにおいて、相同ＤＮＡ（例えば、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の天然に存在する改変体をコードするもの）についてスクリーニングするためのプローブとして用いられる。

【０４７２】

いずれかのライブラリＤＮＡを含むフィルターのハイブリダイゼーションおよび洗浄は、以下の高ストリンジェンシー条件下で実施される。放射性標識した、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２に由来する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％ホルムアミド、５×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、０.１％ピロリン酸ナトリウム、５０mMリン酸ナトリウム、ｐＨ６.８、２×Ｄｅｎｈａｒｄｔ溶液、および１０％デキストラン硫酸の溶液中、４２℃にて２０時間行われる。フィルターの洗浄は、０.１×ＳＳＣおよび０.１ＳＤＳの水溶液中４２℃にて行われる。

【０４７３】

次いで、完全長のネイティブな配列ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするＤＮＡと所望の配列同一性を有するＤＮＡが、当該分野において公知の標準的技法を使用して同定され得る。

【０４７４】

（実施例３：Ｅ．ｃｏｌｉにおけるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の発現）

この実施例は、Ｅ．ｃｏｌｉにおける組換え発現により、非グリコシル化形態のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の調製を例示する。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするＤＮＡ配列は、まず、選択されたＰＣＲプライマーを用いて増幅される。プライマーは、選択した発現ベクター上の制限酵素部位に対応する制限酵素部位を含むべきである。種々の発現ベクターが用いられ得る。適切なベクターの例は、アンピシリンおよびテトラサイクリン抵抗性遺伝子を含むｐＢＲ３２２（Ｅ．ｃｏｌｉ由来；Ｂｏｌｉｖａｒら、Ｇｅｎｅ，２：９５（１９７７）を参照）である。ベクターは制限酵素で消化され、そして脱リン酸化される。次いで、ＰＣＲ増幅配列がベクターに

連結される。ベクターは、好ましくは、抗生物質抵抗性遺伝子、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、およびエンテロキナーゼ切断部位を含む）、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のコード領域、λ転写ターミネーター、およびａｒｇＵ遺伝子をコードする配列を含む。

【０４７５】

次いで、連結混合物は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（前出）に記載される方法を使用してＥ．ｃｏｌｉ株を形質転換するために使用される。形質転換体はＬＢプレート上で増殖する能力により同定され、次いで抗生物質抵抗性コロニーが選択される。プラスミドＤＮＡが単離され、そして制限分析およびＤＮＡ配列決定により確認される。

【０４７６】

選択したクローンは、一晩、液体培養培地（例えば、抗生物質を補充したＬＢブロス）中で増殖され得る。一晩培養物は、続いて、より大規模な培養物の接種に使用され得る。次いで、細胞を所望の光学密度まで増殖させる。その間に発現プロモーターにスイッチが入る。

【０４７７】

さらに数時間細胞を培養後、細胞は遠心分離により採集され得る。遠心分離により得られる細胞ペレットは、当該分野において公知の種々の薬剤を使用して可溶化され、そして可溶化されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２たんぱく質は、次いで、タンパク質の強固な結合を可能にする条件下で、金属キレート化カラムを使用して精製され得る。

【０４７８】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２は、以下の手順を使用して、ポリＨｉｓタグ化形態でＥ．ｃｏｌｉ中で発現され得る。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．

６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２をコードするＤＮＡは、まず、選択したＰＣＲプライマーを使用して増幅される。プライマーは、選択した発現ベクター上の制限酵素部位に対応する制限酵素部位、ならびに、効率的で信頼できる翻訳開始、金属キレート化カラムでの迅速な精製、およびエンテロキナーゼでのタンパク質分解性除去を提供する他の有用な配列を含む。ＰＣＲ増幅されたポリＨｉｓタグ化配列は、次いで、発現ベクター中に連結される。この発現ベクターが、株５２（Ｗ３１１０ｆｕｈＡ（ｔｏｎＡ）ｌｏｎ　ｇａｌＥ　ｒｐｏＨｔｓ（ｈｔｐＲｔｓ）　ｃｌｐＰ（ｌａｃＩｑ）に基づくＥ．ｃｏｌｉ宿主を形質転換するために使用される。形質転換体をまず、５０ｍｇ／ｍｌカルベニシリンを含む４２℃のＬＢ中で振盪させながら、３～５のＯ．Ｄ．６００に達するまで増殖させる。培養物を、次いで、（３．５７ｇ（NH_4）２SO_4、０．７１ｇクエン酸ナトリウム・２Ｈ２Ｏ、１．０７ｇ　ＫＣｌ、５．３６ｇ　Ｄｉｆｃｏ酵母抽出物、５００ｍＬの水に５．３６ｇ　Ｓｈｅｆｆｉｅｌｄ　ｈｙｃａｓｅ　ＳＦ、ならびに、１１０ｍＭ　ＭＰＯＳ、ｐＨ７．３、０．５５％（ｗ／ｖ）グルコースおよび７ｍＭ　$MgSO_4$を混合することにより調製された）ＣＲＡＰ培地中に５０～１００倍希釈し、およそ２０～３０時間３０℃にて振盪しながら増殖させる。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析により発現を確認するためにサンプルを取り出し、細胞をペレット化するためにバルクの培養物を遠心分離する。細胞ペレットは精製および再折り畳みまで凍結される。

５Ｌ～１Ｌの発酵物からのＥ．ｃｏｌｉペースト（６～１０ｇペレット）を、７Ｍグアニジン、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ８緩衝液中に１０倍容量（ｗ／ｖ）で再懸濁する。固亜硫酸ナトリウムおよびナトリウムテトラチオネートを加えて、それぞれ０．１Ｍおよび０．０２Ｍの最終濃度にし、そしてその溶液を４℃にて一晩攪拌する。この工程により、すべてのシステイン残基が亜硫酸化によりブロックされた変性タンパク質が生じる。この溶液を、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｕｌｔｒａｃｅｎｔｉｆｕｇｅにおいて３０分間４０，０００ｒｐｍにて遠心分離する。上清を３～５倍容量の金属キレートカラム緩衝液（６Ｍグアニジン、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ７．４）で希釈し、そして０．２２ミクロンフィルターでろ過して明澄にする。明澄化抽出物を、金属キレートカラム緩衝液中で平衡化した５ｍｌ　Ｑ

ｉａｇｅｎ　Ｎｉ－ＮＴＡ金属キレートカラムに負荷する。カラムを５０mMイミダゾール（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ，Ｕｔｒｏｌ等級）ｐＨ７．４を含むさらなる緩衝液で洗浄する。タンパク質を、２５０mMイミダゾールを含む緩衝液で溶出させる。所望のタンパク質を含む画分をプールし、そして４℃にて貯蔵する。タンパク質濃度を、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光率を使用して、２８０ｎｍの吸光度により推定する。

【０４７９】

２０mM　Ｔｒｉｓ、pH8.6、0.3M　ＮａＣｌ、2.5M尿素、5mMシステイン、２０mMグリシン、および1mM　ＥＤＴＡからなる新たに調製した再折り畳み緩衝液中にサンプルをゆっくりと希釈することにより、タンパク質を再折り畳みさせる。最終のタンパク質濃度が５０マイクログラム／ｍｌ～１００マイクログラム／ｍｌであるように、再折り畳み容量を選択する。再折り畳み溶液を４℃にて１２～３６時間穏やかに攪拌する。再折り畳み反応を、０．４％（およそ3のｐＨ）の最終濃度までのＴＦＡの添加により停止させる。タンパク質のさらなる精製の前に、溶液を０．２２ミクロンフィルターでろ過し、アセトニトリルを２～１０％の最終濃度まで添加する。０．１％　ＴＦＡの移動緩衝液を使用してＰｏｒｏｓ　Ｒｌ／H逆相カラムにおいて再折り畳みタンパク質をクロマトグラフィーにかけ、１０～８０％のアセトニトリルのグラジエントで溶出する。Ａ２８０吸光度を有する画分のアリコートを、ＳＤＳポリアクリルアミドゲルで分析し、そして同質な再折り畳みタンパク質を含む画分をプールする。一般に、ほとんどのタンパク質の適切に再折り畳みされた種は、最低濃度のアセトニトリルで溶出する。なぜなら、そのような種は、疎水性内部が逆相樹脂との相互作用からシールドされ、最もコンパクトであるからである。凝集した種は、通常、より高いアセトニトリル濃度で溶出する。所望の形態から誤って折り畳まれた形態のタンパク質を分離することに加えて、逆相工程はまた、サンプルから体内毒素を移動させる。

【０４８０】

所望の折り畳まれたＰＲＯ－Ｃ－MG.2、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２ポリペ

プチドを含む画分をプールし、その溶液に向けた窒素の穏やかな流れを使用してアセトニトリルを除去する。透析または処方緩衝液中で平衡化したＧ２５　Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）樹脂を使用するゲルろ過により、０.１４M塩化ナトリウムおよび４％マンニトールを有する２０mM　Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ６.８にタンパク質を処方し、滅菌ろ過する。

【０４８１】

（実施例４：哺乳動物細胞におけるＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２の発現）

この実施例は、哺乳動物細胞における組換え発現による、潜在的にグリコシル化された形態のＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２の調製を示す。

【０４８２】

ベクターｐＲＫ５（ＥＰ　３０７,２４７を参照；１９８９年3月１５日公開）を発現ベクターとして用いる。必要に応じて、ＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２のＤＮＡを、連結法（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（前出）に記載された方法）を使用してＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２のＤＮＡの挿入を可能にするための選択した制限酵素部位を有するｐＲＫ５に連結する。得られたベクターを、ｐＲＫ５－ＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２と呼ぶ。

【０４８３】

１つの実施形態において、選択した宿主細胞は、他の哺乳動物細胞について本明細書に記載されたベクターおよびトランスフェクション法を使用する、上記のＨＵＶＥＣ細胞であり得る。ＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２

を過剰発現するトランスフェクトされたＨＵＶＥＣ細胞、あるいはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２アンチセンスを発現するＨＵＶＥＣ細胞を、例えば管腔形成アッセイ（ｔｕｂｅ　ｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ａｓｓａｙ）において試験する。

【０４８４】

１つの実施形態において、選択した宿主細胞は２９３細胞であり得る。ヒト２９３細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１５７３）を、組織培養プレート中で、ウシ胎仔血清および必要に応じて栄養素成分および／または抗生物質を補充したＤＭＥＭのような培地においてコンフルーエンスまで増殖させる。約１０μｇのｐＲＫ５－ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２　ＤＮＡを、ＶＡ　ＲＮＡ遺伝子［Ｔｈｉｍｍａｐｐａｙａら、Ｃｅｌｌ，３１：５４３（１９８２）］をコードする約１μｇのＤＮＡと混合し、そして５００μｌの1mM　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、0.1mM　ＥＤＴＡ、0.２２７Ｍ　$CaCl_2$に溶解する。この混合物に、５００μｌの５０mM　ＨＥＰＥＳ（pH7.３５）、２８０mM　ＮａＣｌ、1.5mM　$NaPO_4$を滴下して加え、そして２５℃にて１０分間沈殿物を形成させる。沈殿物を懸濁し、そして２９３細胞に添加し、そして３７℃にて約４時間沈降させる。培養培地を吸引して除き、そして２ｍｌのＰＢＳ中２０％グリセロールを３０秒間加える。２９３細胞を、次いで、無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を加え、そして細胞を約５日間インキュベートする。

【０４８５】

トランスフェクションの約２４時間後、その培養培地を取り除き、そして培養培地（単独）または２００μＣｉ／ｍｌ　^{35}Ｓ－システインおよび２００μＣｉ／ｍｌ　^{35}Ｓ－メチオニンを含む培養培地に交換する。１２時間のインキュベーション後、条件付けられた培地を集め、スピンフィルターで濃縮し、そして１５％ＳＤＳゲル上に負荷する。プロセスしたゲルは乾燥させ、そしてＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチドの存在を明らかにするために

選択された時間フィルムに曝露させ得る。トランスフェクト細胞を含む培養物はさらなるインキュベーション（無血清培地中）を受け得、そして培地は選択したバイオアッセイにおいて試験され得る。

【０４８６】

別の技法において、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２は、Ｓｏｍｐａｒｙｒａｃら、Ｐｒｏ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，１２：７５７５（１９８１）により記載されたデキストラン硫酸法を使用して一過性に２９３細胞中に導入され得る。２９３細胞を、スピナーフラスコ中で最大密度まで増殖させ、そして７００μｇのｐＲＫ５－ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２　ＤＮＡを加える。細胞をまず、遠心分離によりスピナーフラスコから濃縮し、そしてＰＢＳで洗浄する。ＤＮＡ－デキストラン沈殿物を、細胞ペレット上で４時間インキュベートする。細胞を、２０％グリセロールで９０秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、そして組織培養培地、５μｇ／ｍｌウシインスリンおよび０．１μｇ／ｍｌウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコ中に再導入する。約４日後、条件付けられた培地を遠心分離し、そしてろ過して細胞および残渣を除去する。発現したＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２を含むサンプルは、次いで、任意の選択された方法（例えば、透析および／またはカラムクロマトグラフィー）により濃縮および精製され得る。

【０４８７】

別の実施形態において、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２をＣＨＯ細胞において発現させ得る。ｐＲＫ５－ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２を、公知の試薬（例えば、$CaPO_4$またはＤＥＡＥ－デキストラン）を使用してＣＨＯ細胞中にトランスフェクトさせ得る。上記のように、細胞培養物をインキュベートし得、そしてその培地を培養培地（単独）または放

射性標識（例えば、３５Ｓ－メチオニン）を有する培地と交換し得る。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチドの存在の決定後、培養培地を、無血清培地と交換し得る。好ましくは、培養物を約６日間インキュベートし、次いで条件付けられた培地を採集する。次いで、発現したＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２を含む培地を、任意の選択した方法により、濃縮および精製し得る。

【０４８８】

エピトープ－タグ化ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２もまた、宿主ＣＨＯ細胞において発現させ得る。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２を、ｐＲＫ－５ベクターからサブクローニングし得る。サブクローンインサートをＰＣＲを経験させて、バキュロウイルス発現ベクター中に、選択されたエピトープタグ（例えば、ポリｈｉｓタグ）とインフレームで融合させる。ポリｈｉｓタグ化ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２インサートを、次いで、安定なクローンの選択のための選択マーカー（例えば、ＤＨＦＲ）を含むＳＶ４０由来ベクター中にサブクローニングし得る。最後に、ＣＨＯ細胞は、ＳＶ４０由来ベクターで（上記のように）トランスフェクトされ得る。標識化を上記のように行い、発現を確証し得る。発現したポリＨｉｓタグ化ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２を含む培養培地は、次いで、任意の選択された方法（例えば、Ni^{2+}－キレートアフィニティークロマトグラフィー）により濃縮および精製され得る。

【０４８９】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２はまた、一過性発現手順に

よりＣＨＯおよび／またはＣＯＳ細胞において、または別の安定な発現手順によりＣＨＯ細胞において発現され得る。

【０４９０】

ＣＨＯ細胞における安定な発現は以下の手順を使用して実施される。タンパク質をＩｇＧ構築物（イムノアドヘシン（ｉｍｍｕｎｏａｄｈｅｓｉｎ））として発現させる。このＩｇＧ構築物において、可溶形態（例えば、細胞外ドメイン）のそれぞれのタンパク質のコード配列はヒンジ、ＣＨ２、およびＣＨ２ドメインを含むＩｇＧ１定常領域配列と融合され、そして／またはポリＨｉｓタグ化形態である。

【０４９１】

ＰＣＲ増幅後、それぞれのＤＮＡを、Ａｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ, Ｕｎｉｔ ３.１６、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ（１９９７）に記載のような標準的な技法を使用して、ＣＨＯ発現ベクターにサブクローニングされる。ｃＤＮＡの簡便な往復を可能にするために、目的のＤＮＡの５’および３’側に適合性の制限部位を有するようにＣＨＯ発現ベクターを構築する。ＣＨＯ細胞における発現に使用されるベクターは、Ｌｕｃａｓら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２４：９（１７７４－１７７９（１９９６）に記載されるようなものであり、そして目的のｃＤＮＡおよびジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）の発現を駆動するためにＳＶ４０初期プロモーター／エンハンサーが使用される。ＤＨＦＲ発現により、トランスフェクション後のプラスミドの安定な維持が可能になる。

【０４９２】

市販のトランスフェクション試薬Ｓｕｐｅｒｆｅｃｔ（登録商標）（Ｑｕｉａｇｅｎ）、Ｄｏｓｐｅｒ（登録商標）またはＦｕｇｅｎｅ（登録商標）（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ）を使用して、１２マイクログラムの所望のプラスミドＤＮＡを、約１０００００００個のＣＨＯ細胞中に導入する。細胞をＬｕｃａｓら（前出）に記載のように増殖させる。本明細書に記載のさらなる増殖および生産のために、約3×10^{7}個の細胞をアンプル中で凍結させる。

【０４９３】

水浴中に配置することによりプラスミドＤＮＡを含むアンプルを解凍し、ボルテックスすることにより混合する。内容物を、１０ｍＬの培地を含む遠沈管中にピペットで入れ、そして１０００ｒｐｍで５分間遠心分離する。上清を吸引し、そして細胞を１０ｍＬの選択培地（５％の０．２μｍの透析ろ過した胎仔ウシ血清を含む０．２μｍのろ過したＰＳ２０）に再懸濁する。細胞を、次いで、９０ｍＬの選択培地を含む１００ｍＬスピナー中に小分けした。１～２日後、細胞を、１５０ｍＬの選択増殖培地を満たした２５０ｍＬスピナーに移し、そして３７℃にてインキュベートする。さらに２～３日後、２５０ｍＬ、５００ｍＬ、および２０００ｍＬのスピナーに３×１０^{5}細胞／ｍＬを播種する。細胞培地を、遠心分離および生産培地中への再懸濁により、新鮮な培地と交換する。任意の適切なＣＨＯ培地を用い得るが、米国特許第５,１２２,４６９号（１９９２年６月１６日発行）に記載された生産培地を実際には使用し得る。３Ｌの生産スピナーに１．２×１０^{6}細胞／ｍＬを播種する。０日め、細胞の数、ｐＨを決定する。１日め、スピナーをサンプリングし、ろ過空気での散布を始める。２日め、スピナーをサンプリングし、温度を３３℃にシフトさせ、そして３０ｍＬの５００ｇ／Ｌグルコースおよび０．６ｍＬの１０％消泡剤（例えば、３５％ポリジメチルシロキサン、Ｄｏｗ Ｃｏｒｎｉｎｇ ３６５ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｇｒａｄｅ Ｅｍｕｌｓｉｏｎ）を加える。生産を通じて、必要に応じて、７．２付近に維持するようｐＨを調整する。１０日後、または生存率が７０％以下に落ちるまで、細胞培養物を、遠心分離および０．２２μｍフィルターでのろ過により採集する。ろ液を４℃にて貯蔵するか、または精製のためカラムに直ぐに負荷する。

【０４９４】

ポリＨｉｓタグ化構築物については、Ｎｉ－ＮＴＡカラム（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してタンパク質を精製する。精製の前に、イミダゾールを、条件付けられた培地に、５mMの濃度まで加える。条件付けられた培地を、０．３Ｍ ＮａＣｌおよび５mMイミダゾールを含む、２０mM Ｈｅｐｅｓ（ｐＨ７．４）緩衝液において平衡化された６ｍｌ Ｎｉ－ＮＴＡカラムに、４～５ｍｌ／分の流速で４℃にて汲み上げられる。負荷後、カラムを、さらなる平衡緩衝液で洗浄し、０．２５Ｍイミダゾールを含む平衡化緩衝液でタンパク質を溶出する。高度に精製

されたタンパク質を、続いて、２５mlのG２５　Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）カラムを用いて、１０mM　Ｈｅｐｅｓ、0.１４M　ＮａＣｌおよび４％マンニトール（ｐＨ６.８）を含む貯蔵緩衝液中に脱塩化し、そして－８０℃にて貯蔵する。

【０４９５】

イムノアドヘシン（Ｆｃ含有）構築物を、条件付け培地から以下のとおり精製する。条件付け培地を、２０mM　リン酸Ｎａ緩衝液（ｐＨ６.８）中で平衡化した5mlプロテインAカラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）に汲み上げる。負荷後、カラムを平衡化緩衝液で過剰に洗浄した後、１００mMクエン酸（ｐＨ３.５）で溶出させる。２７５μLの1M　Ｔｒｉｓ緩衝液（ｐＨ9）を含むチューブに1ml画分を集めることにより、溶出したタンパク質を直ぐに中和する。高度に精製されたタンパク質を、続いて、ポリＨｉｓタグ化タンパク質のために、上記のように、貯蔵緩衝液中に脱塩化する。ＳＤＳポリアクリルアミドゲルおよびエドマン分解によるN末端アミノ酸配列決定によって同質性を評価する。

【０４９６】

（実施例５：酵母におけるＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２の発現）

以下の方法は、酵母におけるＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２の組換え発現を記載する。

【０４９７】

最初に、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターからＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２の細胞内産生または分泌のために、酵母発現ベクターを構築する。ＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２をコードするＤＮＡおよびプロモーターを、ＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２の

細胞内産生を導くために、選択されたプラスミドにおける適切な制限酵素部位に挿入する。分泌のためには、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２をコードするＤＮＡを、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーター、哺乳動物シグナルペプチドまたは例えば酵母α－因子もしくはインベルターゼ分泌シグナル／リーダー配列、およびＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２の発現のためのリンカー配列（必要な場合）とともに、選択したプラスミド中にクローニングし得る。

【０４９８】

次いで、酵母細胞（例えば、酵母ＡＢ１１０株）を、上記の発現プラスミドで形質転換し、そして選択した発酵培地において培養し得る。形質転換酵母細胞上清を、１０％トリクロロ酢酸での沈殿およびＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分離、続くクーマシーブルー染色でのゲルの染色によって分析し得る。

【０４９９】

組換えＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２を、続いて、遠心分離により発酵培地から酵母細胞を除去し、続いて選択したカートリッジフィルターを使用してその培地を濃縮することによって、単離および精製し得る。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２を含む濃縮物を、選択したカラムクロマトグラフィー樹脂を使用して、さらに精製し得る。

【０５００】

（実施例６：バキュロウイルス感染昆虫細胞におけるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２の発現）

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞におけるＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２の組換え発現を記載する。

【０５０１】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２をコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクター内に含まれるエピトープタグの上流に融合する。このようなエピトープタグには、ポリｈｉｓタグおよび免疫グロブリンタグ（ＩｇＧのＦｃ領域のような）が含まれる。市販のプラスミド（例えば、ｐＶＬ１３９３）（Ｎｏｖａｇｅｎ）に由来するプラスミドを含む、種々のプラスミドを用い得る。簡潔には、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２をコードする配列、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２のコード配列の所望の部分（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、またはタンパク質が細胞外性である場合には成熟タンパク質をコードする配列）を、５’および３’領域に相補的なプライマーを用いるＰＣＲにより増幅させる。５’プライマーを隣接する（選択された）制限酵素部位に組み込み得る。次いで、生成物をその選択された制限酵素で消化し、そして発現ベクター中にサブクローニングする。

【０５０２】

組換えバキュロウイルスを、リポフェクチン（ＧＩＢＣＯ－ＢＲＬから市販されている）を使用してＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ（「Ｓｆ９」）細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１７１１）中に上記プラスミドおよびＢａｃｕｌｏＧｏｌｄ™ウイルスＤＮＡ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）を同時トランスフェクトすることにより作製する。２８℃でのインキュベーションの４～５日後、放出されたウイルスを採集し、さらなる増幅に使用する。ウイルス感染およびタンパク質発現を、Ｏ’Ｒｅｉｌｌｅｙら、Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｖｅｃｔｏｒ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｎｕａｌ，Ｏｘｆｏｒｄ：Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ（１９９４）により記載されるとおり実施する。

【０５０３】

次いで、発現したポリｈｉｓタグ化ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２を、例えば、Ni^{2+}－キレートアフィニティークロマトグラフィーにより、以下のとおり精製し得る。抽出物を、Ｒｕｐｅｒｔら、Ｎａｔｕｒｅ，３６２：１７５－１７９（１９９３）により記載されるとおり、組換えウイルス感染Ｓｆ９細胞から調製する。簡潔には、Ｓｆ９細胞を洗浄し、超音波処理緩衝液（２５ｍＬ Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ７.９；１２.５ｍＭ $MgCl_2$；０.１ｍＭ ＥＤＴＡ；１０％グリセロール；０.１％ ＮＰ－４０；０.４Ｍ ＫＣｌ）に再懸濁し、そして氷上で２回２０秒間超音波処理する。超音波処理物を遠心分離により明澄化し、そして上清を負荷緩衝液（５０ｍＭホスフェート、３００ｍＭ ＮａＣｌ、１０％グリセロール、ｐＨ７.８）中で５０倍希釈し、そして０.４５μｍフィルターでろ過する。Ni^{2+}－ＮＴＡアガロースカラム（Ｑｉａｇｅｎから市販）を５ｍＬの床容量で調製し、２５ｍＬの水で洗浄し、２５ｍＬの負荷緩衝液で平衡化する。ろ過した細胞抽出物を、０.５ｍＬ／分でカラムに負荷する。カラムを負荷緩衝液でベースラインのA_{280}まで洗浄する。この時点で画分収集を開始する。次に、カラムを第２の洗浄緩衝液（５０ｍＭホスフェート；３００ｍＭ ＮａＣｌ，１０％グリセロール、ｐＨ６.０）で洗浄する。

この第２の洗浄緩衝液は、非特異的に結合タンパク質を溶出する。再びA_{280}ベースラインに達した後、カラムを、第２の洗浄緩衝液中０～５００ｍＭのイミダゾールグラジエントで展開する。１ｍＬの画分を収集し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよび銀染色またはNi^{2+}－ＮＴＡ結合アルカリホスファターゼ（Ｑｉａｇｅｎ）でのウエスタンブロットにより分析する。溶出したHis_{10}タグ化ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２を含む画分をプールし、負荷緩衝液に対して透析する。

【０５０４】

あるいは、ＩｇＧタグ化（またはＦｃタグ化）ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２の精製を、公知のクロマトグラフィー技法（例えば、プロ

テインＡまたはプロテインＧカラムクロマトグラフィー）を使用して実施し得る。

【０５０５】

（実施例７：ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２に結合する抗体の調製）

この実施例は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２に特異的に結合するモノクローナル抗体の調製を例示する。

【０５０６】

モノクローナル抗体を生成する技法は当該分野において公知であり、例えばＧｏｄｉｎｇ（前出）に記載される。用いられ得る免疫原には、精製されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２を含む融合タンパク質、および細胞表面上に組換えＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２を発現する細胞が含まれる。免疫原の選択は、当業者が、過度な実験を要することなく行い得る。

【０５０７】

マウス（例えば、Ｂａｌｂ／ｃ）を、完全フロイントアジュバント中で乳化し、そして１～１００マイクログラムの量で皮下または腹腔内に注射したＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２免疫原で免疫する。あるいは、免疫原をＭＰＬ－ＴＤＭアジュバント（Ｒｉｂｉ　Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｈａｍｉｌｔｏｎ, ＭＴ）中で乳化し、そして動物の後肢掌に注射する。次いで、１０～１２日後、免疫したマウスを、選択したアジュバント中で乳化したさらなる免疫原で追加免疫する。その後、数週間、マウスをまた、さらなる免疫注射で追加免疫する。ＥＬＩＳＡアッセイにおいて試験して抗ＰＲ

Ｏ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２抗体を検出するために、眼窩採血により血清サンプルをマウスから周期的に入手し得る。

【０５０８】

適切な抗体力価を検出した後、抗体について「ポジティブな」動物に、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２の最終静脈内注射をし得る。３～４日後、マウスを屠殺し、そして脾臓細胞を採集する。次いで、選択したマウスミエローマ細胞株（例えば、ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ　１５９７から入手可能なＰ３Ｘ６３ＡｇＵ.１）に脾臓細胞を融合する（３５％ポリエチレングリコールを使用して）。この融合によりハイブリドーマ細胞が作製される。このハイブリドーマ細胞は、次いで、非融合細胞、ミエローマハイブリッド、および脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害するためのＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン）培地を含む９６ウェル組織培養プレート中に配置され得る。

【０５０９】

ハイブリドーマ細胞を、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２に対する反応性について、ＥＬＩＳＡにおいてスクリーニングする。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブな」ハイブリドーマ細胞の決定は、当該分野における技術の範囲内である。

【０５１０】

抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２モノクローナル抗体を含む腹水を産生するため、ポジティブなハイブリドーマ細胞を、同系のＢａｌｂ／ｃマウスの腹腔内に注射し得る。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコまたはローラーボトル中で増殖させ得る。腹水ちゅうに産生されたモノクローナル抗体の精製を、硫酸アンモニウム沈降、続くゲル排除クロマトグラフィ

ーを使用して達成し得る。あるいは、プロテインＡまたはプロテインＧへの抗体の結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーを使用し得る。

【０５１１】

（実施例８：特異抗体を使用するＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチドの精製）

ネイティブまたは組換えのＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチドを、タンパク質精製の分野における種々の標準的な技法により精製し得る。例えば、プロＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチド、成熟ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチド、またはプレＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチドを、目的のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチドに特異的な抗体を使用する免疫アフィニティークロマトグラフィーにより精製し得る。一般に、免疫アフィニティーカラムは、活性化したクロマトグラフィー樹脂に抗ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチド抗体を共有的に結合することにより構築される。

【０５１２】

ポリクローナル免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムでの沈降または固相化プロテインＡ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　ＬＫＢ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）での精製のいずれかにより免疫血清から調製される。同様に、モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈降または固相化プロテインＡでのクロマトグラフィーによりマウス腹水から調製される。部分的に精製された免疫グロブリンはクロマトグラフィー樹脂（例えば、ＣｎＢｒ活性化ＳＥ

ＰＨＡＲＯＳＥ™（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　ＬＫＢ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ））に共有的に付着される。製造業者の指示に従って、抗体を樹脂に結合し、樹脂をブロックし、そして誘導体樹脂を洗浄する。

【０５１３】

このような免疫アフィニティーカラムを、可溶形態でＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチドを含む細胞から画分を調製することにより、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチドの精製において使用する。この調製物は、全細胞または界面活性剤の添加によりもしくは当該分野において周知の他の方法により差分遠心分離を介して得られた細胞画分の可溶化によって誘導される。あるいは、異種分泌シグナルペプチドを使用することにより、可溶性ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチドを、細胞が増殖した培地中に有用な量で分泌させ得る。

【０５１４】

可溶性ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチド含有調製物を、免疫アフィニティーカラム上を通過させ、そしてＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチドの優先的な吸光度を可能にする条件（例えば、界面活性剤の存在下の高イオン強度緩衝液）下でカラムを洗浄する。次いで、抗体／ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチド結合を崩壊させる条件（例えば、およそｐＨ２～３のような低ｐＨ緩衝液、または高濃度のカオトロープ（ｃｈａｏｔｒｏｐｅ；例えば、尿素またはチオシアネートイオン））下でカラムを溶出させ、そしてＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチドを収集する。

【０５１５】

（実施例９：薬物スクリーニング）

本発明は、種々の薬物スクリーニング技法のいずれかにおいてＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチド、あるいはその結合フラグメントを使用することにより、化合物をスクリーニングするに特に有用である。そのような試験に用いられる、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチド、あるいはフラグメントは、溶液中で遊離しているか、固体支持体に固定されているか、細胞表面上に有されるか、細胞内に局在しているかのいずれかであり得る。薬物スクリーニングの１つの方法は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４、またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチドまたはフラグメントを発現する、組換え核酸で安定に形質転換されている、真核生物または原核生物の宿主細胞を利用する。薬物は、競合結合アッセイにおいてこのような形質転換細胞に対してスクリーニングされる。このような細胞（生存可能であっても、固定形態であってもいずれでも）は、標準的な結合アッセイのために使用され得る。例えば、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチドまたはフラグメントと、試験される因子との間での複合体の形成を調べ得る。あるいは、試験される因子によって引き起こされる、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチドと、その標的細胞または標的レセプターとの間での複合体形成の減少を調べ得る。

【０５１６】

したがって、本発明は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ.７２ポリペプチド関連疾患または障害に影響し得る薬物または他の因子についてスクリーニングする方法を提供する。これらの方法は、そのような因子を、ＰＲＯ－Ｃ

－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２またはそのフラグメントと接触させる工程、および、当該分野において周知の方法により、（ｉ）その因子とＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２またはフラグメントとの間の複合体の存在について、または（ｉｉ）ＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２ポリペプチドまたはフラグメントと細胞との間の複合体の存在についてアッセイする工程を包含する。このような競合結合アッセイにおいて、ＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２ポリペプチドまたはフラグメントは代表的には標識されている。適切なインキュベーション後、遊離ＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２ポリペプチドまたはフラグメントは、結合形態で存在するものから分離され、そして遊離しているかまたは複合体化していない標識の量が、ＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２ポリペプチドまたはフラグメントへ結合するか、またはＰＲＯ－Ｃ－MG.２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG.４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG.６４もしくはＰＲＯ－Ｃ－MG.７２ポリペプチド／細胞複合体を妨げる、その特定の因子の能力の尺度である。

【０５１７】

薬物スクリーニングのための別の技術は、ポリペプチドに対する適切な結合親和性を有する化合物についての高処理能スクリーニングを提供し、そしてこれは、１９８４年9月１３日に公開された、WO　８４／０３５６４に詳細に記載されている。手短に述べると、大多数の異なる低ペプチド試験化合物を、プラスチックピンまたはいくつかの他の表面のような固体支持体上で合成する。ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２のポリペプチドに対して適用するとき、そのペプチド試験化合物は、ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１

２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドと反応させ、そして洗浄する。結合した、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドを、当該分野において周知の方法により検出する。精製したＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２もまた、上記の薬物スクリーニング技術において使用するためにプレートに直接コーティングし得る。さらに、非中和抗体を用いて、そのペプチドを捕捉し得、そしてその固体支持体にそれを固定することができる。

【０５１８】

本発明はまた、競合的薬物スクリーニングアッセイの使用を企図する。この方法において、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドに結合し得る中和抗体は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドあるいはそのフラグメントに対する結合について試験化合物と特異的に競合する。このようにして、その抗体を使用して、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドと１つ以上の抗原性決定基を共有する任意のペプチドの存在を検出し得る。

【０５１９】

（実施例１０：合理的薬物設計）

合理的薬物設計の目標は、目的の生物学的に活性なポリペプチド（例えば、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド）の構造アナログ、またはそれらが相互作用する低分子（例えば、アゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビター）の構造アナログを生成することである。これらの例のいずれかを用いて、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペ

プチドのより活性な形態または安定な形態であるか、またはＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２のポリペプチドの機能をインビボで増強または阻害する、薬物を形成し得る　（Ｈｏｄｇｓｏｎ，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇ　９：１９－２１（１９９１）を参照のこと）。

【０５２０】

１つのアプローチにおいて、ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２のポリペプチド、あるいはＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２のポリペプチド－インヒビターの複合体の三次元構造は、Ｘ線結晶構造解析、コンピュータモデリングまたは最も代表的には、２つのアプローチの組合せによって決定される。ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２のポリペプチドの形状および電荷の両方を確認して構造を解明し、そしてその分子の活性部位を決定しなければならない。あまり頻繁ではないが、ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２のポリペプチドの構造に関する有用な情報は、相同性タンパク質の構造に基づくモデリングにより得られ得る。両方の場合、関連する構造情報を用いて、類似のＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２のポリペプチド様の分子を設計するか、または効率のよいインヒビターを同定する。合理的薬物設計の有用な例としては、Ｂｒａｘｔｏｎ　ａｎｄ　Ｗｅｌｌｓ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３１：７７９６－７８０１（１９９２）によって示される活性または安定性が改善された分子、あるいはＡｔｈａｕｄａ　ｅｔａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１１３：７４２－７４６（１９９３）によって示される、ネイティブペプチドのインヒビター、アゴニストまたはアンタゴニストとして作用する分子が挙げられる。

【０５２１】

上記のように機能的アッセイにより選択された標的特異的抗体を単離すること、次いでその結晶構造を解明することもまた可能である。このアプローチは、原則として、引き続きの薬物設計が基づき得るファーマコア（ｐｈａｒｍａｃｏｒｅ）を得る。機能的な薬理学的に活性な抗体に対する抗イディオタイプ抗体（抗ｉｄ）を生成することによって全くタンパク質結晶解析を回避することが可能である。鏡像の鏡像として、抗ｉｄの結合部位は、元乗れ似非ぷたーのアナログであることが予定される。次いで、抗ｉｄを使用して、化学的または生物学的に生成されたペプチドの傾斜（ｂａｎｋ）からペプチドを同定および単離することができる。次いで、この単離されたペプチドは、ファーマコアとして作用し得る。

【０５２２】

本発明により、十分量のＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドは、Ｘ線結晶構造解析のような分離研究を行うために利用可能に作製され得る。さらに、本明細書において提供される、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドのアミノ酸配列の知見は、Ｘ線結晶構造解析の代わりまたはそれに加えて、コンピュータモデリング技術を使用する技術への案内を提供する。

【０５２３】

（実施例１１：アンチセンスオリゴヌクレオチドの調製）

オリゴヌクレオチド合成。置換されていないかまたは置換されたホスホジエステル（Ｐ＝０）オリゴヌクレオチドを、ヨード化による酸化を用いた標準的なホスホルアミダイトを用いて、自動化ＤＮＡ合成器（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　ｍｏｄｅｌ　３８０Ｂ）において合成する。ホスホロチオエート（Ｐ＝Ｓ）を、ホスファイト結合の段階的チオ化（ｔｈｉａｔｉｏｎ）のために、アセトニトリル中の３Ｈ－１，２－ベンゾジチオール－３－オン１，１－ジオキシドの標準的な酸化ボトルを、０．２Ｍ容器に置き換えることを除き、ホスホジエステルオリゴヌクレオチドについてと同様に合成する。チオ化待機工程は、６８℃に上昇させ、そして続いて捕捉工程を行う。ＣＰＧカラムからの切断および

濃水酸化アンモニウム中で５５℃（１８時間）脱ブロック化した後、そのオリゴヌクレオチドを、２回２．５容積のエタノールを用いて０．５Ｍ　ＮａＣｌ溶液から沈降させることにより精製する。ホスフィネートオリゴヌクレオチドは、米国特許第５，５０８，２７０号において記載されるように調製する。この文献は、本明細書において参考として援用される。アルキルホスホネートオリゴヌクレオチドは、米国特許第４，４６９，８６３号に記載されるように調製される。この文献は、本明細書において参考として援用される。３’－デオキシ－３’－メチレンホスホネートオリゴヌクレオチドは、米国特許第５，６１０，２８９　号または同第５，６２５，０５０号において記載されるように調製される。これらの文献は、本明細書において参考として援用される。ホスホルアミダイトオリゴヌクレオチドは、米国特許第５，２５６，７７５号または同第５，３６６，８７８号に記載されるように調製される。これは、本明細書において参考として援用される。アルキルホスホノチオエートオリゴヌクレオチドは、公開されたＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ９４／００９０２およびＰＣＴ／ＵＳ９３／０６９７６（それぞれ、ＷＯ　９４／１７０９３およびＷＯ　９４／０２４９９として公開された）において記載されるように調製する。これらの文献は、本明細書において参考として援用される。３’－デオキシ－３’－アミノホスホルアミデートオリゴヌクレオチドは、米国特許第５，４７６，９２５号において記載されるように調製される。この文献は、本明細書において参考として援用される。ホスホトリエステルオリゴヌクレオチドは、米国特許第５，０２３，２４３号に記載されるように調製される。この文献は、本明細書において参考として援用される。ボラノホスフェートオリゴヌクレオチドは、米国特許第５，１３０，３０２号および同第５，１７７，１９８号に記載されるように調製される。これらは両方とも本明細書において参考として援用される。

【０５２４】

オリゴヌクレオチド合成。メチレンメチルイミノ結合オリゴヌクレオシド（ＭＭＩ結合オリゴヌクレオシド）、メチレンジメチルヒドラゾ結合オリゴヌクレオシド（ＭＤＨ結合オリゴヌクレオシド）、およびメチレンカルボニルアミノ結合オリゴヌクレオシド（アミド－３結合オリゴヌクレオシド）、ならびにメチレン

アミノカルボニル結合オリゴヌクレオシド（アミド－４結合オリゴヌクレオシド）、ならびに例えば、ＭＭＩおよびＰ＝ＯまたはＰ＝Ｓの結合を変更するｔことを有する混合された骨格化合物は以下に記載されるようにして調製される：米国特許第５，３７８，８２５号、同第５，３８６，０２３号、同第５，４８９，６７７号、同第５，６０２，２４０号、および同第５，６１０，２８９号（これらはすべて、本明細書において参考として援用される）。ホルムアセタールおよびクロロホルムアセタールおよびチオホルムアセタール結合オリゴヌクレオシドは、米国特許第５，２６４，５６２号、同第５，２６４，５６４号に記載されるように調製される。これらは、本明細書において参考として援用される。エチレンオキシド結合オリゴヌクレオシドは、米国特許第５，２２３，６１８号に記載されるように調製される。これは、本明細書において参考として援用される。

【０５２５】

ＰＮＡ合成。ペプチド核酸（ＰＮＡ）は、以下において参照される種々の手順のいずれかに従って調製される：Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ（ＰＮＡ）：Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ　ａｎｄ　Ｐｏｔｅｎｔｉａｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ　＆　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，４：５－２３　（１９９６）。これらはまた、米国特許第５，５３９，０８２号、同第　５，７００，９２２号、および同第５，７１９，２６２号に従って調製される。これは、本明細書において参考として援用される。

【０５２６】

キメラオリゴヌクレオチドの合成。［２’－Ｏ－Ｍｅ］－［２’－デオキシ］－［２’－Ｏ－Ｍｅ］キメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチド：２’－Ｏ－アルキルホスホロチオエートオリゴヌクレオチドセグメントおよび２’－デオキシホスホロチオエートオリゴヌクレオチドセグメントを有する、キメラオリゴヌクレオチドを、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍの自動化ＤＮＡ合成器Ｍｏｄｅｌ　３８０Ｂを用いて、上述のように合成する。オリゴヌクレオチドを、自動化合成器、ならびにＤＮＡ部分について２’－デオキシ－５’－ジメトキシトリチル－３’－ホスホロアミダイトおよび５’および３’のウィングについて

５’－ジメトキシトリチル－２’－Ｏ－メチル－３’－Ｏ－ホスホロアミダイトを用いて合成する。標準的な合成サイクルを、テトラゾールおよび塩基の送達後の待機工程を６００秒をＲＮＡについて４回の反復に、２’－Ｏ－メチルについて２回までに増加させることにより改変する。完全に保護されたオリゴヌクレオチドを、その支持体から切断し、そしてホスフェート基を３：１アンモニア／エタノール中で室温にて一晩脱保護し、次いで凍結乾燥して乾燥させる。次いで、メタノール性アンモニア中での２４時間にわたる室温での処理を行って、すべての塩基を脱保護し、そしてサンプルを再び凍結乾燥して乾燥させる。そのペレットを、ＴＨＦ中の１Ｍ　ＴＢＡＦ中で２４時間にわたり室温で再懸濁して２’位を脱保護する。次いで、その反応を、１Ｍ　ＴＥＡＡでクエンチし、次いでそのサンプルをｒｏｔｏｖａｃにより１／２容量にまで減少させ、その後Ｇ２５のサイズの排除カラムで脱塩する。次いで回収したオリゴをキャピラリー電気泳動および質量分析により、収率および純度について分光学的に分析する。［２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）］－［２’－デオキシ］－［２’－Ｏ－（メトキシエチル）］キメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチド：［２’－デオキシ］－［２’－Ｏ－（メトキシエチル）］キメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを２’－Ｏ－メチルキメラオリゴヌクレオチドについての上記手順に従って、２’－Ｏ－（メトキシエチル）アミダイトを２’－Ｏ－メチルアミダイトの代わりに使用して調製する。［２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）ホスホロジエステル］－［２’－デオキシホスホロチオエート］－［２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）ホスホジエステル］キメラオリゴヌクレオチド：［２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）ホスホロジエステル］－［２’－デオキシホスホロチオエート］－［２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）ホスホジエステル］キメラオリゴヌクレオチドを、２’－Ｏ－（メトキシエチル）アミダイトを２’－Ｏ－メチルアミダイトの代わりに使用して調製し、ヨウ素で酸化してホスホロジエステルヌクレオチド間結合を、キメラ構造のウイング部分内に生成し、そして３Ｈ－１，２－ベンゾジチオール－３－オン１，１ジオキシド（Ｂｅａｕｃａｇｅ試薬）を硫化して中心のギャップについてホスホロチオエートのヌクレオチド間結合を生成する。他のキメラオリゴヌクレオチド、キメラオリゴヌクレオシド、および混合キメラ

オリゴヌクレオチド／オリゴヌクレオシドは、米国特許第５，６２３，０６５号にしたがって合成する。この文献を本明細書において参考として援用する。

【０５２７】

（実施例１２：角膜新血管形成アッセイ）

新血管形成のインデューサーとしてＶＥＧＦを用いた角膜新血管形成アッセイを用いて、抗新血管形成活性についてＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２のアンタゴニストとして、あるいは新血管形成を増強することについてＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２のアゴニストとして分子を試験し得る。１．５mmの切除を、イソフルラン－ケタミン（６０－８０ｍｇ／ｋｇ）キシラジン（１０－１５ｍｇ／ｋｇ）の麻酔したＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの角膜の中心から約１っmのところに作製する。曲げたスパーテルを用いて、その切除を、目の外側眼角に向けて間質を通じて平滑に切除する。ＶＥＧＦ（２００ｎｇ）、スクラルファート（１００μｇ）を含みおよび種々の量での試験分子ありまたはなし（コントロール）のＨｙｄｒｏｎのペレット（２×２０mm）をそのポケットの基底部へと挿入する。手術後、眼をゲンタマイシン軟膏でコーティングする。動物を非特異的炎症の発生について２４－４８時間で観察し、次いでその後毎日観察する。６日目に、その動物を安楽死させ、そしてＦＩＴＣデキストランを注射して血管系の可視化をさせる。角膜の全土台は核を抜かれた眼からできており、そしてコンピュータ補助画像化分析を用いて新血管形成領域について分析する。

【０５２８】

ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２のアンタゴニストのインビボ抗新血管形成効果を、上記のようにＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの角膜に移植された、種々のＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２のアンタゴニストを伴うかまたは伴わないかで、２００ｎｇの組換えＶＥＧＦを

含むＨｙｄｒｏｎペレットを用いて示す。新血管形成のインビボ増強もまた、この系において研究され得る。この実験からのデータは、ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２のアンタゴニストおよびＶＥＧＦの組合せを含むペレットがＶＥＧＦのみ（陽性）コントロールに比較して、血管長において有意な減少を生じ得ることを示す。これらのインビボのデータは、インビトロのデータと一致している。すなわち、ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２の拮抗作用は、内皮組織における新血管形成の強力な阻害を生じる。逆に、ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２のアゴニズムは、内皮組織における新血管形成の増強を生じる。

【０５２９】

（実施例１３：内皮増殖アッセイ）

ＨＵＶＥＣを、１０％　ＦＢＳ、２mMＬグルタミン、１００Ｕ／ｍｌのペニシリンおよび１００Ｕ／ｍｌのストレプトマイシンを補充した、Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ　ＥＧＭ中で６，０００細胞／cm^2でコラーゲンコーティングした９６ウェルプレート上に播種し、そして４時間にわたり付着させる。次いで、培地を、１％ＦＢＳ、１×ＩＴＳ、２mM　Ｌ－グルタミン、５０ｍｇ／ｍｌアスコルビン酸、２６．５mM　$NaHCO_3$、１００Ｕ／ｍｌペニシリンおよび１００Ｕ／ｍｌストレプトマイシンを補充し、４０ｎｇ／ｍｌ　ｂＦＧＦ、４０ｎｇ／ｍｌ　ＶＥＧＦおよび８０nM　PMAを補充したＭ１９３からなる１×基本培地に置き換える。細胞を、上記培地に、試験薬物またはビヒクルの存在下で４時間培養する。次いで５ｍｌ（１００mM）の５’－ブロモ－２’－デオキシウリジン（ＢｒｄＵ）を最終容量１００ｍｇ／ウェルに加え、そして細胞をさらに２０時間にわたりインキュベートする。ＢｒｄＵ取り込みを、Ｂｏｅｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ（Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、ＩＮ）からのＥＬＩＳＡキットにより評価する。

【０５３０】

データを、平均±標準誤差として表す。統計学的な分析は、片側ＡＮＯＶＡ（ＩＮＳＴＡＴ、Ｇｒａｐｈ Ｐａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｓｏｒｒｅｎｔｏ Ｖａｌｌｅｙ，ＣＡ）を用いて行う。そのコントロールに対する多重比較を、ステューデントのｔ検定のＢｏｎｆｅｒｒｏｎｉ改変を用いて分析して、群間の差異を決定する。ｐ値＜０．０５を有意として受容する。

【０５３１】

このアッセイは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のアンタゴニストが増殖因子誘導性の内皮細胞増殖を抑制または阻害し得ることを示し得る。ＢｒｄＵ取り込みアッセイを行って、ビヒクルあるいはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のアンタゴニストの存在下で、増殖因子（例えば、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦおよびＰＭＡ）を含む培地においてＩ型コラーゲンコーティングされた表面上で培養された内皮細胞の増殖を検出する。従って、本発明はまた、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のアンタゴニストの有効量と内皮細胞とを接触させることによって、増殖因子誘導性内皮細胞増殖を阻害する方法に関する。増殖因子誘導性内皮細胞増殖から生じる、所望されない血管形成および新血管形成に関連する状態は、本明細書において記載される様式においてそのアンタゴニストを投与することによって処置され得る。

【０５３２】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２はまた、新血管形成に関連する遺伝子発現事象を調節する。Ｆｌｋ／ＫＤＲおよびＦｉｔ－１は、２つの構造的に関連する、ＶＥＧＦに対する内皮細胞チロシンキナーゼレセプターである。新血管形成の間のこれらの２つのレセプターの重要性は、ＫＤＲが内皮細胞増殖および分化をシグナル伝達するトランスデューサーとして機能すること、およびＦｌｔ－１が内皮細胞形態形成に関与する重要な生存因子であるという知見によってあきらかに実証された（Ｆｏｎｇ，Ｇ．Ｈ．ｅｔ ａｌ．，（１９９５

）Ｎａｔｕｒｅ（Ｌｏｎｄｏｎ）３７６：６６－７０；Ｆｅｒｒａｒａ，Ｎ．ｅｔ　ａｌ．，（１９９７）Ｅｎｄｏｃｒ．Ｒｅｖ．１８：４－２５；Ｉｌａｎ，Ｎ．ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｓｃｉ．１１１：３６２１－３６３１）。ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の活性を増強またはブロックすることが、Ｆｌｔ－１およびＫＤＲの遺伝子発現を変化するか否かは、リアルタイム定量ＲＴ－ＰＣＲを用いて、三次元コラーゲンゲルにおけるＨＵＶＥＣにおける増殖因子の混合物を用いた系において容易に決定され得る。プロテアーゼ（例えば、プラスミノーゲンアクチベーター）およびそのインヒビター（例えば、新血管形成プロセスの２つの重要な工程である、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビターＩ、ＰＡＩ－１）の生成が細胞外マトリクスの内皮細胞分解および遊走と相関づけられている。結果、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のアゴニズムまたは拮抗作用の、三次元コラーゲンゲルにおいてウロキナーゼ型プラスミノーゲン（ｕＰＡ）およびＰＡＩ－１の遺伝子発現に対する効果は、容易に決定され得る。ＨＵＶＥＣの試験薬物での処理は、約４時間でｕＰＡ　ｍＲＮＡを減少または増強のいずれかをし得、そして約２４時間においてＰＡＩ－１遺伝子発現を減少または増強し得る。

【０５３３】

（実施例１４：内皮細胞増殖の刺激）

このアッセイを、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２が副腎皮質毛細血管内皮細胞（ＡＣＥ）増殖を刺激する能力を示すか否かを決定するように設計する。

【０５３４】

ウシ副腎皮質毛細血管内皮細胞（ＡＣＥ）（初代培養から、最大で１２－１４継代）は、１００マイクロリットルあたり５００細胞／ウェルで９６ウェルプレートにプレートする。アッセイ培地は、低グルコースＤＭＥＭ、１０％仔ウシ血清、２ｍＭグルタミンおよび１×ペニシリン／ストレプトマイシン／フンジゾン

（ｆｕｎｇｉｚｏｎｅ）を含んだ。コントロールウェルは、以下を含んだ：（１）ＡＣＥ細胞を加えない；（２）ＡＣＥ細胞単独；（３）ＡＣＥ細胞およびＶＥＧＦ（５ｎｇ／ｍｌ）；ならびに（４）ＡＣＥ細胞およびＦＧＦ（５ｎｇ／ｍｌ）。次いで、コントロールまたは試験サンプル（１００μｌ容量）を、そのウェルに加える（それぞれ、１％、０．１％および０．０１％の希釈で）。細胞培養物を、３７℃／５％　CO_2で６－７日にわたりインキュベートする。インキュベーション後、そのウェルの中のその培地を吸引し、そしてその細胞を１回ＰＢＳで洗浄する。次いで、酸ホスファターゼ反応混合物（１００μｌ；０．１M酢酸ナトリウム、ｐＨ５．５、０．１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００，１０mM　ｐ－ニトロフェニルホスフェート）を各ウェルに加える。２時間の３７℃でのインキュベーション後、その反応を、１０μｌの１Ｎ　ＮａＯＨの添加により停止する。光学密度（ＯＤ）を４０５nmでマイクロプレートリーダー上で測定する。

【０５３５】

ＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２の活性を、（Ｉ）細胞のみのバックグラウンドに比較して、および（２）ＶＥＧＦによる最大刺激に比較して、増殖の増殖倍率として算出する（酸ホスファターゼ活性によって決定する、ＯＤ４０５nm）。ＶＥＧＦ（３－１０ｎｇ／ｍｌ）およびＦＧＦ（１－５ｎｇ／ｍｌ）を最大刺激についての活性参照として使用する。このアッセイの結果を、観察された刺激がバックグラウンドに対して、５０％以上の増加である場合「陽性」とみなす。

【０５３６】

（実施例１５：内皮細胞増殖の血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）刺激増殖の阻害）

種々のＰＲＯ－Ｃ－MG．２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．１２、ＰＲＯ－Ｃ－MG．４５、ＰＲＯ－Ｃ－MG．６４またはＰＲＯ－Ｃ－MG．７２のポリペプチドがＶＥＧＦ刺激された内皮細胞の増殖を阻害する能力を、試験し得る。具体的には、ウシ副腎皮質毛細血管内皮細胞（ＡＣＥ）（初代培養由来、最大１２－１４継

代）を、１００μｌあたり、９６ウェルプレート中で５００細胞／ウェルでプレートする。アッセイ培地は以下を含む：低グルコースＤＭＥＭ、１０％ウシ血清、２mMグルタミン、および１×ペニシリン／ストレプトマイシン／フンジゾン。コントロールウェルは、以下を含む：（１）ＡＣＥ細胞を加えない；（２）ＡＣＥ細胞単独；（３）ＡＣＥ細胞および５ｎｇ／ｍｌ　ＦＧＦ；（４）ＡＣＥ細胞および３ｎｇ／ｍｌ　ＶＥＧＦ；（５）ＡＣＥ細胞および３ｎｇ／ｍｌ　ＡＶＥＧＦおよび１ｎｇ／ｍｌ　ＴＧＦβ；ならびに（６）ＡＣＥ細胞および３ｎｇ／ｍｌ　ＶＥＧＦおよび３ｎｇ／ｍｌ　ＶＥＧＦおよび５ｎｇ／ｍｌ　ＬＩＦ。次いで、試験サンプルであるポリｈｉｓタグ化されたＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチド（１００μｌ容量）を、ウェルに添加する（それぞれ、１％、０．１％および０．０１％の希釈で）。この細胞培養物を、３７℃／５％CO_2で６－７日にわたりインキュベートする。インキュベーション後、ウェル中の培地を吸引し、その細胞を１回ＰＢＳで洗浄する。次いで、酸ホスファターゼ反応混合物（１００μｌ；０．１M酢酸ナトリウム、ｐＨ５．５、０．１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００，１０mM　ｐ－ニトロフェニルホスフェート）を各ウェルに加える。２時間の３７℃でのインキュベーション後、その反応を、１０μｌの１Ｎ　ＮａＯＨの添加により停止する。光学密度（ＯＤ）を４０５nmでマイクロプレートリーダー上で測定する。

【０５３７】

ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の活性を、刺激なしの細胞に比較して、ＶＥＧＦ（３ｎｇ／ｍｌ）刺激された増殖の阻害の％として算出する（ＯＤ４０５nmでの酸ホスファターゼ活性によって決定する）。ＴＧＦβを、１ｎｇ／ｍｌで活性参照として使用する。なぜなら、ＴＧＦβは、ＶＥＧＦ刺激されたＡＣＥ細胞増殖の７０－９０％をブロックするからである。その結果は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドの癌治療における、および特に腫瘍新血管形成の阻害における有用性の指標である。そ

の結果は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペptちどが、内皮細胞増殖のＶＥＧＦ刺激の３０％以上の阻害を示す（相対阻害３０％以上）場合、陽性であるとみなす。

【０５３８】

（実施例１６：ｃ－ｆｏｓの内皮細胞における誘導）

このアッセイは、内皮細胞においてｃ－ｆｏｓを誘導する能力を、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドが示すか否かを決定するように設計する。

【０５３９】

増殖培地（ＧＨＴなしの５０％Ｈａｍ　Ｆ１２：低グルコース、およびグリシンなしの５０％DMEM：$NaHCO_3$、１％　グルタミン、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１０％　ＦＢＳ、１０ｎｇ／ｍｌ　ｂＦＧＦを有する）中のヒト静脈臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ、Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を細胞密度1×10^4細胞／ウェルで９６ウェルマイクロタイタープレートでプレートする。プレート後の翌日、その細胞を、増殖培地を取り出すこと、および１００ＨＩ／ウェル試験サンプルおよびコントロール（陽性コントロール：増殖培地；陰性コントロール：１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１４０ｍＭ　ＮａＣｌ、４％（ｗ／ｖ）マンニトール、ｐＨ６．８）でその細胞を処置することによって飢餓させる。その細胞を、３０分間にわたり３７℃で、５％　CO_2中でインキュベートする。そのサンプルを取り出し、そしてｂＤＮＡキットプロトコルの最初の一部（Ｃｈｉｒｏｎ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、カタログ番号６００５－０３７）に従い、ここで、以下に列挙する各々の大文字の試薬／緩衝液は、そのキットから入手可能である。

【０５４０】

手短には、試験に必要なＴＭ溶解緩衝液（Ｌｙｓｉｓ　Ｂｕｆｆｅｒ）およびプローブ（Ｐｒｏｂｅ）の量は、製造業者によって提供される情報に基づいて算出される。融解したプローブの適切な量を、ＴＭ溶解緩衝液に加える。捕捉ハイ

ブリダイゼーション緩衝液（Ｃａｐｔｕｒｅ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ）を室温に温める。ｂＤＮＡストリップを金属ストリップホルダーに設定し、１００μｌの捕捉ハイブリダイゼーション緩衝液を必要とされる各ｂＤＮＡウェルに加え、次いで少なくとも３０分にわたりインキュベートする。細胞を有する試験プレートを、インキュベーターから除去し、そしてその培地をゆっくりと、真空マニホルドを用いて取り除く。プローブを有する、１００μｌの溶解ハイブリダイゼーション緩衝液を、マイクロタイタープレートの各々のウェル中に迅速にピペッティングする。次いで、プレートを５５℃で１５分にわたりインキュベートする。インキュベーターからの取り出し後、そのプレートをマイクロタイターアダプターヘッドを有するボルテックスミキサー上に配置し、そして＃２の設定で１分間にわたりボルテックスする。８０μｌの溶解物を取り出し、そして捕捉ハイブリダイゼーション緩衝液を含むｂＤＮＡウェルに加え、そして上下にピペッティングして混合する。そのプレートを、少なくとも１６時間にわたり５３℃でインキュベートする。

【０５４１】

翌日、ｂＤＮＡキットプロトコルの第二部分に従う。具体的には、そのプレートをインキュベーターから取り出し、そしてベンチにおいて１０分間にわたり冷却する。必要とされる添加物の容量は、製造業者によって提供される情報に基づいて算出する。増幅因子作業溶液（Ａｍｐｌｉｆｉｅｒ　Ｗｏｒｋｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ）を、ＡＬハイブリダイゼーション緩衝液（Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ）中で増幅因子濃縮物（Ａｍｐｌｉｆｉｅｒ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅ）（２０ｆｍ／μｌ）の１；１００希釈物を作製することによって調製する。このハイブリダイゼーション混合物を、そのプレートから取り出し、そして洗浄液（Ｗａｓｈ）Ａで２回洗浄する。５０μｌの増幅因子作業溶液を各ウェルに添加し、そしてそのウェルを３０分間にわたり５３℃でインキュベートする。次いで、そのプレートは、そのインキュベーターから取り出し、そして１０分間にわたり冷却させる。標識プローブ作業溶液（Ｌａｂｅｌ　Ｐｒｏｂｅ　Ｗｏｒｋｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ）を、ＡＬハイブリダイゼーション緩衝液中で標識濃縮物（Ｌａｂｅｌ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅ）（４０ｐモル／μＬ）を

作製することによって調製する。１０分間の冷却期間の後、増殖因子ハイブリダイゼーション混合物を取り出し、そしてそのプレートを２回洗浄液Ａで洗浄する。５０μｌの標識プローブ作業溶液を各ウェルに加え、そしてそのウェルを、１５分間にわたり５３℃でインキュベートする。１０分間にわたる冷却後、基質（Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ）を室温に温める。そのアッセイに必要な基質１ｍｌ各々に、３μｌの基質エンハンサー（Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ　Ｅｎｈａｎｃｅｒ）を加える際に、そのプレートを１０分間冷却させ、その標識ハイブリダイゼーション混合物を取り出し、そしてそのプレートを洗浄液Ａで２回洗浄し、そして洗浄液（Ｗａｓｈ）Ｄで３回洗浄する。エンハンサー（Ｅｎｈａｎｃｅｒ）をともなう、５０μｌの基質溶液（Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ）を各ウェルに加える。そのプレートを３７℃で３０分間にわたりインキュベートし、そしてＲＬＵを適切なルミノメーター中で読む。

【０５４２】

反復したものを平均し、そして変異係数を決定する。陰性コントロール（ＨＥＰＥＳ緩衝液）の値に対する増加倍率の活性測定を、化学発光単位（ＲＬＵ）により示す。結果は、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドが陰性コントロールに対して少なくとも２倍の値を示す場合、陽性とみなす。代表的には、１．００％希釈で、陰性コントロール＝約１．００ＲＬＵ、そして１．００％希釈で陽性コントロール＝約８．３９。

【０５４３】

（実施例１７：ヒト静脈内皮細胞カルシウムフラックスアッセイ）

このアッセイは、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２のポリペプチドがヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ，Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍ）におけるカルシウムフラックスを刺激する能力を示すか否かを決定するように設計する。カルシウム流入は、そのレセプターに対する特定のリガンドの結合の際の十分に説明された応答である。このＣａ流入アッセイにおける陽性応答を生じる試験化合物は、特定のレセプターに結合するということができ、そしてヒト内皮細胞

における生物学的シグナル伝達経路を活性化するということができる。これは、例えば、細胞分裂、細胞増殖の阻害、内皮管形成、細胞遊走、アポトーシスなどを最終的にもたらし得る。

【０５４４】

増殖培地（グリシンなしの５０：５０、１％グルタミン、１０mM Ｈｅｐｅｓ、１０％ ＦＢＳ、１０ｎｇ／ｍｌ Ｂｆｇｆ）中のヒト静脈臍静脈内皮細胞（HUVEC、Ｃｅｌｌ Ｓｙｓｔｅｍｓ）を９６ウェルマイクロタイターＶｉｅｗＰｌａｔｅｓ－９６ （Ｐａｃｋａｒｄ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ Ｃｏｍｐａｎｙ Ｐａｒｔ ＃６００５１８２）マイクロタイタープレートに2×10^4細胞／ウェルの細胞密度でプレートする。プレートの翌日、その細胞を緩衝液（ＨＢＳＳおよび１０mM Ｈｅｐｅｓ）で3回洗浄し、１００μｌ／ウェルを残す。次いで、１００μｌ／ウェルの８μMのＦｌｕｏ－３（２×）を加える。その細胞を、１．５時間３７℃で５％ CO_2でインキュベートする。次いでインキュベーション後、その細胞を、3回緩衝液（上述）で洗浄し、１００μｌ／ウェルを残す。試験薬物を、緩衝液中で５×濃度で異なる９６ウェルプレート上で調製する。陽性コントロールは、５０μMのイオノマイシン（５×）に対応し；陰性コントロールは、Ｐｒｏｔｅｉｎ３２に対応した。細胞プレートおよびサンプルプレートは、ＦＬＩＰＲ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ）機器において実行する。ＦＬＩＰＲ機器は２５μｌの試験サンプルをその細胞に加え、そして読み取りを、１分にわたり毎秒行い、次いで次の３分間にわたり３秒ごとに行う。

【０５４５】

基底線からその曲線の最大の上昇の蛍光の変化（A変化）を算出し、そして反復したものを平均する。蛍光の増加率をモニターし、そしてA変化が１０００を超え、かつ、６０秒内の上昇を有したサンプルのみを陽性とみなす。結果を、陽性コントロールに比較して表す。

【０５４６】

（実施例１８：内皮細胞管形成アッセイ）

実施例１に記載される管形成アッセイの代替として、以下の管形成アッセイの

いずれかを使用し得る。管形成アッセイにおいて、内皮管形成を刺激または阻害し得る因子（三次元マトリクスにおいて移動、化学遊走および／または内皮形態変化を刺激または阻害することに関与する因子、および特に三次元マトリクスにおいて、外因性増殖因子（例えば、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ）の存在下で、管様構造へと分化させるように内皮細胞を刺激する因子を含む）は、容易に同定され得る。これらの因子は、本明細書において記載されるように、アゴニストまたはアンタゴニストであり得る。

【０５４７】

マトリゲル（Ｍａｔｒｉｇｅｌ）管形成アッセイ。０．５ｍｌのＭａｔｒｉｇｅｌ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　＃４０２３）を、２４ウェル組織培養プレートの各ウェルの表面にピペッティングする。このマトリゲルを、２０分間３７℃でのインキュベーションにより固化させる。ヒト臍静脈内皮細胞を、培養培地（培地１９９、１％仔ウシ血清、１×インスリン－トランスフェリン－セレン（ＩＴＳ）溶液、２ｍモル／Ｌ　Ｌ－グルタミン、２６．５　$NaHCO_3$、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、１００Ｕ／ｍｌストレプトマイシンを補充）中に１ｍｌあたり2×10^5細胞で再懸濁する。以下のうちの１つを加え得る：（ａ）添加物なし；（ｂ）塩基性線維芽細胞増殖因子（４０ｎｇ／ｍｌ）；（ｃ）血管内皮細胞増殖因子（４０ｎｇ／ｍｌ）；（ｄ）ホルボールミリステートアセテート（８０ｎＭ）；（ｅ）（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）の組合せ；ならびに（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）または（ｅ）の任意の１つ以上と、種々の濃度での試験因子との組合せ。次いで、１細胞懸濁物の１ウェルあたり２００μｌを、固化したＭａｔｒｉｇｅｌの上に加える（約４０，０００細胞／ウェル）。次いで、その細胞を、湿潤化５％　CO_2インキュベーター中で培養し、そして４時間、８時間および２４時間で観察する。このアッセイにおける活性を、管様構造の形成における変化として測定する。これは、形成された管様構造の長さの測定および／または管様網によって網羅される培養物の面積の測定によって定量し得る。

【０５４８】

フィブリンゲル管形成アッセイ。トロンビン溶液を、基本培地（１％仔ウシ血

清、１×インスリン－トランスフェリン－セレン（ＩＴＳ）溶液、２mモル／Ｌ　Ｌ－グルタミン、２６．５　$NaHCO_3$、１００U／mｌペニシリン、１００U／mｌストレプトマイシンを補充した培地１９９）を2ｍｌ、１００Uトロンビン（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ、カタログ＃６６３４）を加えることによって調製する。これを氷上で維持する。フィブリノーゲン溶液を、１１２mgのフィブリノーゲン（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｃａｔａｌｏｇ　＃Ｆ－４８８３）を４４ｍｌの基本培地に溶解することによって調製する。次いで、ヒト臍内皮細胞を、フィブリノーゲン溶液中に１ｍｌあたり４×10^5細胞の最終濃度で懸濁する。次いで、このトロンビン溶液を氷上の４８ウェル組織培養プレートのウェルにアリコートする（１０μｌ／ウェル）。次いで、３００μｌのHUVEC／フィブリノーゲン混合物を、各トロンビン含有ウェルに加え、そして3から5回ピペッティングすることによって混合する。このプレートを、２０分間にわたり３７℃でインキュベートすることによって、フィブリンゲルの固化をさせる。次いで、基本培地に以下のうちの１つを加える：（ａ）添加物なし；（ｂ）塩基性線維芽増殖因子（４０ｎｇ／ｍｌ）；（ｃ）血管内皮細胞増殖因子（４０ｎｇ／ｍｌ）；（ｄ）ホルボールミリステートアセテート（８０nM）；（ｅ）（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）の組合せ；ならびに（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）または（ｅ）の任意の１つ以上と、種々の濃度での試験因子との組合せ。このアッセイにおける活性を、管様構造の形成における変化として測定する。これは、形成された管様構造の長さの測定および／または管様網によって網羅される培養物の面積の測定により定量され得る。

【０５４９】

アゴニストまたはアンタゴニストのいずれかの因子（例えば、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．１２、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．４５、ＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．６４またはＰＲＯ－Ｃ－ＭＧ．７２の発現をブロックする因子）はまた、以下のスコア付けで迅速にスクリーニングされ得る。ここでは、陽性の結果は、２以上のスコア：スコア１，細胞はすべて丸い；スコア２，細胞は長くなっている；スコア３，細胞はいくつかの結合とともに管を形成している；ならびにスコア４、細胞は複合管網を形成している。

【０５５０】

必要に応じて、細胞溶液に、約１μMの６－ＦＡＭ－ＦＩＴＣ色素を加えて、それらが形成しつつあるときに液胞を染色し得る。そして、インキュベーション後に、細胞を、３．７％ホルマリンで室温で１０分間にわたり固定し、ＰＢＳで５回洗浄し、次いでＲｈ－ファロイディンで４℃で一晩染色し、続いて４μＭ　ＤＡＰＩで核染色する。続いて、その細胞を、アポトーシスに対する因子の効果についてスコア付けし得、それにより、特に、外因性増殖因子（例えば、ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ）の存在下で、三次元マトリクスにおける細胞生存を容易にするかまたは減少させる因子を同定することを可能にする。このアポトーシスアッセイにおいて、陽性の結果は、１以下であり、ここで０＝アポトーシスなし、１＝約２０％未満の細胞がアポトーシスである、２＝約５０％未満の細胞がアポトーシスである、そして３＝約５０％より多い細胞がアポトーシスである。さらに、液胞染色に加え、ｂＦＧＦまたはＶＥＧＦ（４０ｎｇ／ｍｌ）の存在下で、それらが形成しつつある間の液胞を染色するための１μＭ　６－ＦＡＭ－ＦＩＴＣ色素とともに、内皮液胞形成および管腔の形成を刺激または減少する因子を同定し得る。細胞を、３７℃で／５％　CO_2で４８時間インキュベートし、３．７％ホルマリンで室温で１０分間にわたり固定し、ＰＢＳで５回洗浄し、次いでＲｈ－ファロイディンで４℃で一晩染色し、続いて４μＭ　ＤＡＰＩで核染色する。陽性の結果は、２以上であり：１＝２０％未満の細胞に液胞が存在する、２＝２０－５０％の細胞に液胞が存在する、３＝５０％を超える細胞に液胞が存在する。このアッセイは、ピノサイトーシス、イオンポンプ活動、透過性、および接合形成を刺激することに関与する因子を同定するように設計される。

【０５５１】

（材料の寄託）

以下の材料は、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，１０８０１　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｂｌｖｄ．，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ　２０１１０－２２０９，ＵＳＡ　（ＡＴＣＣ）に寄託した：

材料	ＡＴＣＣ寄託番号	寄託日
ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．２－１７７６	ＰＴＡ－７９９	１９９９年9月２８日

ＤＮＡ－Ｃ－ＭＧ．１２－１７７６　ＰＴＡ－７９８　１９９９年9月２８日。

【０５５２】

この寄託は、特許手続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およびその規則（ブダペスト条約）の規定に基づいて行った。これは、寄託日から３０年間にわたり寄託の生存培養の維持を保証する。この寄託物は、ブダペスト条約の規定の元でＡＴＣＣにより入手可能になり、そしてＧｅｎｅｎｔｅｃ，Ｉｎｃ．とＡＴＣＣとの間の合意に従う。これは、関連する米国特許の発行、または米国または米国にとっての外国の特許出願の公への公開の際のいずれか早い方に公にその寄託物の培養物の子孫の恒久のかつ拘束されない入手可能性を保証し、そして米国特許第１２２条に従ってかつその関連する長官規則（米国特許施行規則１．１４および特に８８６ＯＧ６３８を含む）に従って与えられるべき、米国特許商標庁長官によって決定される者に対するその子孫の入手可能性を保証する。

【０５５３】

本願の譲受人は、適切な条件下で培養される場合に寄託に係る材料の培養物が死滅し、または紛失し、または破壊されるとき、その材料は、同じものの別のものへ通知によって迅速に置き換えられることに合意した。寄託材料の入手可能性は、その特許法に従って、任意の政府の当局の元で認証された権利に違反しての本発明を実施する実施権としてみなされるべきではない。

【０５５４】

上記の発明の詳細な説明は、当業者が本発明を実施することを可能にするに十分であると考える。本発明は、寄託された構築物により範囲を限定されるべきではなく、これは、単なる本発明の特定の実施形態の例示であることが意図され、そして機能的に等価な任意の構築物は、本発明の範囲内にある。本明細書における材料の寄託は、含まれる本明細書における発明の詳細な説明が本発明の任意の実施形態の実施（その最良の形態を含む）を可能にするに不適切であることを認めることを構成せず、しかも、それを、それが表す特定の例示に特許請求の範囲を限定するとみなされるべきではない。実際、本発明の種々の改変は、本明細書に示しそして記載したものに加え、当業者には、以上の説明から明らかであり、

そしてその改変は添付の特許請求の範囲内に入る。

【配列表】

Sequence Listing

<110> Genentech, Inc. and CuraGen Corporation

<120> NOVEL POLYPEPTIDES, THEIR NUCLEIC ACIDS, AND METHODS FOR THEIR USE IN ANGIOGENESIS AND VASCULARIZATION

<130> P1776R2PCT

<141> 2000-10-05

<150> US 60/158,587
<151> 1999-10-07

<150> US 60/162,611
<151> 1999-10-28

<160> 29

<210> 1
<211> 2891
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
ggcgggagtc ggcgcctcgg gttcctacct cgcgtcccta ggcggcggcg 50

gccgggcgtc ccggg atg gcc ttc atg gag aag ccg cca 89
Met Ala Phe Met Glu Lys Pro Pro
1 5

gcc ggc aag gtg ctg ctg gac gac acg gtg ccg ctg aca 128
Ala Gly Lys Val Leu Leu Asp Asp Thr Val Pro Leu Thr
10 15 20

gca gcc atc gag gcg agc cag agc ctg cag tcc cac acg 167
Ala Ala Ile Glu Ala Ser Gln Ser Leu Gln Ser His Thr
25 30

gaa tat att att cga gtg caa aga gga att tct gtg gaa 206
Glu Tyr Ile Ile Arg Val Gln Arg Gly Ile Ser Val Glu
35 40 45

aac agc tgg cag att gtt aga aga tac agt gac ttt gat 245
Asn Ser Trp Gln Ile Val Arg Arg Tyr Ser Asp Phe Asp
50 55 60

ttg ctt aac aac agc tta cag att gca ggc cta agt cta 284
Leu Leu Asn Asn Ser Leu Gln Ile Ala Gly Leu Ser Leu
65 70

cct ctt cct ccc aaa aaa ttg att ggt aac atg gat cgt 323
Pro Leu Pro Pro Lys Lys Leu Ile Gly Asn Met Asp Arg
75 80 85

gaa ttc ata gct gaa agg cag aaa ggt ctt cag aac tat 362
Glu Phe Ile Ala Glu Arg Gln Lys Gly Leu Gln Asn Tyr
90 95

ctc aac gtg atc aca aca aat cat atc ttg tct aat tgt 401
Leu Asn Val Ile Thr Thr Asn His Ile Leu Ser Asn Cys
100 105 110

```
gag ctg gtt aag aag ttt tta gat cca aac aac tat tcc 440
Glu Leu Val Lys Lys Phe Leu Asp Pro Asn Asn Tyr Ser
        115                 120                 125

gca aac tat act gag att gcc ttg caa cag gtt tcc atg 479
Ala Asn Tyr Thr Glu Ile Ala Leu Gln Gln Val Ser Met
                130                 135

ttc ttc cga tca gaa cca aag tgg gag gtg gtg gaa cct 518
Phe Phe Arg Ser Glu Pro Lys Trp Glu Val Val Glu Pro
    140                 145                 150

ttg aaa gac ata ggt tgg aga ata agg aag aaa tat ttc 557
Leu Lys Asp Ile Gly Trp Arg Ile Arg Lys Lys Tyr Phe
            155                 160

ttg atg aag att aaa aat cag cca aag gaa cgg cta gtg 596
Leu Met Lys Ile Lys Asn Gln Pro Lys Glu Arg Leu Val
165                 170                 175

tta agc tgg gct gac ctt ggc cca gac aag tat ttg tca 635
Leu Ser Trp Ala Asp Leu Gly Pro Asp Lys Tyr Leu Ser
        180                 185                 190

gat aaa gat ttt cag tgt cta atc aaa ctt ctg cct tct 674
Asp Lys Asp Phe Gln Cys Leu Ile Lys Leu Leu Pro Ser
                195                 200

tgt ttg cac cct tac atc tat cgg gtt acc ttt gcc aca 713
Cys Leu His Pro Tyr Ile Tyr Arg Val Thr Phe Ala Thr
    205                 210                 215

gct aat gaa tcc tca gcg ttg cta att agg atg ttt aac 752
Ala Asn Glu Ser Ser Ala Leu Leu Ile Arg Met Phe Asn
            220                 225

gaa aag gga aca ttg aag gat ctg atc tac aag gca aaa 791
Glu Lys Gly Thr Leu Lys Asp Leu Ile Tyr Lys Ala Lys
230                 235                 240

cca aaa gac cca ttt cta aag aag tac tgc aac cct aag 830
Pro Lys Asp Pro Phe Leu Lys Lys Tyr Cys Asn Pro Lys
        245                 250                 255

aag att cag ggc ctg gaa ctc cag caa ata aaa aca tat 869
Lys Ile Gln Gly Leu Glu Leu Gln Gln Ile Lys Thr Tyr
                260                 265

gga cgg caa ata tta gag gta ctg aag ttt ctt cat gac 908
Gly Arg Gln Ile Leu Glu Val Leu Lys Phe Leu His Asp
    270                 275                 280

aag gga ttc cct tat ggg cat ctt cac gcc tcc aat gtg 947
Lys Gly Phe Pro Tyr Gly His Leu His Ala Ser Asn Val
            285                 290

atg ctc gat ggg gac act tgt cgg ctg ctg gac ctt gag 986
Met Leu Asp Gly Asp Thr Cys Arg Leu Leu Asp Leu Glu
295                 300                 305

aat tcc tta ttg ggc ctg cct tcc ttc tac cga tct tat 1025
Asn Ser Leu Leu Gly Leu Pro Ser Phe Tyr Arg Ser Tyr
        310                 315                 320
```

```
ttt tca caa ttc agg aaa atc aat aca ttg gaa agt gtg 1064
Phe Ser Gln Phe Arg Lys Ile Asn Thr Leu Glu Ser Val
                325                 330

gat gtc cac tgc ttt ggc cac tta ctg tat gaa atg act 1103
Asp Val His Cys Phe Gly His Leu Leu Tyr Glu Met Thr
    335                 340                 345

tat gga cga ccg cca gac tcg gtg cct gtg gac tcc ttc 1142
Tyr Gly Arg Pro Pro Asp Ser Val Pro Val Asp Ser Phe
            350                 355

cct cct gcc ccg tcc atg gct gtg gtg gcc gtg ttg gag 1181
Pro Pro Ala Pro Ser Met Ala Val Val Ala Val Leu Glu
360                 365                 370

tct acg ctg tct tgt gaa gcc tgt aaa aat ggc atg cct 1220
Ser Thr Leu Ser Cys Glu Ala Cys Lys Asn Gly Met Pro
        375                 380                 385

acc atc tcc cgg ctc tta cag atg cca tta ttc agc gat 1259
Thr Ile Ser Arg Leu Leu Gln Met Pro Leu Phe Ser Asp
                390                 395

gtt tta cta acc act tct gaa aaa cca cag ttt aag atc 1298
Val Leu Leu Thr Thr Ser Glu Lys Pro Gln Phe Lys Ile
    400                 405                 410

cct aca aag tta aaa gag gca ttg aga att gcc aaa gaa 1337
Pro Thr Lys Leu Lys Glu Ala Leu Arg Ile Ala Lys Glu
            415                 420

tgt ata gag aag aga cta att gag gaa cag aaa cag att 1376
Cys Ile Glu Lys Arg Leu Ile Glu Glu Gln Lys Gln Ile
425                 430                 435

cac cag cat cga aga ctg aca aga gct cag tcc cac cat 1415
His Gln His Arg Arg Leu Thr Arg Ala Gln Ser His His
        440                 445                 450

gga tct gag gag gaa aga aaa aaa aga aag att tta gct 1454
Gly Ser Glu Glu Glu Arg Lys Lys Arg Lys Ile Leu Ala
                455                 460

cga aag aag tca aaa cga tct gct ctt gaa aat agt gaa 1493
Arg Lys Lys Ser Lys Arg Ser Ala Leu Glu Asn Ser Glu
    465                 470                 475

gag cat tca gcg agg tac agc aac tcc aat aat tca gga 1532
Glu His Ser Ala Arg Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Ser Gly
            480                 485

tct ggg gcc agc tca cct ctc acg tcc ccg tca tcg cca 1571
Ser Gly Ala Ser Ser Pro Leu Thr Ser Pro Ser Ser Pro
490                 495                 500

act cca ccc tct aca tca ggg ata tct gca tta cct cca 1610
Thr Pro Pro Ser Thr Ser Gly Ile Ser Ala Leu Pro Pro
        505                 510                 515

cct cct cca cct cca cca cca cca gca gct ccc ttg cct 1649
Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Leu Pro
                520                 525
```

cct gcg agc acc gag gta cct gcc cag ctc tcg tct cag 1688
Pro Ala Ser Thr Glu Val Pro Ala Gln Leu Ser Ser Gln
530 535 540

gct gtg aat ggc atg agc cga ggg gcc ttg ctc agc tcc 1727
Ala Val Asn Gly Met Ser Arg Gly Ala Leu Leu Ser Ser
545 550

atc cag aat ttc caa aaa gga act ttg agg aaa gcc aaa 1766
Ile Gln Asn Phe Gln Lys Gly Thr Leu Arg Lys Ala Lys
555 560 565

acc tgt gat cac agt gct ccg aag atc ggc tg aa 1800
Thr Cys Asp His Ser Ala Pro Lys Ile Gly
570 575 577

gcttcctgtt tacacttgga gggaaaagtt ctttttatt cctactcacc 1850

cctacccccc aaactaccct cttcctggga aagtaattgc tgagccagta 1900

cagccacaaa cagtactatt ttgcagatgc tcatgtaagc agcttttcga 1950

gagaaataat tctttaagca gaataaagtt aggctggcat tgctccctta 2000

agatcttgct cctttattaa ccctgtaaag gagtcttgtt tatcctctaa 2050

tggccaggct tttgggacag cagcatattg aaatattttc accaactaaa 2100

ggaaatagac agaaaaacaa tgacaatatt caatcacagc agtaaatggc 2150

ctttgtgttg caatcccttc taccccatca gacagctcct agaaacattc 2200

cttacagttc atttctctaa agcattttct gattcttaga taactccaat 2250

ttttgctacc tttatcttag acattaacac tatagcccaa agcatagtta 2300

ctttgctaaa tcagaaagca actgagttct ttgttttctc ctcaaataga 2350

atggggaacg ttcacaacat tctcttaagt tctaacagga ataccattgt 2400

ggttatagaa ctcagggctg ctaaagcaac tactctagac ccatagttct 2450

ttttagttag atgtattgaa acagacaaaa atattaacat cagaaaaagc 2500

tcttgccaat tagaggatct tcttaatcct cagcaattaa gtttggggtt 2550

tgaggggggc aggtcattgt tacaacagaa gtaaatttgg catctataga 2600

aatcaattat gatttttgaa agatttatct aaatatatca atatagcatc 2650

tctttaatgt tagtcattta ttagaaagat cctttatcct gatttgctta 2700

aacctttcaa taaattgcac tttaaaggat tataaataat ccatttaaaa 2750

attcaagtac acacatcagt gttggttact atgcagagaa tgtcattgtg 2800

tatagtttca tgtaatctgt tatgtcagct gtatttttta ttaaaatcat 2850

gtcaagaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2891

<210> 2
<211> 577
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Ala Phe Met Glu Lys Pro Pro Ala Gly Lys Val Leu Leu Asp
  1               5                  10                  15

Asp Thr Val Pro Leu Thr Ala Ala Ile Glu Ala Ser Gln Ser Leu
             20                  25                  30

Gln Ser His Thr Glu Tyr Ile Ile Arg Val Gln Arg Gly Ile Ser
         35                  40                  45

Val Glu Asn Ser Trp Gln Ile Val Arg Arg Tyr Ser Asp Phe Asp
     50                  55                  60

Leu Leu Asn Asn Ser Leu Gln Ile Ala Gly Leu Ser Leu Pro Leu
 65                  70                  75

Pro Pro Lys Lys Leu Ile Gly Asn Met Asp Arg Glu Phe Ile Ala
             80                  85                  90

Glu Arg Gln Lys Gly Leu Gln Asn Tyr Leu Asn Val Ile Thr Thr
         95                 100                 105

Asn His Ile Leu Ser Asn Cys Glu Leu Val Lys Lys Phe Leu Asp
    110                 115                 120

Pro Asn Asn Tyr Ser Ala Asn Tyr Thr Glu Ile Ala Leu Gln Gln
    125                 130                 135

Val Ser Met Phe Phe Arg Ser Glu Pro Lys Trp Glu Val Val Glu
    140                 145                 150

Pro Leu Lys Asp Ile Gly Trp Arg Ile Arg Lys Lys Tyr Phe Leu
    155                 160                 165

Met Lys Ile Lys Asn Gln Pro Lys Glu Arg Leu Val Leu Ser Trp
    170                 175                 180

Ala Asp Leu Gly Pro Asp Lys Tyr Leu Ser Asp Lys Asp Phe Gln
    185                 190                 195

Cys Leu Ile Lys Leu Leu Pro Ser Cys Leu His Pro Tyr Ile Tyr
    200                 205                 210

Arg Val Thr Phe Ala Thr Ala Asn Glu Ser Ser Ala Leu Leu Ile
    215                 220                 225

Arg Met Phe Asn Glu Lys Gly Thr Leu Lys Asp Leu Ile Tyr Lys
    230                 235                 240

Ala Lys Pro Lys Asp Pro Phe Leu Lys Lys Tyr Cys Asn Pro Lys
    245                 250                 255

Lys Ile Gln Gly Leu Glu Leu Gln Gln Ile Lys Thr Tyr Gly Arg
    260                 265                 270

Gln Ile Leu Glu Val Leu Lys Phe Leu His Asp Lys Gly Phe Pro
    275                 280                 285

Tyr Gly His Leu His Ala Ser Asn Val Met Leu Asp Gly Asp Thr
    290                 295                 300
```

Cys Arg Leu Leu Asp Leu Glu Asn Ser Leu Leu Gly Leu Pro Ser
305 310 315

Phe Tyr Arg Ser Tyr Phe Ser Gln Phe Arg Lys Ile Asn Thr Leu
320 325 330

Glu Ser Val Asp Val His Cys Phe Gly His Leu Leu Tyr Glu Met
335 340 345

Thr Tyr Gly Arg Pro Pro Asp Ser Val Pro Val Asp Ser Phe Pro
350 355 360

Pro Ala Pro Ser Met Ala Val Val Ala Val Leu Glu Ser Thr Leu
365 370 375

Ser Cys Glu Ala Cys Lys Asn Gly Met Pro Thr Ile Ser Arg Leu
380 385 390

Leu Gln Met Pro Leu Phe Ser Asp Val Leu Leu Thr Thr Ser Glu
395 400 405

Lys Pro Gln Phe Lys Ile Pro Thr Lys Leu Lys Glu Ala Leu Arg
410 415 420

Ile Ala Lys Glu Cys Ile Glu Lys Arg Leu Ile Glu Glu Gln Lys
425 430 435

Gln Ile His Gln His Arg Arg Leu Thr Arg Ala Gln Ser His His
440 445 450

Gly Ser Glu Glu Glu Arg Lys Lys Arg Lys Ile Leu Ala Arg Lys
455 460 465

Lys Ser Lys Arg Ser Ala Leu Glu Asn Ser Glu Glu His Ser Ala
470 475 480

Arg Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Ser Gly Ser Gly Ala Ser Ser Pro
485 490 495

Leu Thr Ser Pro Ser Ser Pro Thr Pro Pro Ser Thr Ser Gly Ile
500 505 510

Ser Ala Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala Ala
515 520 525

Pro Leu Pro Pro Ala Ser Thr Glu Val Pro Ala Gln Leu Ser Ser
530 535 540

Gln Ala Val Asn Gly Met Ser Arg Gly Ala Leu Leu Ser Ser Ile
545 550 555

Gln Asn Phe Gln Lys Gly Thr Leu Arg Lys Ala Lys Thr Cys Asp
560 565 570

His Ser Ala Pro Lys Ile Gly
575

<210> 3
<211> 2119
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
tgcacctcgg ttctatcgat tcgaattcgg ccacactggc cggatcctct 50

agagatccct cgacctcgac ccacgcgtcc gctcaaggaa gttgaatgag 100

gtgaacatag atacagctct ttcccccttcc ccccctttttt aaatgtaaca 150

aatacttttt atgttccccc tccccccttc ccctttttccc ctttcccctt 200

ttggaaacgt gtcaggaacc aaatagttta agatgagcag ttgaggggac 250

tgagagagtg atcgacacag aacctggctt cttcgtgctt catcataagt 300

cgtgctgccg gccaggttac ttaagcaccc ttttaacaag gaaaccttgt 350

gggagatcca gctggccgac tcgagttcag aaacaggacc acagaggtta 400

cactctggga tcctggccat gaggttggat gcctcacctt actgaaagga 450

gacactggac ctaa atg gcg cag cat gat ttt gtt cct gct 491
                Met Ala Gln His Asp Phe Val Pro Ala
                  1               5

tgg cta aat ttc tca aca cca cag tca gct aag tca cct 530
Trp Leu Asn Phe Ser Thr Pro Gln Ser Ala Lys Ser Pro
 10                  15                  20

act gcc acc ttc gaa aaa cac gga gag cac cta ccc aga 569
Thr Ala Thr Phe Glu Lys His Gly Glu His Leu Pro Arg
         25                  30                  35

gga gaa ggt aga ttt gga gta agc cgc cgt cga cat aat 608
Gly Glu Gly Arg Phe Gly Val Ser Arg Arg Arg His Asn
                 40                  45

tcc tct gat ggt ttt ttt aac aat ggt ccc cta cga act 647
Ser Ser Asp Gly Phe Phe Asn Asn Gly Pro Leu Arg Thr
     50                  55                  60

gca gga gat tct tgg cac cag ccc tcc tgt tcc gcc atg 686
Ala Gly Asp Ser Trp His Gln Pro Ser Cys Ser Ala Met
             65                  70

att ctg tgg act ctg gtg tct cta agg gag cat atg ctg 725
Ile Leu Trp Thr Leu Val Ser Leu Arg Glu His Met Leu
 75                  80                  85

gaa tca cag gga acc cat ctg gtt ggc ata gct ctt ccc 764
Glu Ser Gln Gly Thr His Leu Val Gly Ile Ala Leu Pro
         90                  95                 100

cga ggt cat gat ggc atg agc caa cgt agt gta ggt ggc 803
Arg Gly His Asp Gly Met Ser Gln Arg Ser Val Gly Gly
                105                 110

aca ggg aac cat cgc cat tgg aat ggc agc ttc cac tcc 842
Thr Gly Asn His Arg His Trp Asn Gly Ser Phe His Ser
    115                 120                 125

cgg aaa ggg tgt gct ttt cag gaa aag cca cct atg gag 881
Arg Lys Gly Cys Ala Phe Gln Glu Lys Pro Pro Met Glu
            130                 135

att agg gaa gaa aag aaa gaa gac aag gtg gaa aag ttg 920
```

```
Ile Arg Glu Glu Lys Lys Glu Asp Lys Val Glu Lys Leu
140                 145                 150

cag ttt gaa gag gag gac ttt cct tcc ttg aat cca gaa 959
Gln Phe Glu Glu Glu Asp Phe Pro Ser Leu Asn Pro Glu
        155                 160                 165

gct ggc aaa cag cat cag cca tgc aga cct att ggg aca 998
Ala Gly Lys Gln His Gln Pro Cys Arg Pro Ile Gly Thr
                170                 175

cct tct gga gta tgg gaa aac ccg cct agt gcc aag caa 1037
Pro Ser Gly Val Trp Glu Asn Pro Pro Ser Ala Lys Gln
    180                 185                 190

ccc tcc aag atg cta gtt atc aaa aaa gtt tcc aaa gag 1076
Pro Ser Lys Met Leu Val Ile Lys Lys Val Ser Lys Glu
            195                 200

gat cct gct gct gcc ttc tct gct gca ttc acc tca cca 1115
Asp Pro Ala Ala Ala Phe Ser Ala Ala Phe Thr Ser Pro
205                 210                 215

gga tct cac cat gca aat ggg aac aaa ttg tca tcc gtg 1154
Gly Ser His His Ala Asn Gly Asn Lys Leu Ser Ser Val
        220                 225                 230

gtt cca agt gtc tat aag aac ctg gtt cct aag cct gta 1193
Val Pro Ser Val Tyr Lys Asn Leu Val Pro Lys Pro Val
                235                 240

cca cct cct tcc aag cct aat gca tgg aaa gct aac agg 1232
Pro Pro Pro Ser Lys Pro Asn Ala Trp Lys Ala Asn Arg
    245                 250                 255

atg gag cac aag tca gga tcc ctt tcc tct agc cgg gag 1271
Met Glu His Lys Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Arg Glu
            260                 265

tct gct ttt acc agt cca atc tcc gtt acc aaa cca gtg 1310
Ser Ala Phe Thr Ser Pro Ile Ser Val Thr Lys Pro Val
270                 275                 280

gta ctg gct agt ggt gca gct ctg agt tct ccc aaa gag 1349
Val Leu Ala Ser Gly Ala Ala Leu Ser Ser Pro Lys Glu
        285                 290                 295

agt ccc tcc agc acc acc cct cca att gag atc agc tcc 1388
Ser Pro Ser Ser Thr Thr Pro Pro Ile Glu Ile Ser Ser
                300                 305

tct cgt ctg acc aag ttg acc cgc cga acc acc gac agg 1427
Ser Arg Leu Thr Lys Leu Thr Arg Arg Thr Thr Asp Arg
    310                 315                 320

aag agt gag ttc ctg aaa act ctg aag gat gac cgg aat 1466
Lys Ser Glu Phe Leu Lys Thr Leu Lys Asp Asp Arg Asn
            325                 330

gga gac ttc tca gag aat aga gac tgt gac aag ctg gaa 1505
Gly Asp Phe Ser Glu Asn Arg Asp Cys Asp Lys Leu Glu
335                 340                 345
```

```
gat ttg gag gac aac agc aca cct gaa cca aag gaa aat 1544
Asp Leu Glu Asp Asn Ser Thr Pro Glu Pro Lys Glu Asn
        350                 355                 360

ggg gag gaa ggc tgt cat caa aat ggt ctt gcc ctc cct 1583
Gly Glu Glu Gly Cys His Gln Asn Gly Leu Ala Leu Pro
                365                 370

gta gtg gaa gaa ggg gag gtt ctc tca cac tct cta gaa 1622
Val Val Glu Glu Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Glu
    375                 380                 385

gca gag cac agg tta ttg aaa gct atg ggt tgg cag gaa 1661
Ala Glu His Arg Leu Leu Lys Ala Met Gly Trp Gln Glu
            390                 395

tat cct gaa aat gat gag aat tgc ctt ccc ctc aca gag 1700
Tyr Pro Glu Asn Asp Glu Asn Cys Leu Pro Leu Thr Glu
400                 405                 410

gat gag ctc aaa gag ttc cac atg aag aca gag cag ctg 1739
Asp Glu Leu Lys Glu Phe His Met Lys Thr Glu Gln Leu
        415                 420                 425

aga aga aat ggc ttt gga aag aat ggc ttc ttg cag agc 1778
Arg Arg Asn Gly Phe Gly Lys Asn Gly Phe Leu Gln Ser
                430                 435

cgc agt tcc agt ctg ttc tcc cct tgg aga agc act tgc 1817
Arg Ser Ser Ser Leu Phe Ser Pro Trp Arg Ser Thr Cys
    440                 445                 450

aaa gca gag ttt gag gac tca gac acc gaa acc agt agc 1856
Lys Ala Glu Phe Glu Asp Ser Asp Thr Glu Thr Ser Ser
            455                 460

agt gaa aca tca gat gac gat gcc tgg aag t agg 1890
Ser Glu Thr Ser Asp Asp Asp Ala Trp Lys
465                 470             474

catataaatg ctcacagtta aatctgaccc agtaaactct gtgtgtttag 1940

ggagtataca aaagaaatcg ttcttttcct tttcttatgt tgttgaatac 1990

ttcattcaca agggaaataa tcatatccca aagagagaaa aaaaaaaaaa 2040

aaagggcggc cgcgactcta gagtcgacct gcagtaggga taacagggta 2090

ataagcttgg ccgccatggc ccaacttgt 2119
```

<210> 4
<211> 474
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
Met Ala Gln His Asp Phe Val Pro Ala Trp Leu Asn Phe Ser Thr
  1               5                  10                  15

Pro Gln Ser Ala Lys Ser Pro Thr Ala Thr Phe Glu Lys His Gly
             20                  25                  30

Glu His Leu Pro Arg Gly Glu Gly Arg Phe Gly Val Ser Arg Arg
```

```
                    35                  40                  45

Arg His Asn Ser Ser Asp Gly Phe Phe Asn Asn Gly Pro Leu Arg
                    50                  55                  60

Thr Ala Gly Asp Ser Trp His Gln Pro Ser Cys Ser Ala Met Ile
                    65                  70                  75

Leu Trp Thr Leu Val Ser Leu Arg Glu His Met Leu Glu Ser Gln
                    80                  85                  90

Gly Thr His Leu Val Gly Ile Ala Leu Pro Arg Gly His Asp Gly
                    95                  100                 105

Met Ser Gln Arg Ser Val Gly Gly Thr Gly Asn His Arg His Trp
                    110                 115                 120

Asn Gly Ser Phe His Ser Arg Lys Gly Cys Ala Phe Gln Glu Lys
                    125                 130                 135

Pro Pro Met Glu Ile Arg Glu Glu Lys Lys Glu Asp Lys Val Glu
                    140                 145                 150

Lys Leu Gln Phe Glu Glu Glu Asp Phe Pro Ser Leu Asn Pro Glu
                    155                 160                 165

Ala Gly Lys Gln His Gln Pro Cys Arg Pro Ile Gly Thr Pro Ser
                    170                 175                 180

Gly Val Trp Glu Asn Pro Pro Ser Ala Lys Gln Pro Ser Lys Met
                    185                 190                 195

Leu Val Ile Lys Lys Val Ser Lys Glu Asp Pro Ala Ala Ala Phe
                    200                 205                 210

Ser Ala Ala Phe Thr Ser Pro Gly Ser His His Ala Asn Gly Asn
                    215                 220                 225

Lys Leu Ser Ser Val Val Pro Ser Val Tyr Lys Asn Leu Val Pro
                    230                 235                 240

Lys Pro Val Pro Pro Pro Ser Lys Pro Asn Ala Trp Lys Ala Asn
                    245                 250                 255

Arg Met Glu His Lys Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Arg Glu Ser
                    260                 265                 270

Ala Phe Thr Ser Pro Ile Ser Val Thr Lys Pro Val Val Leu Ala
                    275                 280                 285

Ser Gly Ala Ala Leu Ser Ser Pro Lys Glu Ser Pro Ser Ser Thr
                    290                 295                 300

Thr Pro Pro Ile Glu Ile Ser Ser Ser Arg Leu Thr Lys Leu Thr
                    305                 310                 315

Arg Arg Thr Thr Asp Arg Lys Ser Glu Phe Leu Lys Thr Leu Lys
                    320                 325                 330

Asp Asp Arg Asn Gly Asp Phe Ser Glu Asn Arg Asp Cys Asp Lys
                    335                 340                 345

Leu Glu Asp Leu Glu Asp Asn Ser Thr Pro Glu Pro Lys Glu Asn
```

350 355 360

Gly Glu Glu Gly Cys His Gln Asn Gly Leu Ala Leu Pro Val Val
365 370 375

Glu Glu Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Glu Ala Glu His Arg
380 385 390

Leu Leu Lys Ala Met Gly Trp Gln Glu Tyr Pro Glu Asn Asp Glu
395 400 405

Asn Cys Leu Pro Leu Thr Glu Asp Glu Leu Lys Glu Phe His Met
410 415 420

Lys Thr Glu Gln Leu Arg Arg Asn Gly Phe Gly Lys Asn Gly Phe
425 430 435

Leu Gln Ser Arg Ser Ser Ser Leu Phe Ser Pro Trp Arg Ser Thr
440 445 450

Cys Lys Ala Glu Phe Glu Asp Ser Asp Thr Glu Thr Ser Ser Ser
455 460 465

Glu Thr Ser Asp Asp Asp Ala Trp Lys
470

<210> 5
<211> 294
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> unsure
<222> 162, 165, 183-184, 187, 204, 207, 211, 216, 219, 222-223, 225, 237, 240, 244, 250, 253, 262, 267, 269, 275, 279, 282, 289-290
<223> unknown base

<400> 5
cccgggatgg ccttcatgga gaagccgcca gctggcaagg tgctgctgga 50

cgacacggtg ccgctgacag cagccatcga ggcgagccag agcctgcagt 100

cccacacgga atatattatt cgagtgcaaa gaggaatttc tctggaaaac 150

agctggcaga tngtnagaag atacagtgac ttnnatntgc ttaacaacag 200

cttncanatt ncaggnctna gnntncctct tcctccnaan aaantgattn 250

ggnaacatgg ancgtgnant tcatngctng anaggcagnn aggt 294

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
ggacgacacg gtgccgctga cagc 24

<210> 7
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
gccatcgagg cgagccagag cctgcagtcc cacacggaat atattattcg 50

a 51

<210> 8
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
gttttccaga gaaattcctc tttgcactcg a 31

<210> 9
<211> 793
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> unsure
<222> 379, 433, 459, 492, 517, 541, 549, 561, 575, 579, 582, 710, 742,
774, 784
<223> unknown base

<400> 9
gggaagaaaa gaaagaagac aaggtggaaa agttgcagat ttgaagagga 50

ggactttcct tccttgaatc cagaagctgg caaacagcat cagccatgca 100

gacctattgg gacaccttct ggagtatggg aaaacccgcc tagtgccaag 150

caaccctcca agatgctagt tatcaaaaaa gtttccaaag aggatcctgc 200

tgctgcyttc tctgctgcat tcacctcacc aggatctcac catgcaaatg 250

ggaacaaatt gtcatccgtg gttccaagtg tctataagaa cctggttcct 300

aagcctgtac cacctccttc caagcctaat gcatggaaag ctaacaggat 350

ggagcacaag tcaggatccc tttcctctna gccgggagtc tgcttttacc 400

agtccaatct ctgttaccaa accagtggta ctnggctagt ggtgcagctc 450

tgagttctnc ccaaagagag tccctccagc accacccctc cnaattgaga 500

tcagctcctc tcgtctngac caagtttgac ccgccgaacc naccgacang 550

gaagragtga ngttcctgaa aactnctgna anggatgacc gggaatggga 600

agactttytc agaagaatag agactgtgac aagctggaag atttggagga 650

caacagcaca ctgaaccaaa ggaaaatggg ggaggaaggc tgttcatcaa 700

atggtctttn ccttcctgta gttggaagga ggggaggttt tntcacattt 750

ttaggagcag agcacaggtt tttnaagttt tggntggcgg att 793

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
gacctattgg gacaccttct ggag 24

<210> 11
<211> 43
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
cccgcctagt gccaagcaac cctccaagat gctagttatc aaa 43

<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
cttggtcaga cgagaggagc tgatc 25

<210> 13
<211> 2366
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> unsure
<222> 103
<223> unknown base

<400> 13
tggccggatc ctctagagat ccctcgacct cgacccacgc gtccgcagaa 50

agtatgtccc ttctctcacc atg agc tgg ctc tcc agt tcc 91
Met Ser Trp Leu Ser Ser Ser
1 5

cag gga gtg gtn cta aca gcc tac cac ccc agc ggc aag 130
Gln Gly Val Xaa Leu Thr Ala Tyr His Pro Ser Gly Lys
10 15 20

gac cag acc gtc ggg aac agc cat gca aag gca ggg gag 169
Asp Gln Thr Val Gly Asn Ser His Ala Lys Ala Gly Glu
25 30

gaa gcc acc tcg agt cgc aga tat ggc cag tac act atg 208
Glu Ala Thr Ser Ser Arg Arg Tyr Gly Gln Tyr Thr Met
35 40 45

aac cag gaa agc acc acc atc aaa gtt atg gag aag cct 247
Asn Gln Glu Ser Thr Thr Ile Lys Val Met Glu Lys Pro
50 55

cca ttt gat cga tca att tcc cag gat tct ttg gat gaa 286
Pro Phe Asp Arg Ser Ile Ser Gln Asp Ser Leu Asp Glu
60 65 70

cta tct atg gaa gac tat tgg ata gaa cta gaa aac atc 325
Leu Ser Met Glu Asp Tyr Trp Ile Glu Leu Glu Asn Ile
75 80 85

aag aaa tct agt gaa aac agc caa gaa gat caa gag gtg 364
Lys Lys Ser Ser Glu Asn Ser Gln Glu Asp Gln Glu Val
90 95

```
gtt gtt gtc aaa gag cct gat gag gga gaa ttg gaa gaa 403
Val Val Val Lys Glu Pro Asp Glu Gly Glu Leu Glu Glu
    100                 105                 110

gag tgg ctt aaa gag gcc ggt tta tcc aat ctc ttc gga 442
Glu Trp Leu Lys Glu Ala Gly Leu Ser Asn Leu Phe Gly
            115                 120

gag tct gct gga gat cca cag gaa agc att gtg ttt tta 481
Glu Ser Ala Gly Asp Pro Gln Glu Ser Ile Val Phe Leu
125                 130                 135

tca aca ttg acg cgg acc cag gca gca gca gtt cag aag 520
Ser Thr Leu Thr Arg Thr Gln Ala Ala Ala Val Gln Lys
        140                 145                 150

cga gta gag acg gtc tcc cag acc ttg agg aaa aaa aac 559
Arg Val Glu Thr Val Ser Gln Thr Leu Arg Lys Lys Asn
                155                 160

aaa cag tac cag att cct gac gtc aga gac ata ttt gct 598
Lys Gln Tyr Gln Ile Pro Asp Val Arg Asp Ile Phe Ala
    165                 170                 175

caa cag aga gaa tca aaa gaa aca gct cca ggt ggc act 637
Gln Gln Arg Glu Ser Lys Glu Thr Ala Pro Gly Gly Thr
            180                 185

gaa tcg cag tca ctt aga aca aat gaa aac aaa tac caa 676
Glu Ser Gln Ser Leu Arg Thr Asn Glu Asn Lys Tyr Gln
190                 195                 200

gga aga gat gac gag gca tct aac ctt gtt ggt gaa gag 715
Gly Arg Asp Asp Glu Ala Ser Asn Leu Val Gly Glu Glu
        205                 210                 215

aag ctg atc cca cct gag gag acg cct gcc cct gaa aca 754
Lys Leu Ile Pro Pro Glu Glu Thr Pro Ala Pro Glu Thr
                220                 225

gac atc aac ctg gag gta tca ttt gcc gag caa gca ctc 793
Asp Ile Asn Leu Glu Val Ser Phe Ala Glu Gln Ala Leu
    230                 235                 240

aat cag aaa gag aga tcc aag gag aaa atc cag aag agc 832
Asn Gln Lys Glu Arg Ser Lys Glu Lys Ile Gln Lys Ser
            245                 250

aaa ggc gat gat gcc aca tta cct agt ttc aga ttg cca 871
Lys Gly Asp Asp Ala Thr Leu Pro Ser Phe Arg Leu Pro
255                 260                 265

aaa gac aaa acg ggt acc aca agg att ggt gac ctc gca 910
Lys Asp Lys Thr Gly Thr Thr Arg Ile Gly Asp Leu Ala
        270                 275                 280

ccc cag gac atg aag aaa gtt tgc cat tta gcc cta att 949
Pro Gln Asp Met Lys Lys Val Cys His Leu Ala Leu Ile
                285                 290

gag ctg act gcc ctc tat gat gta ttg ggt att gag ctg 988
Glu Leu Thr Ala Leu Tyr Asp Val Leu Gly Ile Glu Leu
    295                 300                 305
```

```
aaa caa caa aaa gct gtg aaa atc aaa aca aaa gat tct 1027
Lys Gln Gln Lys Ala Val Lys Ile Lys Thr Lys Asp Ser
                310                 315

ggt ctt ttt tgc gtt cca ttg aca gcg cta tta gaa caa 1066
Gly Leu Phe Cys Val Pro Leu Thr Ala Leu Leu Glu Gln
320                 325                 330

gat cag agg aaa gta cca gga atg cga ata ccc ttg atc 1105
Asp Gln Arg Lys Val Pro Gly Met Arg Ile Pro Leu Ile
        335                 340                 345

ttt caa aaa ctg att tct cga att gaa gag aga ggt ttg 1144
Phe Gln Lys Leu Ile Ser Arg Ile Glu Glu Arg Gly Leu
                350                 355

gaa aca gaa ggc ctc tta cgg atc cct gga gct gcc att 1183
Glu Thr Glu Gly Leu Leu Arg Ile Pro Gly Ala Ala Ile
    360                 365                 370

aga atc aag aat ctt tgc caa gaa cta gaa gca aag ttt 1222
Arg Ile Lys Asn Leu Cys Gln Glu Leu Glu Ala Lys Phe
                375                 380

tat gaa ggg act ttt aat tgg gaa agt gtc aaa cag cat 1261
Tyr Glu Gly Thr Phe Asn Trp Glu Ser Val Lys Gln His
385                 390                 395

gat gcc gcc agc ctg ctg aag ctc ttc att cgg gag ttg 1300
Asp Ala Ala Ser Leu Leu Lys Leu Phe Ile Arg Glu Leu
        400                 405                 410

ccc cag cca ctg ctc agt gtg gag tat ctc aaa gcc ttt 1339
Pro Gln Pro Leu Leu Ser Val Glu Tyr Leu Lys Ala Phe
                415                 420

cag gct gtc cag aat ctt cca acc aag aag cag caa cta 1378
Gln Ala Val Gln Asn Leu Pro Thr Lys Lys Gln Gln Leu
    425                 430                 435

cag gct ttg aac ctt ctt gtc atc ctc cta cct gat gca 1417
Gln Ala Leu Asn Leu Leu Val Ile Leu Leu Pro Asp Ala
                440                 445

aac agg gac aca ctg aag gcc ctt ctt gaa ttt ctc caa 1456
Asn Arg Asp Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu Phe Leu Gln
450                 455                 460

aga gta ata gat aat aaa gaa aaa aat aaa atg aca gtc 1495
Arg Val Ile Asp Asn Lys Glu Lys Asn Lys Met Thr Val
        465                 470                 475

atg aat gta gca atg gtc atg gcc ccg aat ctc ttt atg 1534
Met Asn Val Ala Met Val Met Ala Pro Asn Leu Phe Met
                480                 485

tgt cat gca ttg gga ttg aag tcc agt gaa cag cga gaa 1573
Cys His Ala Leu Gly Leu Lys Ser Ser Glu Gln Arg Glu
    490                 495                 500

ttt gta atg gca gct ggg aca gca aat acc atg cac tta 1612
Phe Val Met Ala Ala Gly Thr Ala Asn Thr Met His Leu
                505                 510
```

```
ttg att aag tac caa aaa ctt ctg tgg aca att ccc aag 1651
Leu Ile Lys Tyr Gln Lys Leu Leu Trp Thr Ile Pro Lys
515                 520                 525

ttt att gta aac caa gtg agg aag caa aac acg gaa aat 1690
Phe Ile Val Asn Gln Val Arg Lys Gln Asn Thr Glu Asn
        530                 535                 540

cat aaa aag gat aaa aga gcc atg aag aaa ttg ctg aag 1729
His Lys Lys Asp Lys Arg Ala Met Lys Lys Leu Leu Lys
                545                 550

aaa atg gct tat gac cga gaa aaa tat gaa aag caa gat 1768
Lys Met Ala Tyr Asp Arg Glu Lys Tyr Glu Lys Gln Asp
    555                 560                 565

aag agt aca aat gat gct gac gtt cct cag gga gtg att 1807
Lys Ser Thr Asn Asp Ala Asp Val Pro Gln Gly Val Ile
            570                 575

cga gtg caa gct ccc cat ctt tcg aaa gtt tcc atg gca 1846
Arg Val Gln Ala Pro His Leu Ser Lys Val Ser Met Ala
580                 585                 590

ata cag cta act gaa gaa cta aaa gcc agt gat gta ctt 1885
Ile Gln Leu Thr Glu Glu Leu Lys Ala Ser Asp Val Leu
        595                 600                 605

gcc agg ttt ctc agc caa gaa agt ggg gtt gcc cag act 1924
Ala Arg Phe Leu Ser Gln Glu Ser Gly Val Ala Gln Thr
                610                 615

ctc aag aaa gga gaa gtt ttt ttg tat gaa att gga gga 1963
Leu Lys Lys Gly Glu Val Phe Leu Tyr Glu Ile Gly Gly
    620                 625                 630

aat att ggg gaa cgc tgc ctt gat gat gac act tac atg 2002
Asn Ile Gly Glu Arg Cys Leu Asp Asp Asp Thr Tyr Met
            635                 640

aag gat tta tat cag ctt aac cca aat gct gag tgg gtt 2041
Lys Asp Leu Tyr Gln Leu Asn Pro Asn Ala Glu Trp Val
645                 650                 655

ata aag tca aag cca ttg t  agaagactta acaagctgca 2080
Ile Lys Ser Lys Pro Leu
        660         663

gataaccatg tggacttctg tcataattct tgctgagtca agagtgtaaa 2130

taaaagaaat ggcaggactc atattattca gttgtaccca agtattttaa 2180

aaatgactct cttaagcctt aaaaagtcat agatttgtgc tgctgccaga 2230

attatattaa attattatta atggtattat tagaaaaaaa aatttctgga 2280

gtgagagtaa agaggcttaa ttagtttgtg ggcagttttc ttatgctctg 2330

tgaaatgtgt ccagatgtga catagttttt tttttt 2366
```

<210> 14
<211> 663
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

```
Met Ser Trp Leu Ser Ser Ser Gln Gly Val Val Leu Thr Ala Tyr
  1               5                  10                  15

His Pro Ser Gly Lys Asp Gln Thr Val Gly Asn Ser His Ala Lys
             20                  25                  30

Ala Gly Glu Glu Ala Thr Ser Ser Arg Arg Tyr Gly Gln Tyr Thr
             35                  40                  45

Met Asn Gln Glu Ser Thr Thr Ile Lys Val Met Glu Lys Pro Pro
             50                  55                  60

Phe Asp Arg Ser Ile Ser Gln Asp Ser Leu Asp Glu Leu Ser Met
             65                  70                  75

Glu Asp Tyr Trp Ile Glu Leu Glu Asn Ile Lys Lys Ser Ser Glu
             80                  85                  90

Asn Ser Gln Glu Asp Gln Glu Val Val Val Val Lys Glu Pro Asp
             95                 100                 105

Glu Gly Glu Leu Glu Glu Glu Trp Leu Lys Glu Ala Gly Leu Ser
            110                 115                 120

Asn Leu Phe Gly Glu Ser Ala Gly Asp Pro Gln Glu Ser Ile Val
            125                 130                 135

Phe Leu Ser Thr Leu Thr Arg Thr Gln Ala Ala Ala Val Gln Lys
            140                 145                 150

Arg Val Glu Thr Val Ser Gln Thr Leu Arg Lys Lys Asn Lys Gln
            155                 160                 165

Tyr Gln Ile Pro Asp Val Arg Asp Ile Phe Ala Gln Gln Arg Glu
            170                 175                 180

Ser Lys Glu Thr Ala Pro Gly Gly Thr Glu Ser Gln Ser Leu Arg
            185                 190                 195

Thr Asn Glu Asn Lys Tyr Gln Gly Arg Asp Asp Glu Ala Ser Asn
            200                 205                 210

Leu Val Gly Glu Glu Lys Leu Ile Pro Pro Glu Glu Thr Pro Ala
            215                 220                 225

Pro Glu Thr Asp Ile Asn Leu Glu Val Ser Phe Ala Glu Gln Ala
            230                 235                 240

Leu Asn Gln Lys Glu Arg Ser Lys Glu Lys Ile Gln Lys Ser Lys
            245                 250                 255

Gly Asp Asp Ala Thr Leu Pro Ser Phe Arg Leu Pro Lys Asp Lys
            260                 265                 270

Thr Gly Thr Thr Arg Ile Gly Asp Leu Ala Pro Gln Asp Met Lys
            275                 280                 285

Lys Val Cys His Leu Ala Leu Ile Glu Leu Thr Ala Leu Tyr Asp
            290                 295                 300
```

```
Val Leu Gly Ile Glu Leu Lys Gln Gln Lys Ala Val Lys Ile Lys
                305                 310                 315

Thr Lys Asp Ser Gly Leu Phe Cys Val Pro Leu Thr Ala Leu Leu
            320                 325                 330

Glu Gln Asp Gln Arg Lys Val Pro Gly Met Arg Ile Pro Leu Ile
                335                 340                 345

Phe Gln Lys Leu Ile Ser Arg Ile Glu Glu Arg Gly Leu Glu Thr
            350                 355                 360

Glu Gly Leu Leu Arg Ile Pro Gly Ala Ala Ile Arg Ile Lys Asn
                365                 370                 375

Leu Cys Gln Glu Leu Glu Ala Lys Phe Tyr Glu Gly Thr Phe Asn
            380                 385                 390

Trp Glu Ser Val Lys Gln His Asp Ala Ala Ser Leu Leu Lys Leu
            395                 400                 405

Phe Ile Arg Glu Leu Pro Gln Pro Leu Leu Ser Val Glu Tyr Leu
                410                 415                 420

Lys Ala Phe Gln Ala Val Gln Asn Leu Pro Thr Lys Lys Gln Gln
            425                 430                 435

Leu Gln Ala Leu Asn Leu Leu Val Ile Leu Leu Pro Asp Ala Asn
                440                 445                 450

Arg Asp Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu Phe Leu Gln Arg Val Ile
            455                 460                 465

Asp Asn Lys Glu Lys Asn Lys Met Thr Val Met Asn Val Ala Met
            470                 475                 480

Val Met Ala Pro Asn Leu Phe Met Cys His Ala Leu Gly Leu Lys
                485                 490                 495

Ser Ser Glu Gln Arg Glu Phe Val Met Ala Ala Gly Thr Ala Asn
            500                 505                 510

Thr Met His Leu Leu Ile Lys Tyr Gln Lys Leu Leu Trp Thr Ile
            515                 520                 525

Pro Lys Phe Ile Val Asn Gln Val Arg Lys Gln Asn Thr Glu Asn
                530                 535                 540

His Lys Lys Asp Lys Arg Ala Met Lys Lys Leu Leu Lys Lys Met
            545                 550                 555

Ala Tyr Asp Arg Glu Lys Tyr Glu Lys Gln Asp Lys Ser Thr Asn
            560                 565                 570

Asp Ala Asp Val Pro Gln Gly Val Ile Arg Val Gln Ala Pro His
            575                 580                 585

Leu Ser Lys Val Ser Met Ala Ile Gln Leu Thr Glu Glu Leu Lys
            590                 595                 600

Ala Ser Asp Val Leu Ala Arg Phe Leu Ser Gln Glu Ser Gly Val
            605                 610                 615
```

Ala Gln Thr Leu Lys Lys Gly Glu Val Phe Leu Tyr Glu Ile Gly
620 625 630

Gly Asn Ile Gly Glu Arg Cys Leu Asp Asp Asp Thr Tyr Met Lys
635 640 645

Asp Leu Tyr Gln Leu Asn Pro Asn Ala Glu Trp Val Ile Lys Ser
650 655 660

Lys Pro Leu

<210> 15
<211> 1327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> unsure
<222> 74, 1306
<223> unknown base

<400> 15
gcggggctgc ccctgcagcg acagccccat cctgcagcca ccaatggcat 50

gacccagggc cccggcactg cctngtgtga ggggctggca gctttccaac 100

tgcagcaagt ggaggccccc gccagcttcg ggcctgtggg caggggctca 150

gtggggcagg ggtgtggctg ccccgccccgg cacgcctgca cctgtctcct 200

ctttgtgacc agtaccgcaa ggggatcatc tcgggctccg tctgccagga 250

cctgtgtgag ctgcat atg gtg gag tgg agg acc tgc ctc 290
Met Val Glu Trp Arg Thr Cys Leu
1 5

tcg gtg gcc ccg ggc cag cag gtg tac agc ggg ctc tgg 329
Ser Val Ala Pro Gly Gln Gln Val Tyr Ser Gly Leu Trp
10 15 20

cgg gac aag gat gta acc atc aag tgt ggc att gag gag 368
Arg Asp Lys Asp Val Thr Ile Lys Cys Gly Ile Glu Glu
25 30

acc ctc gac tcc aag gcc cgg tcg gat gcg gcc ccc cgg 407
Thr Leu Asp Ser Lys Ala Arg Ser Asp Ala Ala Pro Arg
35 40 45

cgg gag ctg gta ctg ttt gac aag ccc acc cgg ggc acc 446
Arg Glu Leu Val Leu Phe Asp Lys Pro Thr Arg Gly Thr
50 55 60

tcc atc aag gaa ttc cgg gag atg acc ctc ggc ttc ctc 485
Ser Ile Lys Glu Phe Arg Glu Met Thr Leu Gly Phe Leu
65 70

aag gcg aac ctg gga gac ctg cct tcc ctg ccg gcg ctg 524
Lys Ala Asn Leu Gly Asp Leu Pro Ser Leu Pro Ala Leu
75 80 85

gtt ggc cag gtc ctg ctc atg gct gac ttc aac aag gac 563
Val Gly Gln Val Leu Leu Met Ala Asp Phe Asn Lys Asp

```
                90                  95

aac cgg gtg tcc ctg gcg gaa gcc aag tcc gtg tgg gcc 602
Asn Arg Val Ser Leu Ala Glu Ala Lys Ser Val Trp Ala
100                 105                 110

ctg ctg cag cgt aac gag ttc ctg ctg ctg ctg tcc ctg 641
Leu Leu Gln Arg Asn Glu Phe Leu Leu Leu Leu Ser Leu
        115                 120                 125

cag gag aag gag cac gcc tcc aga ctg ctg ggc tac tgt 680
Gln Glu Lys Glu His Ala Ser Arg Leu Leu Gly Tyr Cys
                130                 135

ggg gac ctc tac ctc acc gag ggc gtg ccg cat ggc gcc 719
Gly Asp Leu Tyr Leu Thr Glu Gly Val Pro His Gly Ala
    140                 145                 150

tgg cac gcg gcc gcc ctc cca ccc ctg ttg cgc cca ctg 758
Trp His Ala Ala Ala Leu Pro Pro Leu Leu Arg Pro Leu
            155                 160

ctg ccg cct gcc ctg cag ggt gct ctc cag cag tgg ctg 797
Leu Pro Pro Ala Leu Gln Gly Ala Leu Gln Gln Trp Leu
165                 170                 175

ggg cct gcg tgg cct tgg cgg gcc aag atc gcc atc ggc 836
Gly Pro Ala Trp Pro Trp Arg Ala Lys Ile Ala Ile Gly
        180                 185                 190

ctg ctg gag ttc gtg gag gag ctc ttc cac ggc tct tac 875
Leu Leu Glu Phe Val Glu Glu Leu Phe His Gly Ser Tyr
                195                 200

ggg act ttc tac atg tgt gag acc aca ctg gcc aac gtg 914
Gly Thr Phe Tyr Met Cys Glu Thr Thr Leu Ala Asn Val
    205                 210                 215

ggc tac aca gcc acc tac gac ttc aag atg gcc gac ctg 953
Gly Tyr Thr Ala Thr Tyr Asp Phe Lys Met Ala Asp Leu
            220                 225

cag cag gtg gca ccc gag gcc acc gtg cgc cgc ttc ctg 992
Gln Gln Val Ala Pro Glu Ala Thr Val Arg Arg Phe Leu
230                 235                 240

cag ggc cgc cgc tgc gag cac agc acc gac tgc acc tac 1031
Gln Gly Arg Arg Cys Glu His Ser Thr Asp Cys Thr Tyr
        245                 250                 255

ggg cgc gac tgc agg gcc ccg tgt gac agg ctc atg agg 1070
Gly Arg Asp Cys Arg Ala Pro Cys Asp Arg Leu Met Arg
                260                 265

cag tgc aag ggc gac ctc atc cag ccc aac ctg gcc aag 1109
Gln Cys Lys Gly Asp Leu Ile Gln Pro Asn Leu Ala Lys
    270                 275                 280

gtg tgc gca ctg cta cgg ggc tac ctg ctg cct ggc gcg 1148
Val Cys Ala Leu Leu Arg Gly Tyr Leu Leu Pro Gly Ala
            285                 290

ccc gcc gac ctc cgc gag gag ctg ggc aca cag ctg cgc 1187
```

```
Pro Ala Asp Leu Arg Glu Glu Leu Gly Thr Gln Leu Arg
295                 300                 305

acc tgt acc acg ctg agc ggg ctg gcc agc cag gtg gag 1226
Thr Cys Thr Thr Leu Ser Gly Leu Ala Ser Gln Val Glu
        310                 315                 320

gcc cat cac tcg ctg gtg ctc agc cac ctc aag act ctg 1265
Ala His His Ser Leu Val Leu Ser His Leu Lys Thr Leu
                325                 330

ctc tgg aag aag atc tcc aac acc aag tac tct t g 1300
Leu Trp Lys Lys Ile Ser Asn Thr Lys Tyr Ser
    335                 340             344

atgggnaatg agggcttgca accttct 1327

<210> 16
<211> 344
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> unsure
<222> 104
<223> unknown amino acid

<400> 16
Met Val Glu Trp Arg Thr Cys Leu Ser Val Ala Pro Gly Gln Gln
  1               5                  10                  15

Val Tyr Ser Gly Leu Trp Arg Asp Lys Asp Val Thr Ile Lys Cys
                20                  25                  30

Gly Ile Glu Glu Thr Leu Asp Ser Lys Ala Arg Ser Asp Ala Ala
                35                  40                  45

Pro Arg Arg Glu Leu Val Leu Phe Asp Lys Pro Thr Arg Gly Thr
                50                  55                  60

Ser Ile Lys Glu Phe Arg Glu Met Thr Leu Gly Phe Leu Lys Ala
                65                  70                  75

Asn Leu Gly Asp Leu Pro Ser Leu Pro Ala Leu Val Gly Gln Val
                80                  85                  90

Leu Leu Met Ala Asp Phe Asn Lys Asp Asn Arg Val Ser Xaa Ala
                95                 100                 105

Glu Ala Lys Ser Val Trp Ala Leu Leu Gln Arg Asn Glu Phe Leu
               110                 115                 120

Leu Leu Leu Ser Leu Gln Glu Lys Glu His Ala Ser Arg Leu Leu
               125                 130                 135

Gly Tyr Cys Gly Asp Leu Tyr Leu Thr Glu Gly Val Pro His Gly
               140                 145                 150

Ala Trp His Ala Ala Ala Leu Pro Pro Leu Leu Arg Pro Leu Leu
               155                 160                 165

Pro Pro Ala Leu Gln Gly Ala Leu Gln Gln Trp Leu Gly Pro Ala
               170                 175                 180
```

Trp Pro Trp Arg Ala Lys Ile Ala Ile Gly Leu Leu Glu Phe Val
185 190 195

Glu Glu Leu Phe His Gly Ser Tyr Gly Thr Phe Tyr Met Cys Glu
200 205 210

Thr Thr Leu Ala Asn Val Gly Tyr Thr Ala Thr Tyr Asp Phe Lys
215 220 225

Met Ala Asp Leu Gln Gln Val Ala Pro Glu Ala Thr Val Arg Arg
230 235 240

Phe Leu Gln Gly Arg Arg Cys Glu His Ser Thr Asp Cys Thr Tyr
245 250 255

Gly Arg Asp Cys Arg Ala Pro Cys Asp Arg Leu Met Arg Gln Cys
260 265 270

Lys Gly Asp Leu Ile Gln Pro Asn Leu Ala Lys Val Cys Ala Leu
275 280 285

Leu Arg Gly Tyr Leu Leu Pro Gly Ala Pro Ala Asp Leu Arg Glu
290 295 300

Glu Leu Gly Thr Gln Leu Arg Thr Cys Thr Thr Leu Ser Gly Leu
305 310 315

Ala Ser Gln Val Glu Ala His His Ser Leu Val Leu Ser His Leu
320 325 330

Lys Thr Leu Leu Trp Lys Lys Ile Ser Asn Thr Lys Tyr Ser
335 340

<210> 17
<211> 3020
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> unsure
<222> 4, 107, 109, 112, 119, 122, 176, 323, 1616, 1878, 1881, 1911, 1924, 1939, 1953, 1982, 1991-1992, 2000, 2443
<223> unknown base

<400> 17
gcgnccgccg cctctggccg ccgccatcgc cgcttcagac ttcagaacca 50

gcgtcgtcct caaccacctg gccgagaagt ggtttccggg ccagcgcgag 100

tgctctngng cncggcaant cnggggagct actgcaccag gggcgctacc 150

gggagccctg gcgccgcctg cgaggnctgc gagcagaacc cagtgacttg 200

attgtaaaaa tttacagagc ggaatcatat gctggtctcc aagagtttaa 250

agcagcctta gaagatttaa atg cag ttc ttt ttc aac ttc 291
Met Gln Phe Phe Phe Asn Phe
1 5

caa gat tgg cct gaa ggt cta ctt cag gaa ang gaa aaa 330
Gln Asp Trp Pro Glu Gly Leu Leu Gln Glu Xaa Glu Lys
10 15 20

```
gta ctc tgc gat gct ggt ttt tta ggt gat gcc tta caa 369
Val Leu Cys Asp Ala Gly Phe Leu Gly Asp Ala Leu Gln
                  25                  30

ctc ttt ctt cag tgc tta gcc ctt gat gaa gat ttt gca 408
Leu Phe Leu Gln Cys Leu Ala Leu Asp Glu Asp Phe Ala
     35                  40                  45

cct gca aag ctg caa gta caa aag att tta tgt gat tta 447
Pro Ala Lys Leu Gln Val Gln Lys Ile Leu Cys Asp Leu
                 50                  55

tta tta cct gaa aac tta aaa gaa ggc ctg aag gaa tct 486
Leu Leu Pro Glu Asn Leu Lys Glu Gly Leu Lys Glu Ser
 60                  65                  70

tcc tgg agt tca tta cca tgt act aaa aac aga cct ttt 525
Ser Trp Ser Ser Leu Pro Cys Thr Lys Asn Arg Pro Phe
          75                  80                  85

gat ttt cat tca gtg atg gaa gag tct cag tct ctc aat 564
Asp Phe His Ser Val Met Glu Glu Ser Gln Ser Leu Asn
                 90                  95

gaa cct agc cca aag cag agt gaa gaa ata cca gag gtc 603
Glu Pro Ser Pro Lys Gln Ser Glu Glu Ile Pro Glu Val
     100                 105                 110

act tca gag cct gtc aaa gga agc tta aac cgt gct cag 642
Thr Ser Glu Pro Val Lys Gly Ser Leu Asn Arg Ala Gln
             115                 120

tca gca cag tct ata aat tca aca gaa atg cct gcc aga 681
Ser Ala Gln Ser Ile Asn Ser Thr Glu Met Pro Ala Arg
125                 130                 135

gag gac tgt tta aaa aaa gtg tcc tca gaa cct gtt ctg 720
Glu Asp Cys Leu Lys Lys Val Ser Ser Glu Pro Val Leu
         140                 145                 150

tca gtt caa gaa aaa ggt gtt ctg ctg aaa aga aag ttg 759
Ser Val Gln Glu Lys Gly Val Leu Leu Lys Arg Lys Leu
                 155                 160

tct ctt tta gaa cag gat gtg att gta aat gaa gat gga 798
Ser Leu Leu Glu Gln Asp Val Ile Val Asn Glu Asp Gly
     165                 170                 175

aga aat aag ctg aaa aaa caa gga gaa act ccc aat gaa 837
Arg Asn Lys Leu Lys Lys Gln Gly Glu Thr Pro Asn Glu
             180                 185

gtc tgt atg ttt tcc tta gct tat ggt gat att cca gaa 876
Val Cys Met Phe Ser Leu Ala Tyr Gly Asp Ile Pro Glu
190                 195                 200

gaa tta atc gat gtc tca gat ttc gag tgt tct ctc tgc 915
Glu Leu Ile Asp Val Ser Asp Phe Glu Cys Ser Leu Cys
         205                 210                 215

atg agg ttg ttt ttt gag cca gta aca acc cct tgc gga 954
Met Arg Leu Phe Phe Glu Pro Val Thr Thr Pro Cys Gly
                 220                 225
```

```
cat tcg ttc tgt aag aat tgt ctt gag cgt tgt tta gat 993
His Ser Phe Cys Lys Asn Cys Leu Glu Arg Cys Leu Asp
    230                 235                 240

cat gca cca tat tgt cct ctt tgc aaa gaa agc tta aat 1032
His Ala Pro Tyr Cys Pro Leu Cys Lys Glu Ser Leu Asn
            245                 250

gag tat cta gca gat agg agg tac tgt gtc aca cag ctg 1071
Glu Tyr Leu Ala Asp Arg Arg Tyr Cys Val Thr Gln Leu
255                 260                 265

ttg gaa gaa tta ata gtg aag tat ctg cct gat gaa ctg 1110
Leu Glu Glu Leu Ile Val Lys Tyr Leu Pro Asp Glu Leu
        270                 275                 280

tct gag aga aaa aaa ata tat gaa gaa gaa act gct gaa 1149
Ser Glu Arg Lys Lys Ile Tyr Glu Glu Glu Thr Ala Glu
                285                 290

ctc tca cac ttg acc aag aat gtt cca ata ttt gtt tgc 1188
Leu Ser His Leu Thr Lys Asn Val Pro Ile Phe Val Cys
    295                 300                 305

act atg gcc tac ccc act gtg cct tgc cct ctc cat gta 1227
Thr Met Ala Tyr Pro Thr Val Pro Cys Pro Leu His Val
            310                 315

ttt gag cca aga tac aga ttg atg att cga aga agt ata 1266
Phe Glu Pro Arg Tyr Arg Leu Met Ile Arg Arg Ser Ile
320                 325                 330

cag act gga acc aaa cag ttt ggc atg tgt gtc agt gat 1305
Gln Thr Gly Thr Lys Gln Phe Gly Met Cys Val Ser Asp
        335                 340                 345

aca caa aat agt ttt gca gat tat ggt tgt atg tta caa 1344
Thr Gln Asn Ser Phe Ala Asp Tyr Gly Cys Met Leu Gln
                350                 355

att aga aac gtg cat ttc tta ccg gac gga agg tct gtg 1383
Ile Arg Asn Val His Phe Leu Pro Asp Gly Arg Ser Val
    360                 365                 370

gtt gat aca gtt gga gga aag cgg ttt agg gtt tta aaa 1422
Val Asp Thr Val Gly Gly Lys Arg Phe Arg Val Leu Lys
            375                 380

aga gga atg aaa gat gga tat tgc act gcc gac att gaa 1461
Arg Gly Met Lys Asp Gly Tyr Cys Thr Ala Asp Ile Glu
385                 390                 395

tat ctg gaa gat gtt aag gtt gag aat gaa gat gag att 1500
Tyr Leu Glu Asp Val Lys Val Glu Asn Glu Asp Glu Ile
        400                 405                 410

aag aat ctc aga gag ctt cat gat ttg gtt tac tct caa 1539
Lys Asn Leu Arg Glu Leu His Asp Leu Val Tyr Ser Gln
                415                 420

gcc tgc agc tgg ttt cag aat tta aga gac aga ttt cga 1578
Ala Cys Ser Trp Phe Gln Asn Leu Arg Asp Arg Phe Arg
    425                 430                 435
```

```
agc caa att ctt cag cat ttc gga tca atg ccc gag ang 1617
Ser Gln Ile Leu Gln His Phe Gly Ser Met Pro Glu Xaa
            440                 445

gag gaa aac ctt cag gca gcc cct aat gga cct gca tgg 1656
Glu Glu Asn Leu Gln Ala Ala Pro Asn Gly Pro Ala Trp
450                 455                 460

tgt tgg tgg ctt ctt gca gtt ctc cct gta gac cca cga 1695
Cys Trp Trp Leu Leu Ala Val Leu Pro Val Asp Pro Arg
        465                 470                 475

tac cag ctg tcg gtt ttg tca atg aag tct ttg aaa gaa 1734
Tyr Gln Leu Ser Val Leu Ser Met Lys Ser Leu Lys Glu
                480                 485

cgg ttg acc aag ata cag cat ata ctg acc tat ttt tct 1773
Arg Leu Thr Lys Ile Gln His Ile Leu Thr Tyr Phe Ser
    490                 495                 500

aga gac caa tct aag t a actaactctt tggatctccc 1810
Arg Asp Gln Ser Lys
            505 506

tttaaagtga ccctaatctg gctgcattga tggccagatt gtctgctgcc 1860

tttgcacatc tagtgctngg ntttcagaaa tttaatgaaa cttttctttt 1910

ntccttcgac ctcnctgaat catgtggtnt ctgcaaatga atnaccttca 1960

actaggattt agaccactaa gnaacttgca nncagaaaan acacgcattg 2010

aatgtgtgtc gaacctctac attgtgaagt tgcactatgt accatactct 2060

aaaatgaaat aagaactctt tatgtctgtg agagagtgtg tgtgtgtgtg 2110

tgcgtgcgtg tgtgcttgtg ggggttgggt agtgtgtgtg tattttctct 2160

ggctttaaaa ttttaaaaca aacaaaccaa aaagccatag agagcagaac 2210

ttgccgaggg tcatttattg cccaagttta caagagtagc gatacaagtt 2260

tttgcaaatt gaatttgcct cagatatatc tgtcctaatg cttatatttg 2310

cacaagtatg taaaatatcg tgttgaggat cattctttgt tggaaatact 2360

gctcttgctg aactgtcttg accattgact atgacacagt ttcttattta 2410

tgtaaatact tgcatcacag tggccgacag atntgggatg cagaacctag 2460

agccagtttt caggaacaat tgtaaacctg acatggtact gtgcatctat 2510

tcataaaaca ctcaaaactg tgaaaatatg gtttacattt aattgtacat 2560

aaaggtaaag ggagaactca attcagtacc agttagtttg tacatttag 2610

ggggcttttc acattaactg cccatttgtg taatttatag tttgacatga 2660

tgtgtttgtt ttaaaaaaaa atgcatagta taaacccatt aaggatctgg 2710

gaaaagagaa gaagtttaat atagaactaa gcttttaaag tttgtttttg 2760

tttttaattc tggtctcggt gcaaatgtta gttatgcctt attcatatca 2810
```

cagttagatc accatgctgc aacatggttt atattcatgc tgccctagaa 2860

acttttgtaa ttatttgttg caaatttgtg actgtcctta ttaactttct 2910

tttatgtaag taatttgtaa aagtttctta aaatttttgc ttttgcttat 2960

ttaattttga ataaaagcta aattcctaat aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3010

aaaaaaaaaa 3020

<210> 18
<211> 506
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> unsure
<222> 18, 448
<223> unknown amino acid

<400> 18

Met Gln Phe Phe Phe Asn Phe Gln Asp Trp Pro Glu Gly Leu Leu
1 5 10 15

Gln Glu Xaa Glu Lys Val Leu Cys Asp Ala Gly Phe Leu Gly Asp
20 25 30

Ala Leu Gln Leu Phe Leu Gln Cys Leu Ala Leu Asp Glu Asp Phe
35 40 45

Ala Pro Ala Lys Leu Gln Val Gln Lys Ile Leu Cys Asp Leu Leu
50 55 60

Leu Pro Glu Asn Leu Lys Glu Gly Leu Lys Glu Ser Ser Trp Ser
65 70 75

Ser Leu Pro Cys Thr Lys Asn Arg Pro Phe Asp Phe His Ser Val
80 85 90

Met Glu Glu Ser Gln Ser Leu Asn Glu Pro Ser Pro Lys Gln Ser
95 100 105

Glu Glu Ile Pro Glu Val Thr Ser Glu Pro Val Lys Gly Ser Leu
110 115 120

Asn Arg Ala Gln Ser Ala Gln Ser Ile Asn Ser Thr Glu Met Pro
125 130 135

Ala Arg Glu Asp Cys Leu Lys Lys Val Ser Ser Glu Pro Val Leu
140 145 150

Ser Val Gln Glu Lys Gly Val Leu Leu Lys Arg Lys Leu Ser Leu
155 160 165

Leu Glu Gln Asp Val Ile Val Asn Glu Asp Gly Arg Asn Lys Leu
170 175 180

Lys Lys Gln Gly Glu Thr Pro Asn Glu Val Cys Met Phe Ser Leu
185 190 195

Ala Tyr Gly Asp Ile Pro Glu Glu Leu Ile Asp Val Ser Asp Phe
200 205 210

Glu Cys Ser Leu Cys Met Arg Leu Phe Phe Glu Pro Val Thr Thr
215 220 225

Pro Cys Gly His Ser Phe Cys Lys Asn Cys Leu Glu Arg Cys Leu
230 235 240

Asp His Ala Pro Tyr Cys Pro Leu Cys Lys Glu Ser Leu Asn Glu
245 250 255

Tyr Leu Ala Asp Arg Arg Tyr Cys Val Thr Gln Leu Leu Glu Glu
260 265 270

Leu Ile Val Lys Tyr Leu Pro Asp Glu Leu Ser Glu Arg Lys Lys
275 280 285

Ile Tyr Glu Glu Glu Thr Ala Glu Leu Ser His Leu Thr Lys Asn
290 295 300

Val Pro Ile Phe Val Cys Thr Met Ala Tyr Pro Thr Val Pro Cys
305 310 315

Pro Leu His Val Phe Glu Pro Arg Tyr Arg Leu Met Ile Arg Arg
320 325 330

Ser Ile Gln Thr Gly Thr Lys Gln Phe Gly Met Cys Val Ser Asp
335 340 345

Thr Gln Asn Ser Phe Ala Asp Tyr Gly Cys Met Leu Gln Ile Arg
350 355 360

Asn Val His Phe Leu Pro Asp Gly Arg Ser Val Val Asp Thr Val
365 370 375

Gly Gly Lys Arg Phe Arg Val Leu Lys Arg Gly Met Lys Asp Gly
380 385 390

Tyr Cys Thr Ala Asp Ile Glu Tyr Leu Glu Asp Val Lys Val Glu
395 400 405

Asn Glu Asp Glu Ile Lys Asn Leu Arg Glu Leu His Asp Leu Val
410 415 420

Tyr Ser Gln Ala Cys Ser Trp Phe Gln Asn Leu Arg Asp Arg Phe
425 430 435

Arg Ser Gln Ile Leu Gln His Phe Gly Ser Met Pro Xaa Arg Glu
440 445 450

Glu Asn Leu Gln Ala Ala Pro Asn Gly Pro Ala Trp Cys Trp Trp
455 460 465

Leu Leu Ala Val Leu Pro Val Asp Pro Arg Tyr Gln Leu Ser Val
470 475 480

Leu Ser Met Lys Ser Leu Lys Glu Arg Leu Thr Lys Ile Gln His
485 490 495

Ile Leu Thr Tyr Phe Ser Arg Asp Gln Ser Lys
500 505

<210> 19
<211> 310
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>
<221> unsure
<222> 300
<223> unknown base

<400> 19
ggatccctgg agctgccatt agaatcaaga atctttgcca agaactagaa 50

gcaaagtttt atgaagggac ttttaattgg gaaagtgtca aacagcatga 100

tgccgccagc ctgctgaagc tcttcattcg ggagttgccc cagccactgc 150

tcagtgtgga gtatctcaaa gcctttcagg ctgtccagaa tcttccaacc 200

aagaagcagc aactacaggg cttttgaacc ctttctttta ctcattcctg 250

atgtttgata cccctggttg aaaacaattc agtaaagcat cctgcctcan 300

acccccccc 310

<210> 20
<211> 26
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 20
gctgcttctt ggttggaaga ttctgg 26

<210> 21
<211> 26
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 21
ccagaatctt ccaaccaaga agcagc 26

<210> 22
<211> 53
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 22
gcatcatgct gtttgacact ttcccaatta aaagtccctt cataaaactt 50

tgc 53

<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 23
ggagctgcca ttagaatcaa gaatctttgc 30

<210> 24
<211> 533
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 24
ttttattagg aatttagctt ttattcaaaa ttaaataagc aaaagcaaaa 50

attttaagaa acttttacaa attacttaca taaaagaaag ttaataagga 100

cagtcacaaa tttgcaacaa ataattacaa aagtttctag ggcagcatga 150

atataaacca tgttgcagca tggtgatcta actgtgatat gaataaggca 200

taactaacat ttgcaccgag accagaatta aaaacaaaaa caaactttaa 250

aagcttagtt ctatattaaa cttcttctct tttcccagat ccttaatggg 300

tttatactat gcatttttt ttaaaacaaa cacatcatgt caaactataa 350

attacacaaa tgggcagtta atgtgaaaag ccccctaaaa tgtacaaact 400

aactggtact gaattgagtt ctccctttac ctttatgtac aattaaatgt 450

aaaccatatt ttcacagttt tgagtgtttt atgaatagat gcacagtacc 500

atgtcaggtt tacaattgtt cctgaaaact ggc 533

<210> 25
<211> 433
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 25
agcagcagca ggaactcgtt acgctgcagc agggcccaca cggacttggc 50

ttccgcccag gacacccggt tgtccttgtt gaagtcagcc atgagcagga 100

cctggccaac cagcgccggc agggaaggca ggtctcccag gttcgccttg 150

aggaagccga gggtcatctc ccggaattcc ttgatggagg tgccccgggt 200

gggcttgtca aacagtacca gctcccgccg ggggccgcat ccgacggggc 250

cttggagtcg agggtctcct caatgccaca cttgatggtt acatccttgt 300

cccgccagag cccgctgtac acctgctggc ccggggcaca cgagaagcag 350

gtcctccact ccaccatatg cagctcacac aggtcctggc agacggagcc 400

cgagatgatc cccttgcggt actggtcaca aat 433

<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 26
atgcagttct ttttcaactt cc 22

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 27
ctagagacca atctaagtaa 20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 28
atggtggagt ggaggacctg 20

<210> 29
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 29
ctccaacacc aagtactctt ga 22

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/27512

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/50
G01N33/566 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 C12Q G01N A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, EMBL, BIOSIS

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 SEQUENCES [Online] Accession No. AI684747, 28 May 1999 (1999-05-28) STRAUSBERG R.: "EST; Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2302989" XP002158425 complementary to seq. 2263-2856 of seq. ID 1. ---	1,2,5, 9-16, 18-26, 28-31
E	WO 00 73469 A (PLOWMAN GREGORY D ;SUGEN INC (US); WHYTE DAVID (US); MARTINEZ RICA) 7 December 2000 (2000-12-07) compare seq.1 (nt 66-1990) with seq. 87 of WO0073469 (nt 1-1926) --- -/--	1,2,5, 9-16, 18-26, 28-31

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

° Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 January 2001	29 05 2001

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

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/27512

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DATABASE EMBL SEQUENCES [Online] Accession No. Q9NXB8, 1 October 2000 (2000-10-01) KAWAKAMI T. ET AL.: "cDNA FLJ20335 FIS, clone HEP11429 (H. sapiens)." XP002158426 compare with seq. 2. ---	1-31
A	DRAGONI I. ET AL.: "EDF-1, a novel gene product down-regulated in human endothelial cell differentiation" J. BIOL. CHEM., vol. 273, no. 47, 20 November 1998 (1998-11-20), pages 31119-31124, XP002158424 the whole document -----	1-112

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/27512

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:

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

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.:

see further information sheet invention 1.

Remark on Protest

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 00/27512

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-112, partly

An isolated nucleic acid molecule that comprise a nucleotide sequence having at least about 80% sequence identity to a nucleotide encoding PRO-C-MG2 (seq. 1 and 2) or complement thereof.

Corresponding polypeptides, vectors, recombinant host cells, processes, chimeric molecules, antisenses, ribozymes, antibodies, agonists, antagonists and their therapeutic or diagnostic applications. A microarray comprising a solid support and said nucleic acid among a library of nucleic acids.

2. Claims: 1-112, partly

Idem as subject-matter 1, but limited to PRO-C-MG.12 (Seq. 3 and 4).

3. Claims: 1,2,4-112, partly

Idem as subject-matter 1, but limited to PRO-C-MG.45 (Seq. 17 and 18).

4. Claims: 1,2,4-112,partly

Idem as subject-matter 1, but limited to PRO-C-MG.64 (Seq. 15 and 16).

5. Claims: 1,2,4-112, partly

Idem as subject-matter 1, but limited to PRO-C-MG.72 (Seq. 13 and 14).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/27512

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0073469 A	07-12-2000	AU 5173400 A	18-12-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]		識別記号	FI			ﾃｰﾏｺｰﾄﾞ(参考)
Ａ６１Ｋ	39/395		Ａ６１Ｐ	7/00		４Ｂ０６５
	45/00			9/10		４Ｃ０８４
	48/00			17/00		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ	7/00			35/00		４Ｃ０８６
	9/10		Ｃ０７Ｋ	14/47		４Ｈ０４５
	17/00			16/18		
	35/00			16/46		
Ｃ０７Ｋ	14/47		Ｃ１２Ｍ	1/00	A	
	16/18		Ｃ１２Ｎ	1/15		
	16/46			1/19		
Ｃ１２Ｍ	1/00			1/21		
Ｃ１２Ｎ	1/15			7/00		
	1/19		Ｃ１２Ｐ	21/02	C	
	1/21		Ｃ１２Ｑ	1/02		
	5/10			1/68	A	
	7/00		Ｇ０１Ｎ	33/15	Z	
Ｃ１２Ｐ	21/02			33/50	Z	
Ｃ１２Ｑ	1/02			33/53	D	
	1/68				M	
Ｇ０１Ｎ	33/15			33/566		
	33/50			37/00	１０２	
	33/53		Ｃ１２Ｐ	21/08		
			Ｃ１２Ｒ	1:91		
	33/566			1:93		
	37/00	１０２	Ｃ１２Ｎ	15/00	ＺＮＡＡ	
// Ｃ１２Ｐ	21/08				F	
(Ｃ１２Ｎ	5/10			5/00	A	
Ｃ１２Ｒ	1:91)				B	
(Ｃ１２Ｎ	7/00		Ａ６１Ｋ	37/02		
Ｃ１２Ｒ	1:93)					
(Ｃ１２Ｐ	21/02					
Ｃ１２Ｒ	1:91)					

(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, ＭＺ, ＳＤ, ＳＬ, ＳＺ, ＴＺ, ＵＧ, ＺＷ), ＥＡ(ＡＭ, ＡＺ, ＢＹ, ＫＧ, ＫＺ, ＭＤ, ＲＵ, ＴＪ, ＴＭ), ＡＥ, ＡＧ, ＡＬ, ＡＭ, ＡＴ, ＡＵ, ＡＺ, ＢＡ, ＢＢ, ＢＧ, ＢＲ, ＢＹ, ＢＺ, ＣＡ, ＣＨ, ＣＮ, ＣＲ, ＣＵ, ＣＺ, ＤＥ, ＤＫ, ＤＭ, ＤＺ, ＥＥ, ＥＳ, ＦＩ, ＧＢ, ＧＤ, ＧＥ, ＧＨ, ＧＭ, ＨＲ, ＨＵ, ＩＤ, ＩＬ, ＩＮ, ＩＳ, ＪＰ, ＫＥ, ＫＧ, ＫＰ, ＫＲ, ＫＺ, ＬＣ, ＬＫ, ＬＲ, ＬＳ, ＬＴ, ＬＵ, ＬＶ, ＭＡ, ＭＤ, ＭＧ, ＭＫ, ＭＮ, ＭＷ, ＭＸ, ＭＺ, ＮＯ, ＮＺ, ＰＬ, ＰＴ, ＲＯ, ＲＵ, ＳＤ, ＳＥ, ＳＧ, ＳＩ, ＳＫ, ＳＬ, ＴＪ, ＴＭ, ＴＲ, ＴＴ, ＴＺ, ＵＡ, ＵＧ, ＵＺ, ＶＮ, ＹＵ, ＺＡ, ＺＷ

(71)出願人 キュラジェン　コーポレイション
アメリカ合衆国　コネチカット州　06511　ニュー　ヘイブン　ロング　ウォーフ　ドライブ　555
(72)発明者 ギャレットセン,　マリー　イー.
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94402,　サン　マテオ,　パロット　ドライブ　541
(72)発明者 ゴッダード,　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 グリマルディ,　ジェイ.　クリストファー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94122,　サン　フランシスコ,　36ティーエイチ　アベニュー　1434
(72)発明者 メーラボン,　ファド
アメリカ合衆国　コネチカット　06611,　トランブル,　メイン　ストリート　6095

Ｆターム(参考)　2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13
DA14 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 CA04 DA02 DA06
DA12 FA02 GA01 HA01 HA14
HA17
4B029 AA07 AA23
4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ43 QR32
QR55 QS33 QS34
4B064 AG01 AG27 CA19 CC24 DA01
DA13
4B065 AA26 AA72 AA90 AA97 AB01
BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17
BA01 BA08 BA22 BA23 MA01
NA14 ZA402 ZA512 ZA892
ZB262
4C085 AA13 AA14 AA16 CC32 DD62
EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16
MA01 MA04 NA14 ZA40 ZA51
ZA89 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40
DA76 EA23 EA28 FA74

专利名称(译)	新型多肽，其核酸及其在血管生成和血管生成中的用途		
公开(公告)号	JP2003511028A	公开(公告)日	2003-03-25
申请号	JP2001528585	申请日	2000-10-05
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司 CURAGEN CORP		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司 Kyurajen公司		
[标]发明人	ギャレットセンマリーイー ゴッダードオードリー グリマルディジェイクリストファー メーラボンファド		
发明人	ギャレットセン, マリー イー. ゴッダード, オードリー グリマルディ, ジェイ. クリストファー メーラボン, ファド		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P7/00 A61P9/10 A61P17/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12R1/91 C12R1/93 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N37/00		
CPC分类号	A61K38/00 A61P7/00 A61P9/10 A61P17/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K2319/00 C12N2799/027		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P7/00 A61P9/10 A61P17/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N37/00.102 C12P21/08 C12R1/91 C12R1/93 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.F C12N5/00.A C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/HA01 4B024/HA14 4B024/HA17 4B029/AA07 4B029/AA23 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26 4B065/AA72 4B065/AA90 4B065/AA97 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA402 4C084/ZA512 4C084/ZA892 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA40 4C086/ZA51 4C086/ZA89 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA23 4H045/EA28 4H045/FA74		
优先权	60/158587 1999-10-07 US 60/162611 1999-10-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在新血管形成和血管生成中重要的新型多肽，以及编码这些多肽的核酸分子。 同样在本文中，包含那些核酸序列，与胃裂融合的异源多肽，包含本发明多肽的嵌合多肽分子的载体和宿主细胞，其与本发明多肽结合。 提供了抗体，并且涉及产生本发明多肽的方法。 公开了用于刺激或抑制包括人在内的哺乳动物的新血管形成和/或新血管形成或心血管形成的组合物和方法。 药物组

合物基于针对一种或多种这些用途而鉴定的多肽或其拮抗剂。 可以通过本文的组合物诊断，预防或治疗的疾病包括创伤，例如伤口，各种癌症和血管疾病，例如动脉硬化。

比較1	PRO XXXXXXXXXXXXXXX (長さ =15 アミノ酸) 比較タンパク質 XXXXXYYYYYY (長さ =12 アミノ酸) %アミノ酸配列同一性＝(ALIGN－2によって決定される2つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数)÷(PROポリペプチドのアミノ酸残基の総数)＝5÷15＝33. 3%
比較2	PRO XXXXXXXXXX (長さ =10 アミノ酸) 比較タンパク質 XXXXXYYYYYYZZYZ (長さ =15 アミノ酸) %アミノ酸配列同一性＝(ALIGN－2によって決定される2つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数)÷(PROポリペプチドのアミノ酸残基の総数)＝5÷10＝50%
比較3	PRO-DNA NNNNNNNNNNNNNN (長さ =14 ヌクレオチド) 比較DNA NNNNNNLLLLLLLLL (長さ =16 ヌクレオチド) %核酸配列同一性＝(ALIGN－2によって決定される2つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数)÷(PRO－DNA配列のヌクレオチドの総数)＝6÷14＝42. 9%
比較4	PRO-DNA NNNNNNNNNNN (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によって決定される2つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数)÷(PRO－DNA核酸配列のヌクレオチドの総数)＝4÷12＝33. 3%