

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-506595

(P2004-506595A)

(43) 公表日 平成16年3月4日(2004.3.4)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 37/02	2 G O 4 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 3
A 6 1 P 9/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/00	4 B O 6 5
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 332 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2001-500757 (P2001-500757)	(71) 出願人	596168317
(86) (22) 出願日	平成12年5月17日 (2000.5.17)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成13年12月3日 (2001.12.3)		GENENTECH, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/013705		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
(87) 国際公開番号	W02000/073445		0-4990・サウス・サン・フランシス
(87) 国際公開日	平成12年12月7日 (2000.12.7)		コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(31) 優先権主張番号	US9912252	(74) 代理人	100109726
(32) 優先日	平成11年6月2日 (1999.6.2)		弁理士 園田 吉隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100101199
(31) 優先権主張番号	60/141,037		弁理士 小林 義教
(32) 優先日	平成11年6月23日 (1999.6.23)	(72) 発明者	アシュケナジ, アヴィ, ジェー.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 944
(31) 優先権主張番号	60/144,758		02, サン マテオ, テリー タウン ス
(32) 優先日	平成11年7月20日 (1999.7.20)		トリート 1456
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管形成及び心臓血管新生の促進又は阻害

(57) 【要約】

ヒトを含む哺乳動物における血管形成及び／又は心臓血管形成を刺激又は阻害するための組成物及び方法が開示される。製薬組成物は、これらの用途の一又は複数について同定されたポリペプチド又はそれに対するアンタゴニストに基づく。ここでの組成物により診断、予防又は治療される疾患は、創傷等の外傷、種々の癌、及びアテローム性硬化症及び心臓肥大を含む血管疾患を含む。

さらに、本発明は新規なポリペプチド及びこれらのポリペプチドをコードする核酸分子を対象とする。またここで、これらの核酸配列を含むベクター及び宿主細胞、異種ポリペプチドに融合した本発明のポリペプチドを含むキメラ分子、本発明のポリペプチドに結合する抗体、及び本発明のポリペプチドの製造方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチド、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを、製薬的に許容される担体と混合されて含有する組成物。

【請求項2】

前記ポリペプチド、又はその前記アゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量を含有する請求項1に記載の組成物。

10

【請求項3】

アゴニストが、抗-PRO175、抗-PRO200、抗-PRO198、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO535、抗-PRO819、抗-PRO1002、抗-PRO1308、抗-PRO1304、抗-PRO183、抗-PRO202、抗-PRO861、抗-PRO877、抗-PRO879、抗-PRO882又は抗-PRO1710抗体である請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

アンタゴニストが、抗-PRO175、抗-PRO200、抗-PRO198、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO535、抗-PRO819、抗-PRO1002、抗-PRO1308、抗-PRO1304、抗-PRO183、抗-PRO202、抗-PRO861、抗-PRO877、抗-PRO879、抗-PRO882又は抗-PRO1710抗体である請求項1に記載の組成物。

20

【請求項5】

心臓血管、内皮、血管形成又は血管新生抑制薬をさらに含む請求項1に記載の組成物。

【請求項6】

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチド、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを、製薬的に許容される担体と混合することを含んでなる請求項1に記載の組成物の製造方法。

30

【請求項7】

(1) (a) PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチド、(b) PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドを製薬的に許容される担体と混合されて含有する組成物と；

40

(2) 前記組成物を収容する容器と；

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

【請求項8】

前記アゴニストが、抗-PRO175、抗-PRO200、抗-PRO198、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO535、抗-PRO819、抗-PRO1002、抗-PRO1308、抗-PRO1304、抗-PRO183、抗-PRO202、

50

抗-PRO861、抗-PRO877、抗-PRO879、抗-PRO882又は抗-PRO1710抗体である請求項7に記載の製造物品。

【請求項9】

前記アンタゴニストが、抗-PRO175、抗-PRO200、抗-PRO198、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO535、抗-PRO819、抗-PRO1002、抗-PRO1308、抗-PRO1304、抗-PRO183、抗-PRO202、抗-PRO861、抗-PRO877、抗-PRO879、抗-PRO882又は抗-PRO1710抗体である請求項7に記載の製造物品。

【請求項10】

前記組成物が、前記製薬的に許容される担体と混合された、前記ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量を含む請求項7に記載の製造物品。 10

【請求項11】

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドのアゴニストを同定する方法であって：

(a) 細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ； 20

(b) 前記細胞性反応の誘発を測定して、試験化合物が有効なアゴニストであるか否かを決定することを含んでなり、前記細胞性反応の誘発が前記試験化合物が有効なアゴニストであることを示す方法。

【請求項12】

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

【請求項13】

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドの活性を阻害する化合物の同定方法であって、試験化合物を前記ポリペプチドと、試験化合物とポリペプチドとが相互作用するのに十分な条件及び時間で接触させ、前記ポリペプチドの活性が阻害されるか否かを測定することを含んでなる方法。 30

【請求項14】

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドの活性を阻害する化合物の同定方法であって：

(a) 細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、前記ポリペプチドの存在下で、前記ポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ； 40

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

【請求項15】

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

【請求項16】

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1 50

710ポリペプチドの、該ポリペプチドを通常発現する細胞における発現を阻害する化合物の同定方法であって、細胞と試験化合物とを、前記ポリペプチドを発現させるのに適した条件下で接触させ、前記ポリペプチドの発現が阻害されるか否かを測定することを含んでなる方法。

【請求項17】

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドのアゴニスト。

【請求項18】

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドのアンタゴニスト。

【請求項19】

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドの、前記ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞における発現を阻害する化合物。

【請求項20】

前記化合物が、アンチセンスオリゴヌクレオチドである請求項19に記載の化合物。

【請求項21】

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドに結合する単離された抗体。

【請求項22】

モノクローナル抗体である請求項21に記載の抗体。

【請求項23】

抗体断片である請求項21に記載の抗体。

【請求項24】

一本鎖抗体である請求項21に記載の抗体。

【請求項25】

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドのコード化核酸配列の突然変異に関連する疾患又は疾患に対する感受性を診断する方法であって、前記ポリペプチドのコード化核酸配列における前記突然変異の有無を測定することを含んでなり、前記突然変異の有無が前記疾患又は前記疾患に対する感受性の存在を示す方法。

【請求項26】

哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を診断する方法において、(a)前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料、及び(b)同じ細胞型の公知の正常組織細胞の対照試料におけるPRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを分析することを含んでなり、対照試料に比較した場合の試験試料中の発現レベルの高低が、前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す方法。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を診断する方法において、前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料における PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドの有無を検出することを含んでなり、前記試験試料における前記ポリペプチドの有無が前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す方法。

【請求項 28】

哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を診断する方法において、(a) 前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料を抗-PRO175、抗-PRO200、抗-PRO198、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO535、抗-PRO819、抗-PRO1002、抗-PRO1308、抗-PRO1304、抗-PRO183、抗-PRO202、抗-PRO861、抗-PRO877、抗-PRO879、抗-PRO882又は抗-PRO1710抗体と接触させ、そして(b) 試験試料中での前記抗体とPRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドとの複合体形成を検出することを含んでなり、前記複合体の形成が前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す方法。

【請求項 29】

試料中のPRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドの存在を測定する方法において、前記ポリペプチドを含有すると推測される試料を抗-PRO175、抗-PRO200、抗-PRO198、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO535、抗-PRO819、抗-PRO1002、抗-PRO1308、抗-PRO1304、抗-PRO183、抗-PRO202、抗-PRO861、抗-PRO877、抗-PRO879、抗-PRO882又は抗-PRO1710と接触させ、前記抗体の前記試料の成分への結合を測定することを含んでなる方法。

【請求項 30】

抗-PRO175、抗-PRO200、抗-PRO198、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO535、抗-PRO819、抗-PRO1002、抗-PRO1308、抗-PRO1304、抗-PRO183、抗-PRO202、抗-PRO861、抗-PRO877、抗-PRO879、抗-PRO882又は抗-PRO1710抗体と担体とを適切な包装内に含んでなる心臓血管、内皮又は血管形成疾患の診断キット。

【請求項 31】

哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を治療する方法において、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチド、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量を当該哺乳動物に投与することを含んでなる方法。

【請求項 32】

哺乳動物がヒトである請求項 31に記載の方法。

【請求項 33】

ヒトが心筋梗塞に罹患している請求項 32に記載の方法。

【請求項 34】

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

10

20

30

40

50

【請求項 35】

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

【請求項 36】

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882 又は PRO1710 ポリペプチドが心臓血管、内皮又は血管形成薬と共に投与される請求項 31 に記載の方法。

【請求項 37】

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882 又は PRO1710 ポリペプチドが一次血管形成術に続いて投与される請求項 34 に記載の方法。

【請求項 38】

心臓血管、内皮又は血管形成疾患が癌である請求項 31 に記載の方法。

【請求項 39】

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882 又は PRO1710 ポリペプチドが、化学治療薬、成長阻害薬又は細胞毒性薬と組み合わせて投与される請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記アゴニストが抗-PRO175、抗-PRO200、抗-PRO198、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO535、抗-PRO819、抗-PRO1002、抗-PRO1308、抗-PRO1304、抗-PRO183、抗-PRO202、抗-PRO861、抗-PRO877、抗-PRO879、抗-PRO882 又は抗-PRO1710 抗体である請求項 31 に記載の方法。

【請求項 41】

前記アンタゴニストが抗-PRO175、抗-PRO200、抗-PRO198、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO535、抗-PRO819、抗-PRO1002、抗-PRO1308、抗-PRO1304、抗-PRO183、抗-PRO202、抗-PRO861、抗-PRO877、抗-PRO879、抗-PRO882 又は抗-PRO1710 抗体である請求項 31 に記載の方法。

【請求項 42】

哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を治療する方法において、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882 又は PRO1710 ポリペプチド、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストをコードする核酸分子を当該哺乳動物に投与することを含んでなる方法。

【請求項 43】

前記アゴニストが抗-PRO175、抗-PRO200、抗-PRO198、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO535、抗-PRO819、抗-PRO1002、抗-PRO1308、抗-PRO1304、抗-PRO183、抗-PRO202、抗-PRO861、抗-PRO877、抗-PRO879、抗-PRO882 又は抗-PRO1710 抗体である請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記アンタゴニストが抗-PRO175、抗-PRO200、抗-PRO198、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO535、抗-PRO819、抗-PRO1002、抗-PRO1308、抗-PRO1304、抗-PRO183、抗-PRO202、抗-PRO861、抗-PRO877、抗-PRO879、抗-PRO882 又は抗-PRO1710 抗体である請求項 42 に記載の方法。

10

20

30

40

50

02、抗-PRO1308、抗-PRO1304、抗-PRO183、抗-PRO202、抗-PRO861、抗-PRO877、抗-PRO879、抗-PRO882又は抗-PRO1710抗体である請求項42に記載の方法。

【請求項45】

哺乳動物がヒトである請求項42に記載の方法。

【請求項46】

核酸分子がエキソビボ遺伝子治療を介して投与される請求項42に記載の方法。

【請求項47】

(1) プロモータ、(2) PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストをコードする核酸、及び(3) 当該ポリペプチドの細胞性分泌のためのシグナル配列から本質的になるレトロウイルスベクターを含み、該レトロウイルスベクターがレトロウイルス構造タンパク質に関連している組換えレトロウイルス粒子。

【請求項48】

レトロウイルス構造タンパク質を発現し、(1) プロモータ、(2) PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストをコードする核酸、及び(3) 当該ポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列から本質的になるレトロウイルスベクター核酸構造を含むエキソビボ産生細胞であって、前記産生細胞が構造タンパク質に関連するレトロウイルスベクターを包含して組換えレトロウイルス粒子を産生する産生細胞。

【請求項49】

哺乳動物における内皮細胞成長を阻害する方法において、PRO175、PRO183、PRO198、PRO202、PRO364、PRO535、PRO819、PRO877、PRO879、PRO1002又はPRO1304ポリペプチド又はそのアゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における内皮細胞成長が阻害される方法。

【請求項50】

哺乳動物における内皮細胞成長を刺激する方法において、PRO356、PRO861、PRO1308又はPRO1710ポリペプチド又はそのアゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における内皮細胞成長が刺激される方法。

【請求項51】

哺乳動物における内皮細胞成長を阻害する方法において、PRO356、PRO861、PRO1308又はPRO1710ポリペプチドのアンタゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における内皮細胞成長が阻害される方法。

【請求項52】

哺乳動物における内皮細胞成長を刺激する方法において、PRO175、PRO183、PRO198、PRO202、PRO364、PRO535、PRO819、PRO877、PRO879、PRO1002又はPRO1304ポリペプチドのアンタゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における内皮細胞成長が刺激される方法。

【請求項53】

哺乳動物における心臓肥大を誘発する方法において、当該哺乳動物にPRO183、PRO200、PRO202又はPRO882ポリペプチド又はそのアゴニストを投与することを含んでなり、前記哺乳動物における心臓肥大が誘発される方法。

【請求項54】

哺乳動物において心臓肥大を低減する方法において、PRO183、PRO200、PR

〇 2 0 2 又は P R O 8 8 2 ポリペプチド又はそのアンタゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における前記心臓肥大が低減される方法。

【請求項 5 5】

哺乳動物において P R O 8 6 1 ポリペプチドによって誘発される血管形成を阻害する方法において、抗-P R O 8 6 1 抗体の治療的有効量を当該哺乳動物に投与することを含み、それにより前記血管形成が阻害される方法。

【請求項 5 6】

哺乳動物において P R O 8 6 1 ポリペプチドによって誘発される血管形成を刺激する方法において、前記ポリペプチドの治療的有効量を当該哺乳動物に投与することを含み、それにより前記血管形成が刺激される方法。

10

【請求項 5 7】

哺乳動物における血管形成を阻害する方法において、P R O 1 9 8、P R O 8 7 7、P R O 1 0 0 2 又は P R O 1 3 0 4 ポリペプチドの治療的有効量を当該哺乳動物に投与することを含み、それにより前記血管形成が阻害される方法。

【請求項 5 8】

哺乳動物における血管形成を刺激する方法において、抗-P R O 1 9 8、抗-P R O 8 7 7、抗-P R O 1 0 0 2 又は抗-P R O 1 3 0 4 ポリペプチドの治療的有効量を当該哺乳動物に投与することを含み、それにより前記血管形成が刺激される方法。

【請求項 5 9】

F i g 2 (配列番号: 2)、F i g 4 (配列番号: 4)、F i g 6 (配列番号: 6)、F i g 8 (配列番号: 8)、F i g 1 0 (配列番号: 1 0)、F i g 1 2 (配列番号: 1 2)、F i g 1 4 (配列番号: 1 4)、F i g 1 6 (配列番号: 1 6)、F i g 1 8 (配列番号: 1 8)、F i g 2 0 (配列番号: 2 0)、F i g 2 2 (配列番号: 2 2)、F i g 2 4 (配列番号: 2 4)、F i g 2 6 (配列番号: 2 6)、F i g 2 8 (配列番号: 2 8)、F i g 3 0 (配列番号: 3 0)、F i g 3 2 (配列番号: 3 2) 及び F i g 3 4 (配列番号: 3 4) に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

20

【請求項 6 0】

F i g 1 (配列番号: 1)、F i g 3 (配列番号: 3)、F i g 5 (配列番号: 5)、F i g 7 (配列番号: 7)、F i g 9 (配列番号: 9)、F i g 1 1 (配列番号: 1 1)、F i g 1 3 (配列番号: 1 3)、F i g 1 5 (配列番号: 1 5)、F i g 1 7 (配列番号: 1 7)、F i g 1 9 (配列番号: 1 9)、F i g 2 1 (配列番号: 2 1)、F i g 2 3 (配列番号: 2 3)、F i g 2 5 (配列番号: 2 5)、F i g 2 7 (配列番号: 2 7)、F i g 2 9 (配列番号: 2 9)、F i g 3 1 (配列番号: 3 1) 及び F i g 3 3 (配列番号: 3 3) に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

30

【請求項 6 1】

F i g 1 (配列番号: 1)、F i g 3 (配列番号: 3)、F i g 5 (配列番号: 5)、F i g 7 (配列番号: 7)、F i g 9 (配列番号: 9)、F i g 1 1 (配列番号: 1 1)、F i g 1 3 (配列番号: 1 3)、F i g 1 5 (配列番号: 1 5)、F i g 1 7 (配列番号: 1 7)、F i g 1 9 (配列番号: 1 9)、F i g 2 1 (配列番号: 2 1)、F i g 2 3 (配列番号: 2 3)、F i g 2 5 (配列番号: 2 5)、F i g 2 7 (配列番号: 2 7)、F i g 2 9 (配列番号: 2 9)、F i g 3 1 (配列番号: 3 1) 及び F i g 3 3 (配列番号: 3 3) に示すヌクレオチド配列の全長コード化配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

40

【請求項 6 2】

A T C C 登録番号 2 0 9 4 6 6、2 0 9 6 5 3、2 0 9 2 8 3、2 0 9 4 3 6、2 0 9 4 2 2、2 0 3 0 1 3、2 0 3 0 0 6、2 0 9 8 8 1、2 0 3 2 5 4、又は 2 0 3 2 1 9 の下で寄託された D N A の全長コード化配列と少なくとも 8 0 % の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

50

【請求項 63】

請求項 59 から 62 のいずれか一項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 64】

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

【請求項 65】

請求項 63 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 66】

前記細胞が CHO 細胞である請求項 65 に記載の宿主細胞。

【請求項 67】

前記細胞が大腸菌である請求項 65 に記載の宿主細胞。

【請求項 68】

前記細胞が酵母菌細胞である請求項 65 に記載の宿主細胞。

【請求項 69】

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

【請求項 70】

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882 又は PRO1710 ポリペプチドの製造方法において、請求項 65 に記載の宿主細胞を前記ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、そして前記ポリペプチドを培養培地から回収することを含んでなる方法。

【請求項 71】

Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6)、Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18 (配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig 24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32) 及び Fig 34 (配列番号: 34) に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

【請求項 72】

Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6)、Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18 (配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig 24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32) 及び Fig 34 (配列番号: 34) に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較したとき少なくとも 80% ポジティブのスコアとされる単離されたポリペプチド。

【請求項 73】

ATCC 登録番号 209466、209653、209283、209436、209422、203013、203006、209881、203254、又は 203219 の下で寄託された DNA の全長コード化配列にコードされるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

【請求項 74】

異種アミノ酸配列に融合した請求項 71 から 73 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含むキメラ分子。

【請求項 75】

前記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列である請求項 74 に記載のキメラ分子。

10

20

30

40

50

【請求項 76】

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

【請求項 77】

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

【請求項 78】

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

【請求項 79】

(a) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6) 10
(配列番号: 6)、Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18 (配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig 24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32) 又は Fig 34 (配列番号: 34) に示すポリペプチドであって、それに関連するシグナルペプチドを欠くものをコードするヌクレオチド配列;

(b) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6)
(配列番号: 6)、Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18 20
(配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig 24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32) 又は Fig 34 (配列番号: 34) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであって、それに関連するシグナルペプチドを有するものをコードするヌクレオチド配列; 又は

(c) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6)
(配列番号: 6)、Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18
(配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig 24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32) 又は Fig 34 (配列番号: 34) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであって、それに関連するシグナルペプチドを欠くものをコードするヌクレオチド配列と、少なくとも80%の核酸配列同一性を有する単離された核酸。 30

【請求項 80】

(a) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6)
(配列番号: 6)、Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18
(配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig 24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32) 又は Fig 34 (配列番号: 34) に示すポリペプチドであって、それに関連するシグナルペプチドを欠くもの; 40

(b) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6)
(配列番号: 6)、Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18
(配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig 24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32) 又は Fig 34 (配列番号: 34) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであって、それに関連するシ 50

グナルペプチドを有するもの；又は

(c) Fig 2 (配列番号：2)、Fig 4 (配列番号：4)、Fig 6 (配列番号：6)、Fig 8 (配列番号：8)、Fig 10 (配列番号：10)、Fig 12 (配列番号：12)、Fig 14 (配列番号：14)、Fig 16 (配列番号：16)、Fig 18 (配列番号：18)、Fig 20 (配列番号：20)、Fig 22 (配列番号：22)、Fig 24 (配列番号：24)、Fig 26 (配列番号：26)、Fig 28 (配列番号：28)、Fig 30 (配列番号：30)、Fig 32 (配列番号：32) 又は Fig 34 (配列番号：34) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであって、それに関連するシグナルペプチドを欠くものと、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、そのような生物学的効果を必要とする哺乳動物において血管形成及び／又は心臓血管新生を促進又は阻害するのに有用な組成物及び方法に関する。これは、心臓血管疾患並びに発癌性疾患の診断及び治療を含む。

【0002】

(背景の記載)

A. 心疾患と因子

20

約500万人のアメリカ人が心不全を患っており、心不全の新しい患者は毎年約400000人にのぼる。これは、アメリカ合衆国における65歳以上の人々の、最も頻出の入院原因である。急性心筋梗塞を含む急性心臓疾患の治療技術における最近の進歩により、結局は慢性の心不全を発症する患者数が拡大する結果となった。1979年から1995年まで、鬱血性心不全(CHF)により入院した患者は、377,000人から872,000人まで増加し(130パーセントの増加)、CHFによる死亡は116パーセント増加した。

CHFは、左心室の機能不全、運動負荷試験の低下、生活水準の悪化、顕著な寿命の低下により特徴付けられる症候群である。心不全の必須条件は、体組織の代謝必要量を満たすのに十分な速度で血液を押し出すことに心臓が不能であることである(換言すれば、心拍出量の不足である)。

30

【0003】

末梢血管収縮、心拍数の増加、心収縮性の増加、血漿容量の増加を含む、少なくとも4種の主要な補償メカニズムが心不全の場合に活性化される。これらの効果は、交感神経系とレニン-アンギオテンシン系により主に媒介される。Eichhorn, American Journal of Medicine, 140:163-169 (1998)を参照されたい。交感神経系からの出力の増加は、血管緊張、心拍数及び収縮性を増加させる。アンギオテンシンIIは、1)血管平滑筋収縮を直接刺激し、2)アルドステロンと抗利尿ホルモン分泌を刺激することにより血漿容量の拡大を促進させ、3)交感神経媒介血管緊張を刺激し、4)血管拡張とナトリウム利尿活性を有するブラジキニンの変性を触媒することにより、血圧を上昇させる。BrownとVaughan, Circulation, 97:1411-1420 (1998)による概説を参照されたい。以下に記載するように、アンギオテンシンIIは、筋細胞壊死(心収縮機能を害する)及び心臓内線維症(心拡張とある場合には心収縮機能を害する)を促進することにより、心臓への直接的に有害な影響を持つものである。Weber, Circulation, 96:4065-4082 (1998)を参照されたい。

40

【0004】

鬱血性心不全(CHF)の共通した特徴は心肥大、つまり機械的及びホルモン刺激の双方により活性化され、心臓を心拍出量の増加に適合させる心臓の拡大である。MorganとBaker, Circulation, 83:13-25 (1991)。この肥大応

50

答は、多くの場合、高血圧、大動脈弁狭窄症、心筋梗塞、心筋症、弁閉鎖不全、及び心臓内短絡等の多様な別の病状を伴い、これらは全て慢性的な血行動態過負荷となる。

【0005】

肥大は、腫瘍形成を含まない、自然の成長と関係のない器官又は構造の大きさの増加として一般的に定義されている。心肥大は、個々の細胞（ミオサイト）の質量の増加、又は組織を形成する細胞数の増加（過形成）のいずれか、又はその両方による。胎児の心臓の拡大度合いは、ミオサイト数（誕生のすぐ後まで続く）の増加に依存し、出生後の心臓のミオサイトはその増殖能を失う。さらなる成長は個々の細胞の肥大を通して生じる。

【0006】

成体ミオサイト肥大は、個々の筋繊維への負荷の減少を可能にすることにより、障害性心機能に対しては短時間の応答として最初は有益である。しかし、過酷で長時間の過負荷を受けると、肥大細胞は劣化し始め、死亡する。Katz, "Heart Failure": Katz A. M. 編, Physiology of the Heart (New York: Raven Press, 1992) pp. 638-668。心肥大は、心不全の臨床過程において死亡率と罹患率の両方に対してかなりの危険因子である。Katz, Trends Cardiovasc. Med., 5: 37-44 (1995)。心肥大の原因と病状のさらなる詳細については、例えばHeart Disease, A Textbook of Cardiovascular Medicine, Braunwald, E. 編 (W. B. Saunders Co., 1988), 14章, "Pathophysiology of Heart Failure"を参照されたい。

【0007】

細胞レベルでは、心臓はミオサイトと包括的に非ミオサイトと呼ばれる周囲の支持細胞からなる。非ミオサイトは主として線維芽細胞／間葉細胞であるが、それらは内皮及び平滑筋細胞も含む。実際、ミオサイトは成人心筋質量の大部分を形成するが、それらは心臓に存在する全細胞数の約30%を占めるにすぎない。ホルモンの、生理学的、血行力学的及び病理学的刺激に反応して、成体心室筋細胞は肥大化プロセスの活性化を通して仕事量の増加に適合することができる。この反応は、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）に対する遺伝子を含む胎性遺伝子の活性化と細胞分割が付随することのない、個々の心筋細胞の収縮性タンパク質の含有量とミオサイトの細胞サイズの増加により特徴付けられる。Chienら, FASEB J., 5: 3037-3046 (1991); Chienら, Annu. Rev. Physiol., 55: 75-95 (1993)。心筋内冠動脈の周り細胞外マトリクス内の間質性コラーゲンの蓄積に関連したミオサイトサイズの増大の結果としての心筋質量の増大が、ヒトにおける圧負荷の次の左心室肥大において記載されている。Caspariら, Cardiovasc. Res., 11: 554-558 (1977); Schwarzら, Am. J. Cardiol., 42: 895-903 (1978); Hessら, Circulation, 63: 360-371 (1981); Pearlmanら, Lab. Invest., 46: 158-164 (1982)。

【0008】

非ミオサイト支持細胞により産生されるパラ分泌因子が、心肥大の発生にまた関与していることも示唆されており、白血球阻害因子（LIF）及びエンドセリン等の様々な非ミオサイト由来肥大因子が同定されている。Metcalfe, Growth Factors, 7: 169-173 (1992); Kurzrockら, Endocrine Reviews, 12: 208-217 (1991); Inoueら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2863-2867 (1989); Yanagisawa及びMasaki, Trends Pharm. Sci., 10: 374-378 (1989); 米国特許第5, 573, 762号（1996年11月12日発行）。心肥大の潜在的な媒介物として同定されているさらなる例示的因子には、カルジオトロフィン（cardiotrophin）-1（CT-1）（Pennicaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 1142-1146 (1995)

10

20

30

40

50

))、カテコールアミン類、副腎皮質ステロイド類、アンギオテンシン及びプロスタグランジン類が含まれる。

【0009】

現在、心肥大の治療法は、その根本にある心臓疾患に応じて異なる。肥大の潜在的な媒介物として同定されている因子としては、カテコールアミン類、副腎皮質ステロイド類、アンギオテンシン、プロスタグランジン類、L I F、エンドセリン〔エンドセリン-1、-2及び-3、及び大エンドセリン (big endothelin) を含む〕及びC T-1が挙げられる。例えば、 β -アドレナリン様レセプターブロッカー (β -ブロッカー、例えばプロプラノロール、チモロール、タータロロール (tertalolol)、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール (acetobutolol)、アテノロール、メトプロロール、カルベジロール等) 及びベラパミルが、肥大心筋症の治療に広く使用されている。徴候 (胸の痛み) 及び運動耐性に対する β -ブロッカーの有益な効果は、主として、結果として心拡張の延長と受動的な心室充満の増加に伴う心拍数の低下による。Thompsonら, Br. Heart J., 44: 488-98 (1980); Harrisonら, Circulation, 29: 84-98 (1964)。ベラパミルは心室充満を改善し、おそらく心筋虚血を低減させることが記載されている。Bonowら, Circulation, 72: 853-64 (1985)。

【0010】

ニフェジピンとジルチアゼムもまた、時折、肥大心筋症の治療に使用される。Lorellら, Circulation, 65: 499-507 (1982); Betocchiら, Am. J. Cardiol., 78: 451-457 (1996)。しかしながら、その強力な血管拡張性のために、ニフェジピンは、特に流出閉塞症の患者にとっては有害になるおそれもある。ジソピラミドが負の筋収縮性による徴候を緩和するのに使用されている。Pollack, N. Engl. J. Med., 307: 997-999 (1982)。しかし、多くの患者において、当初の恩恵は時間と共に低減する。Wiggleら, Circulation, 92: 1680-1692 (1995)。抗高血圧薬による治療は、血圧の上昇に伴う心肥大において有益な効果があることが報告されている。抗高血圧治療において単独で又は組み合わせて使用される薬物の例としては、カルシウムアンタゴニスト、例えばニトレンジピン; アドレナリン様レセプターブロッカー、例えば上に列挙したもの; アンギオテンシン転換酵素 (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、フォシノプリル及びリシノプリル; 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、メチルクロロチアジド (methylchlorthiazide)、ベンズチアジド、ジクロロフェナミド、アセタゾラミド、及びインダパミド; 及びカルシウムチャンネルブロッカー、例えばジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル及びニカルジピンが挙げられる。

【0011】

例えば、ジルチアゼム及びカプトプリルを用いた高血圧の治療は、左心室筋肉質量の低減を示しているが、心拡張機能のドップラー指数は正常にはならなかった。Szlachet等, Am. J. Cardiol., 63: 198-201 (1989); Shahi等, Lancet, 336: 458-461 (1990)。これらの知見は、過度の量の間質性コラーゲンが左心室肥大の緩解後に残るであろうことを示していると解釈される。Rossi等, Am. Heart J., 124: 700-709 (1992)。上掲のRossi等は、実験用ラットにおける、圧負荷心臓肥大における心筋細胞肥大と間質性線維症の防止と退行に対するカプトプリルの効果を研究した。

【0012】

心収縮性を直接増大させる薬剤 (変力剤) は、短期間で心拍出量を改善するために当初は心不全の患者にとっては有益であると考えられていた。しかし、ジゴキシゲニンを除く全ての陽性変力剤は、心臓性能の短期間の改善にもかかわらず、長期間では死亡率が増加す

る結果になることが見出されている。Massie, Curr. Op. in Cardiology, 12:209-217 (1997); Reddy等, Curr. Opin. Cardiol., 12:233-241 (1997)。近年、 β -アドレナリン様レセプターブロッカーの心不全への使用が支持されている。臨床試験の証拠によれば、心機能の改善が死亡率を増加させることなく達成可能であることが示唆されるが、患者生存率の改善は今だ証明されていない。また、CHFの治療におけるインシュリン様成長因子-I及び/又は成長ホルモン、又はカルジオトロピン-1又はそのアンタゴニストの使用に関しては米国特許第5,935,924号;同5,624,806号;同5,661,122号;同5,610,134号;及び国際公開第95/28173号を参照されたい。他の治療様式は心臓移植であるが、これはドナーの心臓の入手可能性により制限される。 10

【0013】

エンドセリンは、ブタ動脈のエンドセリン培養上清から単離され、構造的に決定された、21のアミノ酸を含む血管収縮化ペプチドである。Yanagisawa等, Nature, 332, :411-415 (1988)。後になって、エンドセリンは種々の作用を示すことが見出され、エンドセリンアンタゴニストのようなエンドセリン抗体は、心筋梗塞、腎不全、及び他の病気の治療に有効であることが証明されている。エンドセリンは生体内に存在していて、血管収縮作用を示すために、循環系の調節に関与している内因性因子であることが予想され、高血圧、心疾患、例えば心筋梗塞、及び腎臓病、例えば急性腎不全と関連があるであろう。エンドセリンアンタゴニストは、例えば米国特許第5,773,414号;日本国特許公開第3130299/1991号、欧州特許第457,195号;欧州特許第460,679号;及び欧州特許第552,489号に記載されている。エンドセリンレセプターアンタゴニストを同定するための新規なエンドセリンBレセプターは米国特許第5,773,223号に記載されている。 20

【0014】

心不全の現在の治療は、主として、アンギオテンシン転換酵素(ACE)インヒビター、例えばカプトプリル、及び利尿薬を使用することに向けられている。これらの薬物は血行動態特性と運動耐性を改善し、CHF患者の罹患率及び死亡率を低減させる。Kramer等, Circulation, 67(4):807-816 (1983); Captopril Multicenter Research Group, J. A. C. C., 2(4):755-763 (1983); The CONSENSUS Trial Study Group, N. Engl. J. Med., 316(23):1429-1435 (1987); The SOLVD Investigators, N. Engl. J. Med., 325(5):293-302 (1991)。さらに、それらは、高血圧、左心室機能不全、アテローム性動脈硬化症、糖尿病腎障害の治療に有用である。Brown及びVaughan, 上掲。しかしながら、効能が証明されているにもかかわらず、ACEインヒビターに対する反応性は限られている。例えば、心不全の場合に生存を延ばすが、ACEインヒビターは末期心不全への進行を遅延させるようであり、ACEインヒビターを用いた患者のかなりの数が機能クラスIIIの心不全を有している。 30

【0015】

さらに、機能的能力と運動時間の改善性は僅かで、死亡率は低減はするが高いままである。The CONSENSUS Trial Study Group, N. Engl. J. Med., 316(23):1429-1453 (1987); The SOLVD Investigators, N. Engl. J. Med., 325(5):293-302 (1991); Cohn等, N. Engl. J. Med., 325(5):303-310 (1991); The Captopril-Digoxin Multicenter Research Group, JAMA, 259(4):539-544 (1988)。このため、ACEインヒビターにより、いつも60%以上の心不全患者において徴候を緩和することができず、心不全による死亡率を約15-20%も低減させることはできないようである。さらなる好ましくない効果は 上掲のBrown及 40 50

びV a u g h a nを参照されたい。

【0016】

また、ACEインヒビターの代替物は特定のAT1レセプターアンタゴニストである。臨床研究では、心臓血管及び腎臓の病気の治療における、2つの様式の効能を比較することが計画されている。しかしながら、動物モデルのデータでは、ACE/Ang II経路は、心臓肥大に明らかに関与しているが、唯一のものではなく、あるいはこの役割に活性な主要経路でさえないことを示唆している。マウスの遺伝的「ノックアウト」モデルにおいて、個々の経路の成分が試験されている。このような一つのモデルにおいては、Ang IIに対する主要な心臓レセプター、ATsub1Aが遺伝学的に欠失されており；これらのマウスは、Ang IIが実験的に付与された場合に肥大を発現しない（Ang IIに二次的な肥大の消滅におけるモデルの基本的な成功を確認する）。しかしながら、これらの動物（高血圧の心臓ストレスのモデル）において大動脈を収縮させた場合、心臓はなおも肥大性になる。このことは、このレセプター（ATサブ1A）に無関係な別のシグナル伝達経路が高血圧において活性化されていることを示唆している。おそらく、ACEインヒビターはこれらの経路を阻害することはできないであろう。Harada等, *Circulation*, 97:1952-1959 (1998)を参照されたい。また、心臓肥大のプロセスとメカニズムに関連した謎については、Homcy, *Circulation*, 97:1890-1892 (1998)を参照されたい。

10

【0017】

毎年約750000人の患者が急性心筋梗塞（AMI）を患っており、アメリカ合衆国における全死亡の約4分の1がAMIによるものである。近年、血栓溶解剤、例えばストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、特に組織プラスミノゲンアクチベータ（t-PA）が、心筋梗塞を患っている患者の生存率をかなり増加させた。1.5～4時間、連続して静脈注入として投与した場合、t-PAは治療した患者の69%～90%において90分で冠動脈を開通させる。Topol等, *Am. J. Cardiol.*, 61, 723-728 (1988)；Neuhaus等, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 12:581-587 (1988)；Neuhaus等, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 14:1566-1569 (1989)。最も高い開存率が高用量又は加速投薬療法で報告されている。Topol, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 15:922-924 (1990)。またt-PAは一回の大量瞬時投与として投与してもよく、半減期は比較的短い、注入治療により適している。Tebbe等, *Am. J. Cardiol.*, 64:448-453 (1989)。特に長い半減期と非常に高いフィブリン特異性を有するように設計されたt-PA変異体、TNK-t-PA（T103N、N117Q、KHRR（296-299）AAAA-t-PA変異体、Keyt等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3670-3674 (1994)）が大量瞬時投与に特に適している。しかしながら、これらのあらゆる進歩にもかかわらず、患者の生存率の長期間の予後は、梗塞後のモニタリングと患者の治療に大きく依存しており、それは心臓肥大のモニタリングと治療を含まなければならない。

20

30

【0018】

40

B. 成長因子

種々の天然に生じるポリペプチドは内皮細胞の増殖を誘発すると報告されている。これらのポリペプチドとしては、塩基性及び酸性の線維芽細胞増殖因子（FGF）（Burgess及びMaciag, *Annual Rev. Biochem.*, 58:575 (1989)）、血小板誘導内皮細胞成長因子（PD-ECGF）（Ishikawa等, *Nature*, 338:557 (1989)）、及び血管内皮成長因子（VEGF）を挙げることができる。Leung等, *Science*, 246:1306 (1989)；Ferrara及びHenzel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 161:851 (1989)；Tischer等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165:1198 (1989)；199

50

6年7月31日に許可された欧州特許第471, 754号。

【0019】

ヒトVEGF (hVEGF) cDNAが形質移入された細胞により馴化された培地においては、毛管内皮細胞の増殖は促進されるが、これに対し、対照細胞はそうではなかった。Leung等, *Science*, 246:1306 (1989)。hVEGFの121-、189-及び206-アミノ酸イソ型（また集合的にhVEGF関連タンパク質と称される）をコードする、いくつかの付加的なcDNAがヒトcDNAライブラリーにおいて同定されている。121-アミノ酸タンパク質はhVEGFにおける残基116と159との間の44アミノ酸が欠失している点でhVEGFとは異なる。189-アミノ酸タンパク質は、hVEGFにおける残基116における24のアミノ酸の挿入によりhVEGFとは異なり、ヒト血管浸透因子 (hVPF) と明らかに同一である。206-アミノ酸タンパク質はhVEGFの残基116における41アミノ酸の挿入によりhVEGFとは異なる。Houck等, *Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991) ; Ferrara等, *J. Cell. Biochem.*, 47:211 (1991) ; Ferrara等, *Endocrine Reviews*, 13:18 (1992) ; Keck等, *Science*, 246:1309 (1989) ; Connolly等, *J. Biol. Chem.*, 264:20017 (1989) ; 1990年5月30日に公開された欧州特許第370, 989号。

【0020】

現在では、先在する内皮からの新規な血管の形成に関連した血管新生が、種々の疾病の病原に関与していることが明確に確立されている。これらには固形腫瘍及び転移、アテローム性動脈硬化、水晶体後方線維増殖症、血管腫、慢性炎症、眼新血管新生症候群、例えば増殖性網膜症、例えば糖尿病網膜症、加齢関連性斑変性 (AMD)、新血管新生緑内障、移植角膜組織及び他の組織の免疫拒絶、慢性関節リウマチ、及び乾癬が含まれる。Folkman等, *J. Biol. Chem.*, 267:10931-10934 (1992) ; Klagsbrun等, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-239 (1991) ; 及びGarner A, "Vascular diseases". *Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach*, Garner A. Klintworth GK, eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994) 1625-1710頁。

【0021】

腫瘍成長の場合では、血管形成は、過形成から新生組織形成への変化、及び固形腫瘍の成長用の滋養物の提供に非常に重要であると思われる。Folkman等, *Nature*, 339:58 (1989)。新血管新生により、腫瘍細胞が正常細胞と比較して成長有利性と増殖自律性を獲得する。従って、腫瘍部位の微小血管密度と乳癌並びに幾つかの他の腫瘍における患者の生存率との間には相関関係が見出されている。Weidner等, *N. Engl. J. Med.* 324:1-6 (1991) ; Horak等, *Lancet*, 340:1120-1124 (1992) ; Macchiarini等, *Lancet*, 340:145-146 (1992)。

【0022】

血管形成の正の調節因子の探索により、aFGF、bFGF、TGF- α 、HGF、TNF- α 、TGF- β 、アンジオゲニン、IL-8等を含む多くの候補薬が得られている。上掲のFolkman等, *J. B. C.*, 及び上掲のKlagsbrunら。これまでに同定されている負の調節因子には、トロンボスポンジン (Good等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87:6624-6628 (1990))、プロラクチンの16-キロダルトンのN-末端フラグメント (Clapp等, *Endocrinology*, 133:1292-1299 (1993))、アンギオスタチン (angiotatin) (O'Reilly等, *Cell*, 79:315-328 (1994)) 及びエンドスタチン (endostatin) が含まれる。O'Reil

ly等, Cell, 88:277-285 (1996)。

【0023】

最近の数年間にわたってなされた研究で、血管内皮細胞の増殖を刺激するだけでなく、血管の浸透性及び血管形成を誘発する点においてもVEGFの重要な役割が確立されている。Ferrara等, Endocr. Rev., 18:4-25 (1997)。一つのVEGF対立遺伝子さえ喪失すると胎児死亡に至るという知見は、血管系の発達と分化におけるこの因子が担っている代替のない役割を示している。さらに、VEGFは腫瘍及び眼内疾患に関連した新血管新生の重要な媒介物であることが示されている。Ferrara等, Endocr. Rev., 上掲。VEGF mRNAは検査した多くのヒト腫瘍で過剰発現している。Berkman等, J. Clin. Invest., 91:153-159 (1993); Brown等, Human Pathol., 26:89-91 (1995); Brown等, Cancer Res., 53:4727-4735 (1993); Mattern等, Brit. J. Cancer, 73:931-934 (1996); Dvorak等, Am. J. Pathol., 146:1029-1039 (1995)。

【0024】

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

【0025】

抗-VEGF中和抗体は、ヌードマウスにおいて、様々なヒト腫瘍株化細胞の成長を抑制し (Kim等, Nature, 362:841-844 (1993); Warren等, J. Clin. Invest., 95:1789-1797 (1995); Borgstrom等, Cancer Res., 56:4032-4039 (1996); Melnyk等, Cancer Res., 56:921-924 (1996))、また虚血性網膜疾患のモデルにおける眼内血管形成を阻害する。Adamis等, Arch. Ophthalmol., 114:66-71 (1996)。よって、抗-VEGFモノクローナル抗体又はVEGF作用に対する他のインヒビターは、固形腫瘍及び種々の眼内新血管疾患の治療用の候補薬とされている。このような抗体は、例えば1998年1月14日に公開されたEP817, 648及び1998年10月15日に公開されたWO98/45331及びWO98/45332に記載されている。

【0026】

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

【0027】

このグループに属する高度に関連したタンパク質には、cef10 (Simmons等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1178-1182 (1989))、血清-又は血小板誘導成長因子 (PDGF) により素早く活性化されるcyr61 (O'Brien等, Mol. Cell. Biol., 10:3569-3577 (1990))、トランスフォーミング成長因子 β (TGF- β) による活性化後に

高レベルでヒト血管内皮細胞により分泌され、PDGF様の生物学的及び免疫学的活性を示し、特定の細胞表面レセプターに対してPDGFと競合するヒト結合組織成長因子（CTGF）（Bradham等，J. Cell. Biol.，114：1285-1294（1991））、fisp-12（Ryseck等，Cell Growth Differ.，2：235-233（1991））、ヒト血管IBP様成長因子（VIGF）（WO96/17931）、及び通常は成人腎臓細胞に静止され、骨髄芽球-関連ウイルスI型誘発腎芽細胞腫において過剰発現することが見出されているnovが含まれる。Joloiit等，Mol. Cell. Biol.，12：10-21（1992）。

【0028】

10

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

付加的な分裂促進因子として、インシュリン様成長因子結合タンパク質（IGFBPs）が、インシュリン様成長因子（IGF）と複合体として、線維芽細胞及び平滑筋細胞表面レセプターへのIGFの結合性を増加させるように刺激することが示されている。Clemmonsら，J. Clin. Invest.，77：1548（1986）。様々なインビトロでのIGF作用に対するIGFBPの阻害効果は、脂肪細胞によるグルコース輸送の刺激、軟骨細胞によるサルフェートの取り込み、及び線維芽細胞中へのチミジン 20の取り込みを含む。Zapf等，J. Clin. Invest.，63：1077（1979）。さらに、正常な細胞での、成長因子媒介性分裂促進因子活性におけるIGFBPの阻害効果が示されている。

【0029】

C. さらなる治療の必要性

多くの病気及び疾患における血管内皮細胞の成長及び血管形成の役割に鑑みると、これらのプロセスに起因する一又は複数の生物学的影響を低減又は抑制する手段を有していることが好ましい。また、正常及び病気の状態、特にガンにおいて病原性ポリペプチドの存在を検査する手段を有していることも望ましい。さらに、特定の側面では、心臓肥大の治療には一般的に適用できる治療法がないので、心臓ミオサイト肥大を防止又は低減可能な因子を同定することは、病態生理学的な心臓成長を阻害するための新規な治療方策の開発において非常に重要である。様々な心臓血管及び発癌遺伝子疾患のためのいくつかの治療様式が存在するが、さらなる治療的アプローチがなお必要とされている。 30

【0030】

（発明の概要）

1. 実施態様

従って、本発明は、哺乳類における血管形成及び／又は心臓血管新生を促進又は阻害するための組成物及び方法に関する。本発明は、ある種の生物学的活性の促進又は阻害を試験する種々の心臓血管アッセイにおいて陽性を試験するタンパク質の同定に基づく。従って、血管形成の促進又は阻害、血管内皮細胞成長の阻害又は刺激、血管内皮細胞の成長又は増殖の刺激、腫瘍成長の阻害、血管形成依存性組織成長の阻害、血管形成依存性組織成長の刺激、心臓肥大の阻害及び心臓肥大の刺激、例えば鬱血性心不全の治療等の効果が望まれているところでは、当該タンパク質は疾患の診断及び／又は治療（予防を含む）に有用な薬剤であると考えられる。 40

【0031】

一実施態様において、本発明は製薬的に許容される担体と混合されてPROポリペプチドを含んでなる組成物を提供する。一態様では、組成物は治療的有效量のポリペプチドを含有する。他の態様では、組成物はさらなる活性成分、すなわち、心臓血管、内皮又は血管形成薬又は血管新生抑制薬、好ましくは血管形成又は血管新生抑制薬を含有する。好ましくは組成物は無菌である。PROポリペプチドは、液状の製薬調製物の形態で投与するこ 50

とができ、これは、貯蔵安定性が延びるように保存できる。保存された液状の製薬調製物は複数回投与用のPROポリペプチドを含有していてもよく、よって繰り返し使用に適している。

【0032】

さらなる実施態様において、本発明は、製薬的に許容される担体と治療的有效量のPROポリペプチドとの混合物を含有する、心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療に有用なこのような組成物の調製方法を提供する。

さらに他の実施態様では、本発明は、製薬的に許容される担体と混合されてPROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを含有する組成物を提供する。一態様では、組成物はアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有效量を含有する。他の態様では、組成物はさらなる活性成分、すなわち、心臓血管、内皮又は血管形成薬又は血管新生抑制薬、好ましくは血管形成又は血管新生抑制薬を含有する。好ましくは組成物は無菌である。PROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストは、液状の製薬調製物の形態で投与してもよく、貯蔵時の安定性の延長が達成されるように保存されてよい。保存された液状の製薬調製物は複数投与量のPROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを含有していてもよく、よって繰り返し使用に適している。

さらなる実施態様において、本発明は、製薬的に許容される担体と、治療的有效量のPROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストとの混合物を含有する、心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療に有用なこのような組成物の調製方法を提供する。

【0033】

また他の実施態様において、本発明は、製薬的に許容される担体と混合物されて抗PRO抗体を含有する組成物に関する。一態様において、組成物は治療的有效量の抗体を含有する。他の態様において、組成物はさらなる活性成分、すなわち、心臓血管、内皮又は血管形成薬又は血管新生抑制薬、好ましくは血管形成又は血管新生抑制薬を含有する。好ましくは組成物は無菌である。組成物は、液状の製薬調製物の形態で投与してもよく、貯蔵時の安定性の延長が達成されるように保存されてもよい。保存された液状の製薬調製物は複数投与量の抗PRO抗体を含有していてもよく、よって繰り返し使用に適している。好ましい実施態様において、抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、ヒト化抗体又は一本鎖抗体である。

さらなる実施態様において、本発明は製薬的に許容される担体と、治療的有效量の抗PRO抗体を混合することを含んでなる、心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療に有用なこのような組成物を調製する方法を提供する。

【0034】

またさらなる態様において、本発明は：

(a) PROポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを含有する物質の組成物；

(b) 該組成物を収容する容器；及び

(c) 心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療における該PROポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの使用を記した、該容器に添付されるラベル又は当該容器に収納される包装挿入物を具備する製造品を提供し、前記アゴニスト又はアンタゴニストはPROポリペプチドに結合する抗体であってよい。当該組成物は、治療的有效量のPROポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを含んでいてもよい。

【0035】

他の実施態様において、本発明は、PROポリペプチドのアゴニストを同定する方法を提供し、それは：

(a) 細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、PROポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ；

(b) 前記細胞性反応の誘発を測定して、試験化合物が有効なアゴニストであるか否かを決定することを含んでなり、前記細胞性反応の誘発が前記試験化合物が有効なアゴニストであることを示す。

他の実施態様において、本発明は、P R Oポリペプチドのアゴニストを同定する方法であって、

(a) 細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、P R Oポリペプチドによる細胞増殖の刺激に適した条件下で接触させ；

(b) 前記細胞の増殖を測定して、試験化合物が有効なアゴニストであるか否かを決定することを含んでなり、当該細胞増殖の刺激が前記試験化合物が有効なアゴニストであることを示す方法を提供する。

【0036】

他の実施態様では、本発明はP R Oポリペプチドの活性を阻害する化合物の同定方法であって、試験化合物をP R Oポリペプチドと、試験化合物とポリペプチドとが相互作用するの10
のに十分な条件及び時間で接触させ、P R Oポリペプチドの活性が阻害されるか否かを測定することを含む方法を提供する。特に好ましい態様では、試験化合物又はP R Oポリペプチドのいずれかが固体支持体に固定化される。他の好ましい態様では、非固定化成分が検出可能な標識を担持する。好ましい態様では、この方法は：

(a) 細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、P R Oポリペプチドの存在下で、P R Oポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ；

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

他の好ましい態様においては、この方法は：

(a) 細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、P R Oポリペプチドの存在下で、P R Oポリペプチドによる細胞増殖の刺激に適した条件下で接触させ； 20

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

【0037】

他の実施態様では、本発明は、通常はポリペプチドを発現する細胞におけるP R Oポリペプチドの発現を阻害する化合物の同定方法であって、細胞と試験化合物とを接触させ、P R Oポリペプチドの発現が阻害されるか否かを測定することを含む方法を提供する。好ましい態様では、この方法は：

(a) 細胞とスクリーニングすべき試験化合物とをP R Oポリペプチドを発現させるのに適した条件下で接触させ； 30

(b) 前記ポリペプチドの発現の阻害を測定する工程を含む。

またさらなる実施態様では、本発明は、前述の方法により同定された化合物等の、P R Oポリペプチドの発現を阻害する化合物を提供する。

【0038】

本発明の他の態様は、前述の方法により同定されてもよいP R Oポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを対象とする。

P R Oポリペプチドの一又は複数の機能又は活性を阻害するP R Oポリペプチドのアンタゴニストの一種は抗体である。よって、他の態様では、本発明はP R Oポリペプチドに結合する単離された抗体を提供する。好ましい態様において、抗体はモノクローナル抗体であり、好ましくは非ヒト相補性決定領域(C D R)残基及びヒトフレームワーク領域(F 40
R)残基を有する。抗体は標識され、固体支持体上に固定化されていてもよい。さらなる態様では、抗体は抗体断片、一本鎖抗体、又はヒト化抗体である。好ましくは、抗体はポリペプチドに特異的に結合する。

さらなる態様において、本発明は、ポリペプチドの核酸配列における変異の有無を測定することを含む、ポリペプチドコード化核酸配列の変異に関連する病気又は病気への感染性の診断方法を提供し、該変異の有無が、病気又は病気へ感染したことを示す。

【0039】

またさらなる態様において、本発明は、哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を診断する方法であって、(a) 前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料、及び(b) 10
同じ細胞型の公知の正常組織細胞の対照試料におけるP R Oポリペプチドをコードする

遺伝子の発現レベルを分析することを含んでなり、対照試料と比較した場合の試験試料中の発現レベルの高低が、前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す方法を提供する。P R Oポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、場合によっては、対照試料と比較した際の試験試料中のm R N A又はポリペプチドのレベルの測定によってなされてもよい。

またさらなる態様において、本発明は、哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を診断する方法であって、前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料におけるポリペプチドの有無を検出することを含んでなり、前記試験試料における前記ポリペプチドの有無が前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す方法を提供する。

【0040】

またさらなる態様では、本発明は、哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を診断する方法であって、(a)前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料を抗-P R O抗体と接触させ、(b)試験試料中での前記抗体とP R Oポリペプチドとの複合体形成を検出することを含んでなり、前記複合体の形成が前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す方法を提供する。検出は、定性的でも定量的でもよく、同じ細胞型の公知の正常組織細胞の対照試料における複合体形成の監視と比較して実施してもよい。試験試料における複合体形成量の多少が、試験組織細胞を得た当該哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成不全の存在を示す。抗体は、好ましくは検出可能な標識を担持している。複合体形成は、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、又はこの分野で知られた他の技術によって監視できる。試験試料は通常、心臓血管、内皮又は血管形成疾患を持つと推定される個体から得る。

他の実施態様では、本発明は、試料中のP R Oポリペプチドの存在を測定する方法であって、P R Oポリペプチドを含有すると推測される試料を抗-P R O抗体と接触させ、前記抗体の前記試料の成分への結合を測定することを含んでなる方法を提供する。特別な態様では、当該試料はP R Oポリペプチドを含むと推定される細胞を含み、抗体は細胞に結合する。抗体は、好ましくは検出可能に標識され及び／又は固体支持体に固定化される。

【0041】

さらなる態様において、本発明は、抗-P R O抗体と担体とを適切な包装内に具備してなる心臓血管、内皮又は血管形成疾患の診断キットを提供する。好ましくは、そのようなキットは、前記抗体をP R Oポリペプチド存在検出に使用するための指示書をさらに具備する。好ましくは、担体は例えばバッファーである。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は癌である。

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

他の好ましい態様において、心臓肥大は、P G F₂ α レベルの上昇が存在することにより特徴付けられる。あるいは、心臓肥大は心筋梗塞により誘発され、ここで、好ましくはP R Oポリペプチドの投与は、心筋梗塞に続いて48時間、好ましくは24時間以内に開始される。

【0042】

他の好ましい実施態様において、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は心臓肥大であり、前記P R Oポリペプチドは心臓血管、内皮又は血管形成薬と共に投与される。この目的のために好ましい心臓血管、内皮又は血管形成薬は、抗高血圧薬、A C Eインヒビター、エンドセリンレセプターアンタゴニスト及び血栓溶解剤からなる群から選択される。血栓溶解剤が投与される場合、好ましくは、P R Oポリペプチドはこのような薬剤の投与後に投与

10

20

30

40

50

される。より好ましくは、血栓溶解剤は組換えヒト組織プラスミノゲンアクチベータである。

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

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

【0043】

さらなる実施態様において、本発明は、哺乳動物の心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療方法であって、PROポリペプチドのアゴニストの有効量を当該哺乳動物に投与することを含んでなる方法に関する。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は心臓肥大、外傷、癌、又は加齢性黄斑変性である。また好ましくは哺乳動物はヒトであり、有効量の血管形成又は血管新生抑制薬はアゴニストと共に投与される。 10

さらなる実施態様において、本発明は、哺乳動物の心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療方法であって、PROポリペプチドのアンタゴニストの有効量を哺乳動物に投与することを含んでなる方法に関する。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は心臓肥大、外傷、癌、又は加齢性黄斑変性である。また好ましくは哺乳動物はヒトであり、有効量の血管形成又は血管新生抑制薬はアンタゴニストと共に投与される。

さらなる実施態様において、本発明は、哺乳動物の心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療方法であって、抗PRO抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含んでなる方法に関する。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は心臓肥大、外傷、癌、又は加齢性黄斑変性である。また好ましくは哺乳動物はヒトであり、有効量の血管形成又は血管新生抑制薬は抗体と共に投与される。 20

【0044】

さらなる実施態様において、本発明は、心臓血管、内皮又は血管形成疾患を患っている哺乳動物の心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療方法であって、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PROポリペプチドのアンタゴニストのいずれかをコードする核酸分子を哺乳動物に投与することを含んでなる方法を提供し、ここで前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗PRO抗体であってよい。好ましい実施態様において哺乳動物はヒトである。他の好ましい実施態様において、遺伝子は、エキソビボの遺伝子治療を介して投与される。さらなる好ましい実施態様において、遺伝子はベクター、より好ましくはアデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レンチウイルス、又はレトロウイルスベクター内に包含される。 30

また他の態様では、本発明は、プロモータ、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニストポリペプチド、又は(c) PROポリペプチドのアンタゴニストポリペプチドをコードする核酸分子、及びポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列から本質的になるレトロウイルスベクターを含む組換えレトロウイルス粒子を提供し、ここでレトロウイルスベクターはレトロウイルス構造タンパク質を付随している。好ましくは、シグナル配列は哺乳動物、例えば天然PROポリペプチドからのものである。 40

また、さらなる実施態様において、本発明は、レトロウイルス構造タンパク質を発現する核酸構造体を含む、プロモータ、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニストポリペプチド、又は(c) PROポリペプチドのアンタゴニストポリペプチドをコードする核酸分子、及びポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列から本質的になるレトロウイルスベクターをさらに含有するエキソビボ産生細胞(producer cell)を提供し、ここで当該産生細胞は、組換えレトロウイルス粒子を生産させる構造タンパク質を付随するレトロウイルスベクターを包含する。

【0045】

また他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の内皮細胞の成長を阻害する方法であって、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニスト、又は(c) P 50

R Oポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなる方法を提供し、当該哺乳動物の内皮細胞の成長は阻害され、前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-P R O抗体であってよい。好ましくは、哺乳動物はヒトであり、内皮細胞の成長は腫瘍又は網膜疾患に関連している。

また他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の内皮細胞の成長を刺激する方法であって、(a) P R Oポリペプチド、(b) P R Oポリペプチドのアゴニスト、又は(c) P R Oポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなる方法を提供し、当該哺乳動物の内皮細胞の成長が刺激され、前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-P R O抗体であってよい。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

また他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の心臓肥大を阻害する方法であって、(a) P R Oポリペプチド、(b) P R Oポリペプチドのアゴニスト、又は(c) P R Oポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなる方法を提供し、前記哺乳動物の心臓肥大が阻害され、前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-P R O抗体であってよい。好ましくは、哺乳動物はヒトであり、心臓肥大は心筋梗塞によって誘発されたものである。

【0046】

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

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物においてP R Oポリペプチドにより誘発される血管形成を阻害する方法であって、当該哺乳動物に治療的有効量の抗-P R O抗体を投与することを含んでなる方法を提供する。好ましくは、哺乳動物はヒトであり、より好ましくは、哺乳動物は腫瘍又は網膜疾患を罹患している。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物においてP R Oポリペプチドにより誘発される血管形成を刺激する方法であって、当該哺乳動物に治療的有効量の抗-P R O抗体を投与することを含んでなる方法を提供する。好ましくは、哺乳動物はヒトであり、より好ましくは血管形成は組織再生又は外傷治癒を促進する。

【0047】

さらなる他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の内皮細胞の成長を阻害する方法であって、P R O 175、P R O 183、P R O 198、P R O 202、P R O 364、P R O 535、P R O 819、P R O 877、P R O 879、P R O 1002又はP R O 1304ポリペプチド又はそのアゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなり、当該哺乳動物の内皮細胞の成長は阻害される方法を提供する。

また他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の内皮細胞の成長を刺激する方法であって、P R O 356、P R O 861、P R O 1308又はP R O 1710ポリペプチド又はそのアゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなり、当該哺乳動物の内皮細胞の成長が刺激される方法を提供する。

さらに他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の内皮細胞の成長を阻害する方法であって、P R O 356、P R O 861、P R O 1308又はP R O 1710ポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなり、当該哺乳動物の内皮細胞の成長が阻害される方法を提供する。

またさらに他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の内皮細胞の成長を刺激する方法であって、P R O 175、P R O 183、P R O 198、P R O 202、P R O 364、P R O 535、P R O 819、P R O 877、P R O 879、P R O 1002又はP R O 1304ポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなり、当該哺乳動物の内皮細胞の成長は刺激される方法を提供する。

【0048】

また他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の心臓肥大を誘発する方法であって、P

PRO183、PRO200、PRO202又はPRO882ポリペプチド又はそのアゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなり、当該哺乳動物の心臓肥大が誘発される方法を提供する。

さらに他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の心臓肥大を低減する方法であって、PRO183、PRO200、PRO202又はPRO882ポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなり、当該哺乳動物の心臓肥大が低減される方法を提供する。

【0049】

また他の実施態様では、本発明は、PRO861ポリペプチドにより誘発される血管形成を阻害する方法であって、該哺乳動物に治療的有効量の抗-PRO861抗体を投与することを含んでなり、前記血管形成は阻害される方法を提供する。 10

さらに他の実施態様では、本発明は、PRO861ポリペプチドにより誘発される血管形成を刺激する方法であって、当該哺乳動物に治療的有効量の前記ポリペプチドを投与することを含んでなり、前記血管形成は刺激される方法を提供する。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物における血管形成を阻害する方法であって、該哺乳動物に治療的有効量のPRO198、PRO877、PRO1002又はPRO1304ポリペプチドを投与することを含んでなり、前記血管形成は阻害される方法を提供する。

さらに他の実施態様では、本発明は、哺乳動物における血管形成を刺激する方法であって、該哺乳動物に治療的有効量の抗-PRO198、抗-PRO877、抗-PRO1002又は抗-PRO1304ポリペプチドを投与することを含んでなり、前記血管形成は刺激される方法を提供する。 20

【0050】

2. さらなる実施態様

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

一態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示する全長アミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に同定された任意の他の断片を持つPROポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b) (a)のDNA分子の補体に対して少なくとも約80%の核酸配列同一性、又は少なくとも約81%の核酸配列同一性、又は少なくとも約82%の核酸配列同一性、又は少なくとも約83%の核酸配列同一性、又は少なくとも約84%の核酸配列同一性、又は少なくとも約85%の核酸配列同一性、又は少なくとも約86%の核酸配列同一性、又は少なくとも約87%の核酸配列同一性、又は少なくとも約88%の核酸配列同一性、又は少なくとも約89%の核酸配列同一性、又は少なくとも約90%の核酸配列同一性、又は少なくとも約91%の核酸配列同一性、又は少なくとも約92%の核酸配列同一性、又は少なくとも約93%の核酸配列同一性、又は少なくとも約94%の核酸配列同一性、又は少なくとも約95%の核酸配列同一性、又は少なくとも約96%の核酸配列同一性、又は少なくとも約97%の核酸配列同一性、又は少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして又は少なくとも約99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。 30 40

【0051】

他の態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示する全長PROポリペプチドcDNAのコード化配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くPROポリペプチドのコード化配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の膜貫通PROポリペプチドの細胞外ドメインのコード化配列、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に同定された任意の他の断片のコード化配列を持つDNA分子、又は(b) (a)のDNA分子の補体に対して少なくとも約80%の核酸配列同一性、又は少なくとも約81%の核酸配列同一性、又は少なくとも約82%の核酸配列同一性、又は少なくとも約83%の核酸配列同一性、又は少なくとも約84%の核酸配列同一性、又は少なくとも約85%の核酸配列同一性 50

、又は少なくとも約 86 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 87 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 88 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 89 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 90 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 91 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 92 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 93 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 94 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 95 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 96 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 97 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 98 % の核酸配列同一性、そして又は少なくとも約 99 % の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0052】

さらなる態様では、本発明は (a) ここに開示する ATCC に寄託されたヒトタンパク質 cDNA の任意のものにコードされるのと同じ成熟ポリペプチドをコードする DNA 分子、又は (b) (a) の DNA 分子の補体に対して少なくとも約 80 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 81 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 82 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 83 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 84 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 85 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 86 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 87 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 88 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 89 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 90 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 91 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 92 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 93 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 94 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 95 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 96 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 97 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 98 % の核酸配列同一性、そして又は少なくとも約 99 % の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。

【0053】

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインが欠失しているか又は膜貫通ドメインが不活性化されている PRO ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、又はそのようなコード化ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供し、そのようなポリペプチドの膜貫通ドメインはここに開示される。従って、ここに記載される PRO ポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考慮される。

【0054】

他の実施態様は PRO ポリペプチドコード化配列、又はその補体の断片を対象とし、それらは、例えば、場合によっては抗-PRO 抗体に対する結合部位を含むポリペプチドをコードする PRO ポリペプチドのコード化断片のハイブリッド形成プローブとして、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとしての用途が見いだされる。このような核酸断片は、通常は少なくとも約 20 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 30 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 40 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 50 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 60 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 70 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 80 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 90 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 100 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 110 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 120 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 130 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 140 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 150 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 160 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 170 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 180 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 190 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 200 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 250 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 300 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 350 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 400 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 450 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 500 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 600 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 700 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 800 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 900 ヌクレオチド長、及び又は少なくとも約 1000 ヌクレオチド長であり、ここで「約」という語の内容は参照する長さのプラス又はマイナス 10 % のヌクレオチド配列長を指すことを意味する。PRO ポリペプチドコード化ヌ

クレオチド配列の新規な断片は、多くの良く知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを用いてP R Oポリペプチドコード化ヌクレオチド配列と他の公知のヌクレオチド配列とを整列させ、いずれのP R Oポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することにより、常套的な手法で同定してもよい。このようなP R Oポリペプチドコード化ヌクレオチド配列は全てここで考慮される。また、これらのヌクレオチド分子断片、好ましくは抗-P R O抗体に対する結合部位を含むP R Oポリペプチド断片によってコードされるP R Oポリペプチド断片も考慮される。

【0055】

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

10

【0056】

ある態様では、本発明は、ここに開示する全長アミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に特定された任意の他の断片を持つP R Oポリペプチドに対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして又は少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたP R Oポリペプチドに関する。

20

【0057】

さらなる態様では、本発明は、ここに開示するA T C Cに寄託されたヒトタンパク質c D N Aの任意のものに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、又は少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして又は少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたP R Oポリペプチドに関する。

30

40

【0058】

さらなる態様では、本発明は、ここに開示する全長アミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に特定された任意の他の断片を持つP R Oポリペプチドのアミノ酸配列と比較したときに、少なくとも約80%ポジティブ、又は少なくとも約81%ポジティブ、又は少なくとも約82%ポジティブ、又は少なくとも約83%ポジティブ、又は少なくとも約84%ポジティブ、又は少なくとも約85%ポジティブ、又は少なくとも約86%ポジティブ、又は少なくとも約87%

50

ポジティブ、又は少なくとも約 88 % ポジティブ、又は少なくとも約 89 % ポジティブ、又は少なくとも約 90 % ポジティブ、又は少なくとも約 91 % ポジティブ、又は少なくとも約 92 % ポジティブ、又は少なくとも約 93 % ポジティブ、又は少なくとも約 94 % ポジティブ、又は少なくとも約 95 % ポジティブ、又は少なくとも約 96 % ポジティブ、又は少なくとも約 97 % ポジティブ、又は少なくとも約 98 % ポジティブ、そして又は少なくとも約 99 % ポジティブのスコアとされるアミノ酸配列を含む単離された P R O ポリペプチドに関する。

【0059】

特定の態様では、本発明は、N-末端シグナル配列及び／又は開始メチオニンを持たず、上記したようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされる単離された P R O ポリペプチドを提供する。それらを製造する方法もここに記載され、それらの方法は、適当なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を P R O ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養培地から P R O ポリペプチドを回収することを含む。

10

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインの欠失した又は膜貫通ドメインが不活性化された、単離された P R O ポリペプチドを提供する。それらを製造する方法もここに記載され、それらの方法は、適当なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を P R O ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養培地から P R O ポリペプチドを回収することを含む。

さらに他の実施態様では、本発明は、ここで特定される天然 P R O ポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストに関する。特別な実施態様では、アゴニスト又はアンタゴニストは抗-P R O 抗体又は小分子である。

20

さらなる実施態様では、本発明は、P R O ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法に関し、それは、P R O ポリペプチドを候補分子と接触させ、前記 P R O ポリペプチドによって媒介される生物学的活性を監視することを含む。好ましくは、P R O ポリペプチドは天然 P R O ポリペプチドである。

【0060】

またさらなる実施態様では、本発明は、P R O ポリペプチド、又はここに記載する P R O ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-P R O 抗体を、担体と組み合わせて含有する物質の組成物に関する。場合によっては、担体は製薬的に許容される担体である。

30

本発明の他の実施態様は、P R O ポリペプチド、又は上記したようなそのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-P R O 抗体の、P R O ポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニスト又は抗-P R O 抗体に起因する状態の治療において有用な医薬の調製のための使用に向けられる。

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

40

【0061】

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

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

さらに他の実施態様では、本発明は、ゲノム及び c D N A ヌクレオチド配列又はアンチセ

50

ンスプローブの単離に有用なオリゴヌクレオチドプローブを提供し、それらのプローブは上記又は下記のヌクレオチド配列の任意のものから誘導されうる。

【0062】

(発明の詳細な記載)

1. 定義

「心臓血管、内皮及び血管形成疾患」、「心臓血管、内皮及び血管形成機能不全」、「心臓血管、内皮又は血管形成疾患」及び「心臓血管、内皮又は血管形成機能不全」という用語は相互交換可能に使用され、真性糖尿病等の血管に影響を及ぼす全身疾患、並びに血管、例えば動脈、毛細管、静脈、及び／又はリンパ管それ自体の病気の一部を指す。これには、血管形成及び／又は心臓血管新生を刺激する徴候、及び血管形成及び／又は心臓血管新生を阻害する徴候が含まれている。このような疾患には、例えば動脈の病気、例えばアテローム性動脈硬化、高血圧、炎症性脈管炎、レーノー病及びレーノー現象、動脈瘤、及び動脈再狭窄；静脈及びリンパ管の疾患、例えば血栓静脈炎、リンパ管炎、及びリンパ浮腫；及び他の血管疾患、例えば末梢血管病、癌、例えば血管腫瘍、例えば血管腫（毛細管及び海綿状）、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮細胞腫、カポジ肉腫、リンパ管腫、及びリンパ管肉腫、腫瘍血管形成、外傷、例えば傷、火傷、及び他に損傷を被った組織、移植固定、瘢痕化、虚血再灌流傷害、慢性関節リュウマチ、脳血管の病気、腎臓病、例えば急性腎不全、及び骨粗鬆症が含まれる。また、アンギナ（狭心症）、心筋梗塞、例えば急性心筋梗塞、心臓肥大、及び心不全、例えばCHFも含まれる。

10

20

【0063】

ここで使用される場合の「肥大」とは、腫瘍形成に関与しない正常な成長とは無関係に組織又は構造体の大きさが増加することとして定義される。器官又は組織の肥大は個々の細胞の大きさの増加（真性肥大）、又は組織を形成する細胞数の増加（過形成）、又はその両方のいずれかによる。ある種の器官、例えば心臓は誕生後、短い期間で分割能力を失う。従って、「心臓肥大」は心臓の大きさが増加するものとして定義され、成人においては、細胞分割が付随することのない、収縮性タンパク質の含有量とミオサイトの細胞サイズの増加により特徴付けられる。肥大を刺激する原因となるストレスの特徴（例えば、プレロードの増加、アフターロードの増加、心筋梗塞の場合と同様のミオサイトの損失、収縮性の一次低下）が、反応の性質の決定において重要な役割を担っていることは明らかである。心臓肥大の初期段階は、通常、ミオフィブリンとミトコンドリアのサイズの増加、並びにミトコンドリアと核の拡大により形態学的に特徴付けられる。この段階において、筋細胞は正常なものよりもより大きくなり、細胞組織はかなり保存される。心臓肥大の段階がさらに進行すると、特定のオルガネラ、例えばミトコンドリアの数及びサイズが優先的に増加し、新規の収縮エレメントは不規則な方法で、細胞の局在領域に添加される。長年にわたって肥大を被っている細胞は、隣接するミオフィブリンを置換し、正常なZ膜レジストレーションの破壊を引き起こす、高度に分葉された膜を有する、かなり拡大した核を含む、細胞組織体におけるより明らかな分裂を示す。「心臓肥大」という用語は、根底にある心疾患に関係なく、心筋の種々の度合いの構造的ダメージにより特徴付けられる病状の進行における全ての段階を含むように使用される。よって、その用語は、心臓肥大の発達における生理学的病状、例えば血圧の上昇、大動脈狭窄、又は心筋梗塞も含む。

30

40

【0064】

「心不全」は、心臓が代謝中の組織の要求が必要とする速さで血液を送らない心機能の異常を指す。心不全は虚血、先天的、リュウマチ性又は特発的形態を含む多くの因子が原因となり得る。

「鬱血性心不全」（CHF）は、末梢組織まで酸素化された血液を送達させるために、十分な心拍出量（経時的に心臓により押し出される血液量）を供給することのできない心臓の進行性の病状である。CHFが進行すると、構造的及び血行力学的ダメージが生じる。これらのダメージは色々と現れ、一つの特徴的徴候は心室肥大である。CHFは多くの心疾患の共通した最終結果である。

50

【0065】

「心筋梗塞」は、しばしば多重冠動脈血栓症を伴う、冠動脈のアテローム性動脈硬化の結果であると一般的にされている。それは、心室壁の全厚みにわたって心筋壊死がある壁内梗塞、及び心室壁を通して心外膜に至る全ての経路に伸長することなく、壊死が内皮下層、心筋壁内、又はその両方にある副心内膜（非壁内）梗塞2つのタイプに分けることができる。心筋梗塞は血行力学的影響の変化と心臓のダメージを受けた、及び健康な領域における構造の変化の両方に原因があることが知られている。よって、例えば心筋梗塞により心臓の最大流出量及び心臓鼓動容量が低減する。また、心筋梗塞に関連して、間隙に生じるDNA合成が刺激され、影響を受けていない心臓領域におけるコラーゲンの形成が増加する。

10

【0066】

長期間にわたる高血圧において、心臓のストレス及び圧力が増加する結果、例えば全末梢耐性が増加して、心臓肥大は長期間「高血圧」を付随するようになる。慢性的に圧力が加わる結果で肥大した心室の特徴は、心拡張の実行が損なわれることである。Fouad等, J. Am. Coll. Cardiol., 4:1500-1506 (1984); Smith等, J. Am. Coll. Cardiol., 5:869-874 (1985)。長期間にわたる左心室の弛緩には、心収縮機能が正常又は通常ではないのかかわらず、早くに本能性高血圧がみられた。Hartford等, Hypertension, 6:329-338 (1984)。しかし、血圧レベルと心臓肥大との間は平行して近接していない。ヒトにおいて、抗高血圧治療に応じた左心室機能の改善は報告されているが、利尿薬（ヒドロクロチアジド）、 β -ブロッカー（プレパノロール）、又はカルシウムチャンネルブロッカー（ジルチアゼム）で治療している患者は、心拡張機能が改善されることなく左心室肥大への逆戻りがみられる。Inouye等, Am. J. Cardiol., 53:1583-7 (1984)。

20

【0067】

心臓肥大に関連した他の複合的心疾患は「肥大性心筋症」である。この病状は形態学的、機能的及び臨床的特性が非常に多様であること（Maron等, N. Engl. J. Med., 316:780-789 (1987); Spirito等, N. Engl. J. Med., 320:749-755 (1989); Louie及びEdwards, Prog. Cardiovasc. Dis., 36:275-308 (1994); Wigle等, Circulation, 92:1680-1692 (1995)）、全年齢の患者を悩ます事実により強調される異種性により特徴付けられる。Spirito等, N. Engl. J. Med., 336:775-785 (1997)。また、肥大心筋症の原因となる要因は多様であり、ほとんど理解されていない。一般的に、サルコメアタンパク質をコードする遺伝子における変異が肥大性心筋症に関与している。近年のデータでは、 β -ミオシン重鎖変異が、家族性肥大性心筋症の原因の約30から40パーセントであると計測されていることを示唆している。Watkins等, N. Engl. J. Med., 326:1108-1114 (1992); Schwartz等, Circulation, 91:532-540 (1995); Marian及びRoberts, Circulation, 92:1336-1347 (1995); Thierfelder等, Cell, 77:701-712 (1994); Watkins等, Nat. Gen., 11:434-437 (1995)。 β -ミオシン重鎖の他にも、他の位置の遺伝子変異に、心臓トロポニンT、アルファトロポニン、心臓ミオシン結合プロテインC、必須ミオシン軽鎖、及び調節性ミオシン軽鎖が含まれる。Malik及びWatkins, Curr. Opin. Cardiol., 12:295-302 (1997)を参照されたい。

30

40

【0068】

上昇「大動脈狭窄」は、上行大動脈が狭くなることにより特徴付けられる遺伝性血管疾患であるが、肺動脈を含む他の動脈もさらに影響をうけるおそれがある。未治療の大動脈狭窄では、心内圧力が増加し、結果として心臓肥大が生じ、実際には心不全及び死に至る。

50

この疾患の病因は十分には理解されていないが、中間平滑筋の過形成可能性及び肥大はこの疾患の顕著な特徴である。エラスチン遺伝子の分子変異体が大動脈狭窄の発現及び病因に関与していることが、1997年7月22日発行の米国特許第5,650,282号に報告されている。

「心臓弁逆流」は心臓弁の疾患の結果による心臓病の結果として生じる。リュウマチ熱のような種々の病気は、弁オリフィスの収縮又は引っ張りを引き起こすものであるが、他の病気は、心内膜炎、心内膜又は心房オリフィスの内側の膜の炎症、及び心臓の手術による。欠損、例えば弁狭窄又は弁の欠損近接により、心臓腔における血液の蓄積、又は弁を通過しての血液の逆流が生じる。弁狭窄又は不全を長期間治療しないと、心臓肥大や心筋に関連したダメージを被る結果となり、最終的には弁の交換が必要となる。

10

これら全て、及び心臓肥大が付随してもしなくてもよい他の心臓血管、内皮及び血管形成疾患の治療が本発明に含まれる。

【0069】

「癌」、「癌性」及び「悪性」なる用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、腺癌、リンパ腫、芽細胞腫、黒色腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃癌、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、例えば肝癌 (hepatic carcinoma) 及び肝細胞腫 (hepatoma)、膀胱癌、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮体癌、唾液腺癌、腎細胞癌及びウィルムス腫瘍等の腎臓癌、基底細胞癌、黒色腫、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、精巣癌、食道癌、及び様々な種類の頭部及び頸部の癌が含まれる。ここでの治療に好適な癌は乳癌、大腸癌、肺癌、黒色腫、卵巣癌及び上述した血管腫瘍を含むものである。

20

【0070】

ここで用いられる「細胞毒性薬」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び／又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 及び ^{186}Re ）、化学治療薬、及び細菌、真菌、植物又は動物起源の酵素活性毒素等の毒素、又はそれらの断片を含むことを意図する。

「化学治療薬」は、癌の治療に有用な化学化合物である。化学治療薬の例には、アルキル化剤、葉酸アンタゴニスト、核酸代謝の抗代謝産物、抗生物質、ピリミジン類似物、5-フルオロウラシル、シスプラチン、プリンヌクレオシド、アミン類、アミノ酸、トリアゾールヌクレオシド、又はコルチコステロイド類が含まれる。特定の例には、アドリアマイシン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（「Ara-C」）、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン、タキソール、トキソテア、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イフォスファミド、マイトマイシンC、ミトキサントン、ビンクリスチン、ビノレルビン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラマイシン（米国特許第4,675,187号参照）、メルファラン及び関連するナイトロジェンマスタードを含む。また、タモキシフェン及びオナプリストン等の腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように機能するホルモン薬もこの定義に含まれる。

30

40

【0071】

「成長阻害薬」は、ここで用いられる場合、インビトロ又はインビボで、細胞、例えばWnt-過剰発現癌細胞の成長を阻害する化合物又は組成物を指す。すなわち、成長阻害薬は、S相における悪性細胞のパーセンテージをかなり低減させるものである。成長阻害薬の例は、細胞周期の進行を（S相以外の位置で）阻止する薬剤、例えば、G1停止及びM相停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM相ブロッカーは、ビンカス（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキソール、及びトポII阻害剤、例えばドキソルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。G1停止させるこれらの薬剤は、S相停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン

50

、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル及びAra-Cである。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編集, Chapter 1, Murakamiらによる表題「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」(WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出される。さらなる例には、腫瘍壊死因子(TNF)、酸性又は塩基性FGF又は肝実質細胞成長因子(HGF)の血管形成活性を阻害又は中和可能な抗体、組織因子の凝固活性を阻害又は中和可能な抗体、プロテインC又はプロテインS(1991年2月21日に公開されたWO91/01753を参照されたい)、又はHER2レセプターに結合可能な抗体(WO89/06692)、例えば4D5抗体(及びそれらの機能的等価物)(例えばWO92/22653)が含まれる。

【0072】

「治療」とは、心臓血管、内皮及び血管形成疾患の病的状態の進行又は改変の防止を意図して行われる。治療の概念は最も広い意味に使用され、任意の段階の心臓血管、内皮及び血管形成疾患の防止(予防)、緩和、低減、及び治癒を特に含む。従って、「治療」は治癒的処置、及び予防的又は防止的手段の両方を指し、患者は心臓血管、内皮及び血管形成疾患、例えば肥大を防止又は遅延化させられる。治療が必要なものとは、既に疾患に罹っているもの、並びに疾患に罹りやすいもの又は疾患が防止されているものを含む。疾患は、特発症、心栄養性(cardiopathic)、又は筋栄養性の原因、又は虚血又は虚血発作、例えば心筋梗塞を含む、任意の原因の結果によるものである。

「慢性」投与とは、急性の態様とは異なり連続的な形で薬剤を投与し、初期の効果、例えば抗肥大効果を長時間にわたって維持することを指す。

治療の目的のための「哺乳動物」は、ヒト、家庭及び農業用動物、及び動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ブタなどを含む哺乳類に分類される任意の動物を指す。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

一又は複数のさらなる治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時(同時期)及び任意の順序での連続した投与を含む。

【0073】

「心臓血管、内皮又は血管形成薬」なる用語は、一般的に、心臓血管、内皮及び血管形成疾患の治療に作用する任意の薬剤を指す。心臓血管剤の例は、血圧、心拍数、心収縮、及び内皮及び平滑筋の生物学を調節する血管ホメオスタシスを促進するもので、全因子は心臓血管病における役割を有している。これらの特定の例には、アンギオテンシン-I Iレセプターアンタゴニスト：エンドセリンレセプターアンタゴニスト、例えばBOSENTANTM及びMOXONODINTM、インターフェロン-ガンマ(IFN- γ)；des-アスパラタート-アンギオテンシンI：血栓溶解剤、例えばストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、t-PA、及び半減期がより長く、非常に高いフィブリン特異性を有するように設計されたt-PA変異体、TNK-t-PA(T103N、N117Q、KHR(296-299)AAAA-t-PA変異体、Keyt等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3670-3674(1994))：強心薬又は昇圧薬、例えばジゴキシゲニン、及び β -アドレナリン様レセプターブロック剤、例えばプロプラノロール、チモロール、タータロロール、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロール、及びカーベジロール；アンギオテンシン転換酵素(ACE)インヒビター、例えばクイナピリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル及びリシノプリル；ジウレティクス、例えばクロロチアザイド、ヒドロクロロチアザイド、ヒドロフルメタザイド、メチルクロロチアザイド、ベンズチアザイド、ジクロロフェナミド、アセタゾラミド、及びインダパミド；及びカルシウムチャンネルブロッカー、例えばジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル、ニカルジピンが含まれる。この種の好ましい一カテゴリーは、心臓肥大、又は心臓肥大の進行における生理学的状態、例えば血圧の上昇、大動脈

狭窄又は心筋梗塞の治療に使用される治療薬である。

【0074】

「血管形成薬」及び「内皮薬」は、血管形成及び／又は内皮細胞の成長、又は適切であるならば管形成を促進する活性剤である。これには、傷の治療を促進する因子、例えば成長ホルモン、インシュリン様成長因子－I（IGF－I）、VEGF、VIGF、PDGF、表皮成長因子（EGF）、CTGF及びそのファミリーのメンバー、FGF、及びTGF－ α 及びTGF－ β が含まれる。

「血管新生抑制薬」は血管形成又は管形成を阻害、又は癌細胞の成長を阻害又は防止する活性剤である。例には、上述した血管形成剤の抗体又は他のアンタゴニスト、例えばVEGFに対する抗体が含まれる。さらに、細胞治療薬、例えば細胞毒性薬、化学治療薬、成長阻害薬、アポトーシス薬、及び癌を治療する他の薬剤、例えば抗－HER－2、抗－CD20、及び生物活性及び有機化学薬が含まれる。 10

【0075】

本発明における薬理学的意味で、活性剤、例えばPROポリペプチド、又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗－PRO抗体の「治療的有效量」とは、哺乳動物の心臓血管、内皮及び血管形成疾患の治療に有効な量を指すものであり、経験的に決定することができる。

ここで使用される場合、活性剤、例えばPROポリペプチド、又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗－PRO抗体の「有効量」とは記載した目的の実行に有効な量を指すものであり、このような量は、所望する効果に応じて経験的に決定することができる。 20

【0076】

ここで用いられる用語「PROポリペプチド」及び「PRO」は、直後に数値符号がある場合には種々のポリペプチドを指し、完全な表示（例えば、PRO／数字）は、ここに記載する特定のポリペプチド配列を意味する。ここで使用される「PRO／数字ポリペプチド」及び「PRO／数字」であって、「数字」がここで使用される実際の数値表示として与えられる用語は、天然配列ポリペプチド及びポリペプチド変異体（ここで更に詳細に定義する）を含む。ここに記載されるPROポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、組換え又は合成法によって調製してもよい。

「天然配列PROポリペプチド」は、天然由来の対応するPROポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでいる。このような天然配列PROポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生産することもできる。「天然配列PROポリペプチド」という用語には、特に、特定のPROポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態（例えば、細胞外ドメイン配列）、自然に生じる変異形態（例えば、選択的にスプライシングされた形態）及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明の種々の実施態様において、ここに開示される天然配列PROポリペプチドは、添付の図面に示される全長アミノ酸配列を含む成熟又は全長天然配列ポリペプチドである。開始及び停止コドンは、図において太字及び下線で示した。しかし、添付の図面に開示したPROポリペプチドは、図面におけるアミノ酸1としてここに命名されるメチオニン残基で始まるように示されているが、図面におけるアミノ酸位置1の上流又は下流に位置する他のメチオニン残基をPROポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いることも考えられるし可能でもある。 30 40

【0077】

PROポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ECD」は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しないPROポリペプチドの形態を指す。通常、PROポリペプチドECDは、それらの膜貫通及び／又は細胞質ドメインを1%未満、好ましくはそのようなドメインを0.5%未満しか持たない。本発明のPROポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインのいずれかの末端から約5アミノ酸を越えな 50

い可能性が高い。従って、PROポリペプチド細胞外ドメインは、場合によっては、実施例又は明細書で同定されるように膜貫通ドメイン及び／又は細胞外ドメインの境界のいずれかの側から約5又はそれ以下のアミノ酸を含んでもよく、シグナルペプチドを伴う又は伴わない、それらのポリペプチド及びそれらをコードする核酸は、本発明で考慮される。

【0078】

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

【0079】

「PROポリペプチド変異体」とは、上記又は下記に定義されるように、ここに開示された全長天然配列PROポリペプチド、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く全長天然配列PROポリペプチド配列、シグナルペプチド有無のここに開示されたPROの細胞外ドメイン又はここに開示された全長PROポリペプチドの任意の他の断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する活性PROポリペプチドを意味する。このようなPROポリペプチド変異体には、例えば、全長天然アミノ酸配列のN-又はC-末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたPROポリペプチドが含まれる。通常、PROポリペプチド変異体は、ここに開示される全長天然配列PROポリペプチド配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くPROポリペプチド配列、シグナルペプチド有無のここに開示されたPROポリペプチドの細胞外ドメイン又はここに開示された全長PROポリペプチド配列の任意の他の特に特定された断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして又は少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有している。通常は、PRO変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、又は少なくとも約20アミノ酸長、又は少なくとも約30アミノ酸長、又は少なくとも約40アミノ酸長、又は少なくとも約50アミノ酸長、又は少なくとも約60アミノ酸長、又は少なくとも約70アミノ酸長、又は少なくとも約80アミノ酸長、又は少なくとも約90アミノ酸長、又は少なくとも約100アミノ酸長、又は少なくとも約150アミノ酸長、又は少なくとも約200アミノ酸長、又は少なくとも約300アミノ酸長、又はそれ以上である。

【0080】

ここに同定されるPROポリペプチド配列に対する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、PRO配列のアミノ酸

残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegalign (DNASTAR) ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、以下に記載するように、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが表1に与えられている配列比較プログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、表1に示したソースコードは米国著作権庁、Washington D. C. , 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2はジェネンテック社、South San Francisco, Californiaを通して公に入手可能であり、また表1に与えたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0081】

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

分率X/Yの100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。%アミノ酸配列同一性の計算の例として、表2A-Bは、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「PRO」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸配列同一性の計算方法を示す。

【0082】

特に断らない限りは、ここでの全ての%アミノ酸配列同一性値は上記のようにALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%アミノ酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2 (Altschul等, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードするか、又は国立衛生研究所、Bethesda, MD. から得ることができる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全てはデフォルト値に設定され、例えば、unmask=可、鎖=全て、予測される発生=10、最小低複合長=15/5、マルチパス=0.01、マルチパスの定数=25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ=25、及びスコアリングマトリクス=BLOSUM62を含む。

【0083】

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

分率X/Yの100倍

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

さらに、%アミノ酸配列同一性値は、WU-BLAST-2コンピュータプログラム (Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)) を用いて決定してもよい。殆どのWU-BLAST-2検索パラメータはデフォルト値に設定される。デフォルト値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する: オーバーラップスパン=1、オーバーラップフラクション=0.125、ワード閾値 (T)=11、及びスコアリングマトリクス=BLSUM62。ここでの目的のために、%アミノ酸配列同一性値は、(a) 天然PROポリペプチドから誘導された配列を有する関心あるPROポリペプチドのアミノ酸配列と、関心ある比較アミノ酸配列 (即ち、関心あるPROポリペプチドが比較されるPROポリペプチド変異体であってもよい配列) との間の、WU-BLAST-2によって決定した一致する同一アミノ酸残基の数を、(b) 関心あるPROポリペプチドの残基の総数で除した商によって決定される。例えば、「アミノ酸配列Bに対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を持つ又は持っているアミノ酸配列Aを含んでなるポリペプチド」という表現では、アミノ酸配列Aが関心ある比較アミノ酸配列であり、アミノ酸配列Bが関心あるPROポリペプチドのアミノ酸配列である。

10

20

【0084】

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

30

40

【0085】

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

50

【0086】

ここに同定されるPROポリペプチドコード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、PROポリペプチドコード化配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、以下に記載するように、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが表1に与えられている配列比較プログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、表1に示したソースコードは米国著作権庁、Washington D. C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2はジェネンテック社、South San Francisco, Californiaを通して公に入手可能であり、また表1に与えたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0087】

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

分率W/Zの100倍

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

特に断らない限りは、ここでの全ての%核酸配列同一性値は上記のようにALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%核酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschul等, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードするか、又は国立衛生研究所、Bethesda, MD. から得ることができる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全てはデフォルト値に設定され、例えば、unmask=可、鎖=全て、予測される発生=10、最小低複合長=15/5、マルチパス値=0.01、マルチパスの定数=25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ=25、及びスコアリングマトリクス=BLOSUM62を含む。

【0088】

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

10

20

30

40

50

分率 W/Z の 100 倍

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

さらに、% 核酸配列同一性値は、 $WU-BLAST-2$ コンピュータプログラム ($Altschul$ 等, *Methods in Enzymology* 266: 460-480 (1996)) を用いて決定してもよい。殆どの $WU-BLAST-2$ 検索パラメータはデフォルト値に設定される。デフォルト値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する: オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値 (T) = 11、及びスコアリングマトリクス = $BLOSUM62$ 。ここでの目的のために、% 核酸配列同一性値は、(a) 天然配列 PRO ポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有する関心ある PRO ポリペプチドコード化配列核酸分子の核酸配列と、関心ある比較核酸分子 (即ち、関心ある PRO ポリペプチドコード化核酸分子の配列が比較される変異体ポリヌクレオチドであってもよい配列) との間の、 $WU-BLAST-2$ によって決定した一致する同一ヌクレオチドの数を、(b) 関心ある PRO ポリペプチドコード化核酸分子のヌクレオチドの総数で除した商によって決定される。例えば、「核酸配列 B に対して少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を持つ又は持っている核酸配列 A を含んでなる単離された核酸分子」という表現では、核酸配列 A が関心ある比較核酸配列であり、核酸配列 B が関心ある PRO ポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

【0089】

他の実施態様では、 PRO 変異体ポリヌクレオチドは、活性な PRO ポリペプチドをコードする核酸分子であり、好ましくは緊縮性ハイブリッド形成及び洗浄条件下で、本明細書又は添付図面に示した全長 PRO ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリッド形成できる。 PRO 変異体ポリペプチドは、 PRO 変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

【0090】

上記のように実施されるアミノ酸配列同一性比較の文脈における「ポジティブ (陽性)」という用語は、比較された配列において同一であるアミノ酸残基ばかりでなく類似の特性を有するものも含む。関心あるアミノ酸残基に対してポジティブ値をスコアされるアミノ酸残基は、関心あるアミノ酸残基と同一であるか、又は関心あるアミノ酸残基の (下記の表 3 に記載するように) 好ましい置換とされるものである。

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

分率 X/Y の 100 倍

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

【0091】

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために使用するとき、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。好ましくは、単離されたポリペプチドは、自然に結合する全ての成分と結合していない。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様

溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、(1) スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(2) クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEにより均一になるまで精製される。単離されたポリペプチドには、PROの自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも1つの精製工程により調製される。

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

10

【0092】

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

20

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのPROポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接していて読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

30

【0093】

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

40

ここで定義される「緊縮性条件」又は「高度の緊縮性条件」は、(1) 洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50℃において0.015Mの塩化ナトリウム/0.00

50

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

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

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

【0094】

「エピトープタグ」なる修飾詞は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したPROポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するに十分な数の残基を有しているが、その長さは融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8-50のアミノ酸残基 (好ましくは約10-約20のアミノ酸残基) を有する。30

PRO変異体における「活性な」及び「活性」とは、天然又は自然に生じるPROポリペプチドの生物学的及び／又は免疫学的活性を保持するPROタンパク質の形態を指す。ここで開示されているスクリーニングアッセイにより同定可能なPROポリペプチドに拮抗する分子 (例えば、有機又は無機小分子、ペプチド等) における「生物学的活性」とは、ここで同定されたPROポリペプチドに結合又は複合体化、又は他の細胞タンパク質とPROポリペプチドとの相互作用を干渉、又はPROポリペプチドの転写又は翻訳を阻害する分子の能力を指すときに使用される。特に好ましい生物学的活性には、血管に影響を及ぼす全身疾患、例えば真性糖尿病、並びに動脈、毛細管、静脈及び／又はリンパ管の病気、及び癌に作用する心臓肥大活性が含まれる。

【0095】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然PROポリペプチドの一又は複数の生物学的活性、例えば適切であるならば、その分裂促進又は血管形成活性を阻止、阻害、又は中和する任意の分子を含む。PROポリペプチドのアンタゴニストは、PROポリペプチドの細胞レセプターへの結合に干渉する、PROポリペプチドにより活性化される細胞を無力化又は死亡させる、又はPROポリペプチドが細胞レセプターに結合した後に血管内皮細胞の活性化に干渉することにより作用する。PROポリペプチドアンタゴニストによる仲介のこのような点の全ては、この発明の目的と等しいと考えられる。アンタゴニストは、分裂促進、血管形成、又はPROポリペプチドの他の生物学的活性を阻害し、よって、腫瘍、特に固形悪性腫瘍、慢性関節リュウマチ、乾癬、アテローム性動脈硬化、糖尿病、他の網膜症、水晶体後繊維増殖症、年齢関連性斑変性、血 50

管新生緑内障、血管腫、甲状腺過形成（グレイブス病）、角膜及び他の組織の移植、及び慢性炎症を含む、所望しない過度の新血管新生により特徴付けられる病気又は疾患の治療に有用である。また、アンタゴニストは、所望しない過度の血管浸透性により特徴付けられる病気又は疾患、例えば脳腫瘍に関連した浮腫、悪性腫瘍に関連した腹水症、メーグス症候群、肺炎、ネフローゼ症候群、心外膜液（例えば心膜炎に関連したもの）、胸膜滲出の治療に有用である。同様に「アゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然PROポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を含む。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然PROポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、有機小分子等を含む。

10

「小分子」とは、ここでは約500ダルトン以下の分子量を有するものと定義する。ここで使用される場合の「PROポリペプチドレセプター」なる用語は、PROポリペプチドの細胞性レセプター、通常は血管内皮細胞に見出される細胞表面レセプター、並びにPROポリペプチドに結合する能力を保持しているそれらの変異体を指す。

【0096】

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

20

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

30

【0097】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を指す。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域又は相補性決定領域(CDR)と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、 β シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つのCDRにより連結された β シート配置を主にとる4つのFR領域をそれぞれ含んでいる。各鎖のCDRは、FRにより近接して結合せしめられ、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している。Kabata等, N I H P u b l . N o . 9 1 - 3 2 4 2 , V o l . I , 6 4 7 - 6 6 9 頁 (1 9 9 1) を参照のこと。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害活性への抗体の関与を示す。

40

【0098】

「抗体断片」には、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域が含まれる。抗体断片の例には、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 及びFv断片；ダイアボディー(diabodies)；直鎖状抗体(Zapata等, Protein En

50

g. 8 (10) : 1057-1062 (1995)) ; 単鎖抗体分子 ; 及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。

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

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

【0099】

またF a b断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域（C H 1）を有する。F a b'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖C H 1領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でF a b断片とは異なる。F a b' - S Hは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持しているF a b'に対するここでの命名である。F (a b')₂抗体断片は、間にヒンジシステインを有するF a b'断片の対として生産された。抗体断片の他の化学結合も知られている。

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

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

【0100】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能な突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。更に、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的には含む通常の（ポリクローナル）抗体と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンによって汚染されていないハイブリドーマ培養から合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、実質的に均一な抗体集団から得られているという抗体の特徴を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、最初にK o h l l e r等、N a t u r e 256, 495 (1975)により開示されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えDNA法によって作ることができる（例えば、米国特許第4, 816, 567号参照）。また「モノクローナル抗体」は、例えばC l a c k s o n等、N a t u r e 352: 624-628 (1991)、及びM a r k sほか、J. M o l. B i o l. 222: 581-597 (1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の種由来の抗体あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか相同であり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体あるいは他の抗体クラスあるいはサブクラスに属

10

20

30

40

50

する抗体の対応する配列と同一であるか相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、並びにそれが所望の生物的活性を有する限りそれら抗体の断片を特に含む。米国特許第4,816,567号；Morrisonほか，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)。

【0101】

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはそれらの断片（例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列）であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。大部分においてヒト化抗体はレシピエントのCDRの残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFvFR残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練し、最適化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる。更なる詳細は、Jones等，Nature 321, 522-525 (1986)；Reichmann等，Nature 332, 323-329 (1988)；及びPresta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992)を参照のこと。ヒト化抗体は、抗体の抗原結合領域が、関心ある抗原でマカクザルを免疫化することにより生産された抗体から由来するプリマタイズした（PRIMATIZEDTM）抗体を含む。

【0102】

「一本鎖Fv」又は「sFv」抗体断片は、抗体のV_H及びV_Lドメインを含有するもので、これらのドメインはポリペプチド単鎖に存在する。好ましくは、Fvポリペプチドは、sFvが抗原結合に対する所望の構造を形成できるようにするポリペプチドリンカーをV_HとV_Lドメインの間に更に含んでいる。sFvのレビューには、例えば、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg及びMoore編（Springer-Verlag, New York, 1994）pp. 269-315を参照されたい。

「ダイアボディー」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を指すもので、断片は軽鎖可変ドメイン（V_L）に結合した重鎖可変ドメイン（V_H）を同じポリペプチド鎖（V_H-V_L）に含有する。同じ鎖上での二つのドメイン間の対合が許されないほど短いリンカーを使用することにより、ドメインが、他の鎖の相補的ドメインとの対合を強いられ、二つの抗原結合部位をつくりだす。ダイアボディーは、例えば、欧州特許第404,097号；国際公開93/11161号；及びHollinger等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)に更に詳しく記載されている。

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離及び／又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、その抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、（1）ローリー法（Lowry method）で測定した場合95%を越えるまで、最も好ましくは99重量%を越えるまで、（2）スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、（3）クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEにより均一に

なるまで精製される。単離された抗体には、抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

【0103】

「標識」なる語は、ここで用いられる場合、抗体に直接又は間接的に複合して「標識」抗体を生成する検出可能な化合物又は他の組成物を指す。標識は、それ自身検出可能でもよく（例えば、放射性標識又は蛍光標識）、又は酵素標識の場合、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変換を触媒してもよい。検出可能な標識として提供できる放射性核種は、例えば、I-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、At-211、Cu-67、Bi-212、及びPd-109を含む。また、標識は毒素などの検出できない物質であってもよい。 10

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

【0104】

「リボソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤からなる小型の小胞であり、哺乳動物への薬物（例えば、PROポリペプチド又はここに開示されているそれらの抗体など）の輸送に有用である。リボソームの成分は、通常は生体膜の脂質配列に類似する二層形式に配列させる。 20

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である（すなわち「異種の」）アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3又はIgG-4サブタイプ、IgA（IgA-1及びIgA-2を含む）、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。 30

【0105】

以下に示すように、表1はALIGN-2配列比較コンピュータプログラムの完全なソースコードを与える。このソースコードは、UNIXオペレーティングシステムでの使用のために日常的にコンパイルされ、ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを与える。

さらに、表2A-2Dは、ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いた%アミノ酸配列同一性（表2A-2B）及び%核酸配列同一性（表2C-2D）を決定するために下記の方法を使用する仮説的な例を示し、「PRO」は関心ある仮説的PROポリペプチドのアミノ酸配列を示し、「比較タンパク質」は関心ある「PRO」ポリペプチドが比較されるポリペプチドのアミノ酸配列を示し、「PRO-DNA」は関心ある仮説的PRO-コード化核酸配列を示し、「比較DNA」は関心ある「PRO-DNA」核酸分子が比較される核酸分子のヌクレオチド配列を示し、「X」、「Y」及び「Z」は各々異なる仮説的アミノ酸残基を示し、「N」、「L」及び「V」は各々異なる仮説的ヌクレオチドを示す。 40

【0106】

表1

```

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

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

```

10

20

表1(続き)

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

10

20

30

40

表 1 (続き)

```

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

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

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

main(ac, av)
    int ac;
    char *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '>' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file %s align.out\n", prog);
        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 jumps */
    readjumps();          /* get the actual jumps */
    print();              /* print stats, alignment */

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

```

10

main

20

30

表1(続き)

```

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

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

nw

10

20

30

40

表1(続き)

...nw

```

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

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

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

```

10

20

30

表1 (続き)

...nw

```

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

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

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

#include "nw.h"

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

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

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

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

```

10

print

20

30

40

表1(続き)

```

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

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

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

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

```

getmat

10

20

30

40

表1(続き)

```

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

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

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

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

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

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

```

...getmat

10

20

30

pr_align

40

表1(続き)

```

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

        more++;

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

            po[i]++;
            ps[i]++;

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

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

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

```

...pr_align

10

20

30

dumpblock

40

表1(続き)

...dumpblock

```

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

```

10

```

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

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

```

nums

20

30

```

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

```

putline

40

表 1(続き)

```

int          i;
register char *px;

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

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

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

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(p0[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(p0[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

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

```

...putline

stars

10

20

30

表 1(続き)

```
/*  
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()  
 */  
static  
stripname(pn)  
    char      *pn;    /* file name (may be path) */  
{  
    register char *px, *py;  
  
    py = 0;  
    for (px = pn; *px; px++)  
        if (*px == '/')  
            py = px + 1;  
    if (py)  
        (void) strcpy(pn, py);  
    return(strlen(pn));  
}
```

stripname

表1(続き)

```

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

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

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

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

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

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

```

cleanup

getseq

10

20

30

40

表 1(続き)

...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 > (flen/3);
return(pseq+4);
}

```

10

```

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

```

g_alloc

20

```

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */

```

30

```

readjumps()
{
    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--)
                ;

```

40

表 1(続き)

...readjumps

```

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

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

```

10

20

30

40

表 1(続き)

```

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

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

```

writejumps

10

【 0 1 0 7 】

表 2A

20

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

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定された2つのポリペプチド配列間の同一であると一致したアミノ酸残基数) ÷
 (PRO ポリペプチドのアミノ酸残基の全数) =

5 ÷ 15 = 33.3%

30

表 2B

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

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定された2つのポリペプチド配列間の同一であると一致したアミノ酸残基数) ÷
 (PRO ポリペプチドのアミノ酸残基の全数) =

5 ÷ 10 = 50%

40

表 2C

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

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定された2つの核酸配列間の同一であると一致したヌクレオチドの数) ÷
(PRO-DNA 核酸配列のヌクレオチドの全数) =

6 ÷ 14 = 42.9%

10

表 2D

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

% 核酸配列同一性=

(ALIGN-2によって決定された2つの核酸配列間の同一であると一致したヌクレオチドの数) ÷
(PRO-DNA 核酸配列のヌクレオチドの全数) =

4 ÷ 12 = 33.3%

20

【 0 1 0 8 】

I I . 本発明の組成物と方法

A . P R O 変異体

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

天然全長配列 P R O ポリペプチド又はここに記載した P R O ポリペプチドの種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第 5, 3 6 4, 9 3 4 号に記載されている保存的及び非保存的変異についての任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列 P R O ポリペプチドと比較して P R O ポリペプチドのアミノ酸配列が変化する P R O ポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも1つのアミノ酸の P R O ポリペプチドの一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。アミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、P R O ポリペプチドの配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸の類似した構造及び／又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては1から5のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、得られた変異体を全長又は成熟天然

30

40

50

配列により示される活性について試験することにより決定される。

【0109】

特別の実施態様では、関心ある保存的置換を、好ましい置換の項目で表3に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表3に置換例として示され、又は以下にアミノ酸分類でさらに記載する、より実質的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

表 3

元の残基	置換例	好適な置換	
Ala (A)	val; leu; ile	val	10
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	20
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	30
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	

【0110】

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

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

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

【0111】

変異は、オリゴヌクレオチド媒介（部位特異的）突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びPCR突然変異誘発等の当該分野において公知の技術を使用して作成することができる。部位指向性突然変異誘発 [Carter等, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [Wells等, Gene, 34: 315 (1985)]、制限選択突然変異誘発 [Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A, 317: 415 (1986)] 又は他の周知の技術が、PRO変異体DNAを製造するために、クローン化されたDNAに実施できる。

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham及びWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N. Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック (isotERIC) アミノ酸を用いることができる。

【0112】

B. PROポリペプチドの修飾

PROポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の1型には、PROポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、PROポリペプチドの選択された側鎖又はN-又はC-末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることが含まれる。二官能性試薬での誘導体化が、例えばPROポリペプチドを水不溶性支持体マトリクスあるいは抗-PRO抗体の精製方法又はその逆で用いるための表面に架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、1, 1-ビス (ジアゾアセチル) -2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸、3, 3'-ジチオビス (スクシンイミジルプロピオネート) 等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3- [(p-アジドフェニル)-ジチオ] プロピオイミダート等の試薬を含む。

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

【0113】

本発明の範囲内に含まれるPROポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、この目的で意図されるのは、天然配列PROポリペプチドに見られる一又は複数の炭水化物部分の欠失（存在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び／又は酵素的手段によ

るグリコシル化の削除のいずれかによる)、及び／又は天然配列PROポリペプチドに存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。さらに、この文節は、存在する種々の炭水化物部分の性質及び割合の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含む。

PROポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴ってもよい。この変更は、例えば、一又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列PROポリペプチド(O-結合グリコシル化部位)への付加、又は置換によってなされてもよい。PROアミノ酸配列は、場合によっては、DNAレベルでの変化、特に、PROポリペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることを通して変更されてもよい。

10

【0114】

PROポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。このような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に公開されたWO 87/05330、及びAplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

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

20

PROポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、PROポリペプチドの、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つへの、米国特許第4,640,835号;第4,496,689号;第4,301,144号;第4,670,417号;第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。

30

【0115】

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

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとPROポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的にはPROポリペプチドのアミノ-又はカルボキシル-末端に位置する。このようなPROポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティー精製によってPROポリペプチドを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン(poly-His)又はポリ-ヒスチジン-グリシン(poly-His-gly)タグ;flu H Aタグポリペプチド及びその抗体12CA5[Field等, Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)];c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体[Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)];及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D(gD)タグ及びその抗体[Paborsky等, Protein Engineering, 3(6): 547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド[Hopp等, BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)];KT3エピトープ

40

50

ペプチド [Martin等, Science, 255:192-194 (1992)] ; α-チューブリンエピトープペプチド [Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)] ; 及び T7 遺伝子 10 タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)] を含む。

これに換わる実施態様では、キメラ分子は PRO ポリペプチドと免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態（「イムノアドヘシン」とも呼ばれる）については、そのような融合体は Ig G 分子の Fc 領域であり得る。Ig 融合体は、好ましくは Ig 分子内の少なくとも 1 つの可変領域に換えて PRO ポリペプチドの可溶化（膜貫通ドメイン欠失又は不活性化）形態の置換を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、Ig G 1 分子のヒンジ、CH2 及び CH3、又はヒンジ、CH1、CH2 及び CH3 領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995 年 6 月 27 日発行の米国特許第 5, 428, 130 号を参照のこと。

【0116】

C. PRO ポリペプチドの調製

本発明は、本出願において PRO と称される、新規に同定及び単離されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を提供するものである。特に、PRO ポリペプチドをコードする cDNA は、以下の実施例にさらに詳細に開示するようにして同定され単離される。別々の発現ラウンドで産生されるタンパク質は異なる PRO 番号が付与されるが、UNQ 番号は任意の与えられた DNA 及びコード化タンパク質に独特であり変わることはない。しかしながら、簡単にする目的で、本明細書においては、PRO DNA にコードされるタンパク質、並びにさらなる天然相同体、及び PRO ポリペプチドの先の定義に含まれる変異体は、由来又は調製方法とは無関係に、各々「PRO」と称される。

以下の説明は、主として、PRO ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することにより PRO ポリペプチドを生産することに関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いて PRO ポリペプチドを調製することができると考えられる。例えば、PRO ポリペプチド配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい。例えば、Stewart 等, Solid-Phase Peptide Synthesis, (W. H. Freeman Co., San Francisco, CA 1969) ; Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963) 参照。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機 (Foster City, CA) を用いて、製造者の指示により実施してもよい。PRO ポリペプチドの種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的 method を用いて結合させて全長 PRO ポリペプチドを生産してもよい。

【0117】

i. PRO ポリペプチドをコードする DNA の単離

PRO ポリペプチドをコードする DNA は、PRO ポリペプチドをコードする mRNA を保有してそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製された cDNA ライブラリーから得ることができる。従って、ヒト PRO ポリペプチドをコードする DNA は、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製された cDNA ライブラリーから簡便に得ることができる。また PRO ポリペプチドをコードする遺伝子は、ゲノムライブラリーから又はオリゴヌクレオチド合成により得ることもできる。

ライブラリーは、関心ある遺伝子あるいはそれによりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ（例えば PRO ポリペプチドに対する抗体又は少なくとも約 20-80 塩基のオリゴヌクレオチド等）によってスクリーニングできる。選択されたプローブによる cDNA 又はゲノムライブラリーのスクリーニングは、例えば Sambrook 等, 上掲に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。PRO をコードする遺伝子を単離する他の方法は PCR 法を使用するものである。上掲の Sambrook 等, 上掲に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。PRO をコードする遺伝子を単離する他の方法は PCR 法を使用するものである。上掲の Sambrook 等, 上掲に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。

rook等; Dieffenbach等, PCR Primer: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)。

【0118】

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

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列は、Genbank等の公のデータベース又は個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている他の周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内又は全長配列に渡っての(アミノ酸又は核酸レベルのいずれかでの)配列同一性は、相同性を測定する種々のアルゴリズムを使用する、コンピュータソフトウェアプログラム、例えばALIGN、DNASTAR及びINHERITにより決定することができる。

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、cDNAに逆転写されなかったmRNAの生成中間体及び先駆物質を検出する上掲のSambrook等に記述されているような従来のプライマー伸展法を使用し、選択されたcDNA又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより得られる。

【0119】

i i. 宿主細胞の選択及び形質転換

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

形質移入の方法、例えば、CaPO₄処理及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションは、原核生物又は実質的な細胞壁障壁を含む他の細胞に対して一般に用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)による感染が、Shaw等, Gene, 23: 315 (1983)及び1989年6月29日公開のWO89/05859号に記載されたように、ある種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が用いられる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母中への形質転換は、典型的には、Vansolingen等, J. Bact., 130: 946 (1977)及びHsiao等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることができる。哺乳動物

細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown等, *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) 及び Mansour 等, *Nature*, 336: 348-352 (1988) を参照のこと。

【0120】

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞を含む。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294 (ATCC31, 446)；大腸菌X1776 (ATCC31, 537)；大腸菌株W3110 (ATCC27, 325) 及びK5772 (ATCC53, 635) である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、*E. coli*、エンテロバクター、エルビニア (*Erwinia*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、プロテウス (*Proteus*)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス (*Serratia marcescans*)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバシリスブチリス (*B. subtilis*) 及びバシリリチェニフォルミス (*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行のDD 266, 710に記載されたバシリリチェニフォルミス41P)、シュードモナス、例えば緑膿筋及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA産物発酵のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110は、宿主に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異をするように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型tonAを有する大腸菌W3110株1A2；完全な遺伝子型tonA ptr3を有する大腸菌W3110株9E4；完全な遺伝子型tonA prt3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompTkan^rを有する大腸菌W3110株27C7 (ATCC 55, 244)；完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (algF-lac) 169 degP ompT rbs7ilvGkan^rを有する大腸菌W3110株37D6；非カナマイシン耐性degP欠失変異を持つ37D6株である大腸菌W3110株40B4；及び1990年8月7日発行の米国特許第4, 946, 783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が適している。

【0121】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、PROコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシヤは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセスプロンブ (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, *Nature*, 290: 140 [1981]；1985年5月2日公開のEP 139, 383)；クルベロミセスホスツ (*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4, 943, 529号；Fleer等, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991))、例えばケー．ラクチス (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574；Louvenecourt等, *J. Bacteriol.* 737 [1983])、ケー．フラギリリス (*K. fragilis*) (ATCC 12, 424)、ケー．ブルガリクス (*K. bulgaricus*) (ATCC 16, 045)、ケー．ウィケラミイ (*K. wickerhamii*) (ATCC 24, 178)、ケー．ワルチイ (*K. waltii*) (ATCC 56, 500)、ケー．ドロソフィラルム (*K. drosophilum*) (ATCC 36, 906；Van den Berg等, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990))、ケー．テモトレランス (*K. thermotolerans*) 及びケー．マルキシアナス (*K. marxianus*)；ヤロウィア (*yarrowia*) (EP 402, 50

226) ; ピッチャパストリス (*Pichia pastoris*) (EP 183, 070 ; Sheekrishna等, J. Basic Microbiol, 28 : 265-278 [1988]) ; カンジダ ; トリコデルマレーシア (*reesia*) (EP 244, 234) ; アカパンカビ (Case等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 : 5259-5263 [1979]) ; シュワニオマイセス (*schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス (*occidentalis*) (1990年10月31日公開のEP 394, 538) ; 及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム (*Tolytropa*) (1991年1月10日公開のWO 91/00357) ; 及びコウジ菌、例えば偽巢性コウジ菌 (Ballance等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112 : 284-289 [1983] ; Tilburn等, Gene, 26 : 205-221 [1983] ; Yelton等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 : 1470-1474 [1984]) 及びクロカビ (Kelly及びHynes, EMBO J., 4 : 475-479 [1985]) が含まれる。ここで適切なメチロトロピック (*methylootropic*) 酵母は、これらに限られないが、ハンセンラ (*Hansenula*)、カンジダ、クロエケラ (*Kloeckera*)、ピチア (*Pichia*)、サッカロミセス、トルロプシス (*Torulopsis*)、及びロドトルラ (*Rhodotorula*) からなる属から選択されるメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylo 20

trophs, 269 (1982) に記載されている。
グリコシル化PROポリペプチドをコードする核酸の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエS2及びスポドスペラSf9等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 及びCOS細胞を含む。より特定の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株 (COS-7, ATCC CRL 1651) ; ヒト胚腎臓株 (293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36 : 59 (1977)) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞／－DHFR (CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 4216 (1980)) 30 ; マウスのセルトリ細胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23 : 243-251 (1980)) ; ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75) ; ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8065) ; 及びマウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562, ATTC CCL 51) を含む。適切な宿主細胞の選択は、当業者の技量内にある。

【0122】

i i i. 複製可能なベクターの選択及び使用

PROポリペプチドをコードする核酸 (例えば、cDNA又はゲノムDNA) は、クローニング (DNAの増幅) 又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、配列が分泌されるならば、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。 40

PROポリペプチドは組換え手法によって直接的に産生されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に 50

、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるPROポリペプチドをコードするDNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（酵母菌属（*Saccharomyces*）及びクルイベロマイシス（*Kluyveromyces*） α 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている）、又は酸ホスファターゼリーダー、白体（*C. albicans*）グルコアミラーゼリーダー（1990年4月4日公開のEP362179）、又は1990年11月15日に公開されたWO90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【0123】

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

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

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

【0124】

発現及びクローニングベクターは、通常、PROポリペプチドをコードする核酸配列に作用可能に結合し、mRNA合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識されるプロモーターがよく知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは β -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系（Cahng等, Nature, 275:615（1978）；Goeddel等, Nature, 281:544（1979））、アルカリホスファターゼ、トリプトファン（trp）プロモーター系（Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057（1980）；EP36,776）、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーター（deBoer等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25（1983））を含む。細菌系で使用するプロモーターもまたPROポリペプチドをコードするDNAと作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ（S. D.）配列を有する。

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

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

【0125】

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

より高等の真核生物によるPROポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス作用要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている (グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー (100-270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、PROポリペプチドをコードする配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

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

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

【0126】

i v. 遺伝子増幅／発現の検出

遺伝子の増幅及び／又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンブロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンブロット法 (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 50

77:5201-5205 (1980))、ドットブロット法(DNA分析)、又はインサイツハイブリッド形成法によって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。次いで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果二本鎖の表面での形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

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

【0127】

v. ポリペプチドの精製

PROポリペプチドの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-XTM 100)又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。PROポリペプチドをコードする核酸の発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。PROポリペプチドを、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される: すなわち、イオン交換カラムでの分画; エタノール沈殿; 逆相HPLC; シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAEによるクロマトグラフィー; クロマトフォーカシング; SDS-PAGE; 硫酸アンモニウム沈殿; 例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過; IgGのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラム; 及びPROポリペプチドのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutcher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, (Springer-Verlag, New York 1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定のPROポリペプチドの性質に依存する。

【0128】

D. PROポリペプチドの用途

i. 心臓血管、内皮及び血管形成活性のアッセイ

種々のアッセイがここで記載されたポリペプチドの心臓血管、内皮及び血管形成活性を試験するために使用可能である。このようなアッセイは、下記の実施例に提供されるものを含む。

米国特許第5,773,414号に開示されているエンドセリンアンタゴニスト活性を試験するアッセイには、レセプターアッセイにおけるポリペプチドのヨード化エンドセリン-I結合を阻害する能力を試験するラット心室結合アッセイ、ウサギ腎動脈平滑筋細胞を使用し、放射能標識されたエンドセリン-Iの無傷細胞結合性を試験するエンドセリンレセプター結合アッセイ、機能活性が第2のメッセンジャーの細胞内レベルを測定することにより、Rat-I細胞内で測定されるイノシトールホスファート蓄積アッセイ、雄のニュージランドウサギの内皮を使用するインビボ(単離された管)研究、及びSprague-Dawleyラットを使用するインビトロ研究において、添加化合物の、培養血管平滑筋内に放出されるエンドセリン刺激アラキドン酸を低減させる能力を測定するアラキドン酸放出アッセイが含まれる。

【0129】

10

20

30

40

50

組織生成活性のアッセイには、限定するものではないが、WO95/16035（骨、軟骨、腱）；WO95/05846（神経、ニューロン）、及びWO91/07491（皮膚、内皮）に記載されているものが含まれる。

創傷治癒活性のアッセイには、例えば、Eaglst ein及びMertz, J. Invest. Dermatol., 71:382-384 (1978)の論文で改変されている、Winter, Epidermal Wound Healing, Maibach, HI及びRovee, DT, 編 (Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago), pp71-112に記載されているものが含まれる。

エンドセリンB₁ (ETB₁) レセプターポリペプチドに結合し、シグナル変換活性を調節するPROポリペプチドに関連したテスト用分子のスクリーニングアッセイは、米国特許第5,773,223号に記載されたようにして、エンドセリンB₁ レセプターポリペプチドをコードするDNAで形質転換した宿主細胞を提供し、試験用候補薬に細胞を曝露し、エンドセリンB₁ レセプターシグナル変換活性を測定する。 10

幾つかの心臓肥大アッセイが存在する。インビトロアッセイには、成体ラット心臓ミオサイトの拡散の誘導が含まれる。このアッセイにおいて、心室ミオサイトは、Piper等, 「Adult ventricular rat heart muscle cells」, Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research. H. M. Piper, ed (Berlin: Springer-Verlag, 1990), pp. 36-60により詳細に記載されている手順を改変したものに本質的に従って、単一の（雄のSprague-Dawley）ラットから単離される。この手順により、成体心室ミオサイトの単離、及び桿体フェノタイプ細胞の長期間にわたる培養が可能になる。フェニレフリンとプロスタグランジンF_{2α} (PGF_{2α}) は、これら成体細胞の転移反応を誘発することが示されている。種々の心臓肥大の潜在的インヒビターによる、PGF_{2α} 又はPGF_{2α} 類似体（例えばフルプロステノール）及びフェニレフリンにより誘発されるミオサイト転移阻害を次いで試験する。 20

【0130】

インビボアッセイの一例は、インビボにおけるフルプロステノールにより誘発される心臓肥大の阻害をテストすることである。この薬理学的モデルは、フルプロステノール (PGF_{2α} のアゴニスト類似体) の皮下注射によりラット（例えば、雄のWistar又はSprague-Dawley）において誘発された心臓肥大を阻害するPROポリペプチドの能力を試験するものである。心筋梗塞により誘発される病的な心臓肥大のあるラットにおいて、心筋内のPGF_{2α} が検出可能なレベルまで慢性的に上昇していることが知られている。Lai等, Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.), 271:H2197-H2208 (1996)。従って、インビボでの心筋成長におけるフルプロステノールの影響を阻害可能な因子は、心臓肥大の治療に有用である可能性がある。心臓肥大におけるPROポリペプチドの効力は、PROポリペプチドを受容しないフルプロステノール処理されたラットに対する、心臓、心室及び左心室（体重により規格化）の重量を測定することにより決定される。 30

インビボアッセイの他の例は、圧力負荷心臓肥大アッセイである。インビボ試験において、試験用動物の腹部大動脈の収縮による圧力負荷心臓肥大を誘発することは共通している。典型的なプロトコルにおいて、ラット（例えば雄のWistar又はSprague-Dawley）は麻酔処理され、各ラットの腹部大動脈を横隔膜の真下まで狭窄する。Beznak M., Can. J. Biochem. Physiol., 33:985-994 (1955)。大動脈を外科的切開により曝露し、短い太針を管の隣におく。大動脈を針周囲に絹糸で結紮して収縮させ、すぐに除去し、針の直径まで大動脈の管腔を低減させる。このアプローチは、例えばRossi等, Am. Heart J., 124:700-709 (1992) 及びO'Rourke及びReibel, P. S. E. M. B., 200:95-100 (1992)に記載されている。 40

【0131】

また他のインビボアッセイにおいて、実験的に誘発された心筋梗塞（M I）に続く心臓肥大に対する効果を測定する。ラットにおいて、急性M Iを左冠動脈結紮にて誘発し、さらにこれを心電図試験で確認する。また動物の擬似操作グループを対照動物として用意する。初期のデータには、心臓肥大はM Iを有するグループに存在することが示され、体重に対し心臓重量は18%増加していることが明らかとなった。上掲のL a i等。心臓肥大の候補ブロッカー、例えばP R Oポリペプチドでこれらの動物を治療し、テストした候補薬の治療可能性についての貴重な情報を提供する。S p r a g u e - D a w l e y ラットを使用する、心臓肥大の誘発におけるさらなるアッセイテストは米国特許第5, 773, 415号に開示されている。

癌に対しては、腫瘍の病原及び進行におけるここで同定された遺伝子の役割をさらに理解し、天然P R Oポリペプチドの抗体及び他のアンタゴニスト、例えば小分子アンタゴニストを含む治療用候補薬の効力をテストするために、種々のよく知られた動物モデルを使用することができる。このようなモデルのインビボの性質は、ヒト患者に前兆となる反応を特に起こさせるものである。腫瘍及び癌（乳癌、結腸癌、前立腺癌、肺癌等）の動物モデルには、非組換え及び組換え（トランスジェニック）動物が含まれる。非組換え動物モデルには、例えば齧歯動物、例えばネズミモデルが含まれる。このようなモデルは標準的な技術、例えば皮下注射、尾静脈注射、脾臓移植、腹膜移植、腎囊下移植、又はオルソピン（o r t h o p i n）移植、例えば結腸組織に移植された結腸癌細胞を使用し、同系のマウスに腫瘍細胞を移入することにより作成することができる。例えば、1997年9月18日に公開されたP C T公開番号W O 97/33551を参照されたい。おそらくは癌遺伝子の研究に最も頻繁に使用される動物種は、免疫欠損マウス、特にヌードマウスである。胸腺刺激／形成不全を有するヌードマウスがヒト腫瘍異種移植片用の宿主として成功裡に作用するという知見はこの目的への広範な使用に導いた。常染色体劣性n u 遺伝子は、例えばA S W、A / H e、A K R、B A L B / c、B 10、L P、C 17、C H 3、C 57 B L、C 57、C B A、D B A、D D D、I / s t、N C、N F R、N F S、N F S / N、N Z B、N Z C、N Z W、P、R I I I 及びS J Lを含む、非常に多数の明確に同族のヌードマウスに導入される。さらに、ヌードマウス以外に免疫学的欠損を受け継いだ広範囲の他の動物を育て、腫瘍異種移植片のレシピエントとして使用する。さらなる詳細は、例えばThe Nude Mouse in Oncology Research, E. B o v e n及びB. W i n o g r a d. e d s. (C R C P r e s s, I n c., 1991)を参照されたい。

【0132】

このような動物に導入された細胞は周知の腫瘍／癌細胞、例えば上述にて列挙した任意の腫瘍細胞系、例えばB 104-1細胞系（n e u原腫瘍遺伝子で形質移入された安定N I H-3 T 3細胞系）；r a s-形質移入N I H-3 T 3細胞；C a c o-2（A T C C H T B-37）；又は中程度に分化したグレードI I ヒト結腸腺癌細胞系、H T-29（A T C C H T B-38）、又は腫瘍及び癌からのものを誘導可能である。腫瘍又は癌細胞のサンプルは凍結及び液体窒素での保管等を含む標準的な状態で使用され、外科手術により患者から得ることができる。K a r m a l i等, B r. J. C a n c e r. 48:689-696 (1983)。

腫瘍細胞は種々の手順によりヌードマウス等の動物に導入することができる。腫瘍の移植には、マウスの皮下（s. c.）空間が非常に適している。腫瘍は、固体ブロックとして、例えばトロカール（t r o c h a r）の使用による針バイオペシー、又は細胞懸濁液を移植することもできる。固体ブロック又はトロカール移植用に適した大きさの腫瘍組織断片が皮下空間に導入される。細胞懸濁液は一次腫瘍又は安定腫瘍細胞系から新鮮に調製され、皮下注射される。また、腫瘍細胞は皮下移植として注射することもできる。この位置において、移植片は真皮結合組織の下部と皮下組織との間に付与される。

【0133】

乳癌の動物モデルは、D r e b i n等, P r o c. N a t. A c a d. S c i. U S A, 83:9129-9133 (1986)に記載されたようにして、例えばラット

10

20

30

40

50

神経芽細胞（当初単離されたneu癌遺伝子からのもの）、又はneu-形質転換NIH-3T3細胞を、ヌードマウスに移植することにより作成することができる。

同様に、結腸癌の動物モデルは、動物、例えばヌードマウスに結腸癌細胞を通過させ、これらの動物に腫瘍を出現せしめることにより作成することができる。ヌードマウスにおけるヒト結腸癌の同所移植モデルは、例えばWang等, Cancer Research, 54:4726-4728 (1994) 及びToo等, Cancer Research, 55:681-684 (1995) により記載されている。このモデルはAntiCancer, Inc., (San Diego, California) から販売されている、いわゆる「METAMOUSETM」に基づく。

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

例えば、Meth A、CMS4、CMS5、CMS21及びWEHI-164はBALB/c雌マウス（DeLeo等, J. Exp. Med., 146:720 (1977)）の繊維肉腫を化学的に誘発し、種々の薬剤の抗腫瘍活性を研究する高度に制御されたモデル系を提供する。Palladino等, J. Immunol., 138:4023-4032 (1987)。簡単に言えば、腫瘍細胞は細胞培養におけるインビトロで増殖される。動物に注射をする前に細胞系を洗浄し、 10×10^6 から 10×10^7 細胞/mlの細胞密度でバッファーに懸濁させる。ついで、動物に10から100 μ lの細胞懸濁液を皮下注射すると、1から3週間で腫瘍が出現する。

【0134】

さらに、最も詳細に研究されている試験用腫瘍の一つであるマウスのルイス肺（3LL）癌腫を研究用腫瘍モデルとして使用することができる。この腫瘍モデルの効力は、肺の小細胞癌腫（SCCL）と診断されたヒト患者の治療における好ましい効果と相関している。この腫瘍は、病気になったマウス、又は培養されている細胞からの腫瘍断片を注射することで、正常なマウスに導入することができる。Zupi等, Br. J. Cancer, 41:suppl. 4. 30 (1980)。腫瘍が単一細胞の注射から出発して、感染した腫瘍細胞がかなりの高割合で生存しているという証拠が示された。この腫瘍モデルについてのさらなる情報は、Zacharski, Haemostasis, 16:300-320 (1986) を参照されたい。

移植腫瘍を有する動物モデルにおける試験化合物の効果を評価する方法の一つは、治療前又は後の腫瘍の大きさを測定することである。伝統的に、移植腫瘍の大きさは2又は3次元のスライドカリパスで測定される。2次元に限定する測定は腫瘍の大きさを正確に反映せず；よって通常は数式を使用し、対応する量に転換する。しかし、腫瘍サイズの測定は非常に不正確である。候補薬の治療効果は治療誘発性の成長が遅れ、特定の成長が遅れた場合に、より良好であると記載することができる。腫瘍成長の記載における他の重要な変数は腫瘍量が2倍になる時間である。また、腫瘍成長の算出及び記載のためのコンピュータプログラム、例えばRygard及びSpang-Thomsen, Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals. Wu及びSheng. eds. (Basel. 1989), p. 301により報告されているプログラムが利用できる。しかし、治療後の壊死及び炎症反応は、実際には少なくとも最初は腫瘍サイズが増加する結果となり得ることに留意されるべきである。よって、これらの変化は形態計測法とフローサイトメトリー分析を組み合わせ、注意深く監視する必要がある。

【0135】

さらに、組換え（トランスジェニック）動物モデルは、ここで同定されたPRO遺伝子のコード化部位を、関心のある動物のゲノムに導入し、トランスジェニック動物を作成する

ための標準的な技術を使用して操作することができる。トランスジェニック操作の標的として提供可能な動物には、限定するものではないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、及び非ヒト霊長類、例えばヒヒ、チンパンジー及びサルが含まれる。このような動物に導入遺伝子を導入するための、当該分野における周知の技術には、前核のマイクロ注射（米国特許第4, 873, 191号）；胚へのレトロウイルス媒介性遺伝子移動（例えば、Van der Putten等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82:6148-615 (1985)）；胚幹細胞における遺伝子を標的化（Thompson等, Cell, 56:312-321 (1989)）；胚のエレクトロポレーション（Lo, Mol. Cell. Biol., 3:1803-1814 (1983)）；及び精子媒介性遺伝子移動が含まれる。Lavitrano 10等, Cell, 57:717-73 (1989)。レビューには、例えば米国特許第4, 736, 866号を参照されたい。

本発明の目的に対して、トランスジェニック動物にはそれらの細胞の一部のみに導入遺伝子を担持するもの（「モザイク動物」）が含まれる。導入遺伝子は、単一の導入遺伝子として、又はコンカテマーとして組み込むことができ、例えば、ヘッド対ヘッド又はヘッド対テイルのタンデムで組み込むことができる。また特定の細胞系への導入遺伝子の選択的導入は、例えばLasko等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89:6232-636 (1992)の技術に従って可能である。

トランスジェニック動物における導入遺伝子の発現は通常技術により監視可能である。例えば、サザンブロット分析又はPCR増幅を導入遺伝子の統合を証明するために使用することができ、ついで、mRNAの発現レベルはインシトゥーハイブリッド形成、ノーザンブロット分析、PCR又は免疫細胞化学等の技術を使用して分析することができる。動物は腫瘍又は癌進行の徴候についてさらに試験される。 20

【0136】

また、動物の胚性細胞に導入されたPROポリペプチドをコードする変更ゲノムDNAと、PROポリペプチドをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、ここで同定されるPROポリペプチドをコードする欠陥又は変更遺伝子を有する「ノックアウト」動物を構成することができる。例えば、特定のPROポリペプチドをコードするcDNAは、確立された技術に従い、該ポリペプチドをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。特定のPROポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部を欠失したり、組み込みを監視するために使用する選択可能なマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングDNA（5'と3'末端の両方）を数キロベース含む。例えば、相同的組換えベクターについてはThomas及びCapecechi, Cell, 51:503 (1987)を参照のこと。ベクターは胚性幹細胞に（例えばエレクトロポレーションによって）導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞が選択される。例えば、Li等, Cell, 69:915 (1992)参照。選択された細胞は次に動物（例えばマウス又はラット）の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する。例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed 40（IRL, Oxford, 1987）, pp. 113-152参照。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間をおいて「ノックアウト」動物をつくり出す。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、PROポリペプチドが不在であることによるある種の病理的状态及びその病理的状态の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

【0137】

ここで同定されたPROポリペプチドに特異的に結合する抗体、及び他の候補薬の効果は、自然発症性動物腫瘍の治療においてさらに試験することができる。この研究のための適切な標的はネコ口部扁平上皮細胞癌腫（SCC）である。ネコ口部SCCは侵入性が高く 50

、この悪性腫瘍はネコにおいて最も一般的な口部悪性腫瘍とされ、口部腫瘍の60%以上がこの種において繰り返されると計測されている。それは遠くの部位にはめったに転移しないが、転移の発生率が低いのは、この腫瘍を有するネコの生存期間が短いことに反映されている。これらの腫瘍は、主としてネコの口腔の解剖学的構造により、通常外科手術により処理することができない。現在のところ、この腫瘍に対する効果的な治療はない。研究に入る前に、各々のネコを完全な臨床実験用のバイオプシーとし、コンピュータX線断層撮影（CT）によりスキャンする。舌下口部扁平上皮細胞腫瘍であると診断されたネコはこの研究から除外する。舌はこのような腫瘍の結果として麻痺し、治療により腫瘍が死亡しても、動物は自分自身で食餌することができない。各々のネコを長期間繰り返し治療する。治療期間中、腫瘍の写真を毎日取り、続いて再チェックする。治療後、各ネコを他のCTスキャンにかける。CTスキャンと胸部放射線写真を、その後8週間毎に評価する。データは、対照グループに対し、生存率、反応性及び毒性において異なっていると評価した。陽性反応は、好ましくは生存の質の改善及び／又はライフスパンの増加を伴う腫瘍退行の証拠を必要とする。

10

さらに、イヌ、ネコ及びヒヒ他の自発的動物腫瘍、例えば繊維肉腫、腺癌、リンパ腫、軟骨腫、又は平滑筋肉腫もテストすることができる。もちろん、イヌ及びネコの乳房腺癌は好ましいモデルであり、その外観及び性質はヒトのものと非常に似ている。しかし、このモデルの使用は動物におけるこの種の腫瘍の発生が希なために制限される。

また当該分野で周知の他のインビトロ及びインビボ心臓血管、内皮及び血管形成試験もここで適切である。

20

【0138】

i i . 組織分布

さらなる研究、例えば種々のヒト組織におけるmRNA発現を測定することにより、ここで心臓血管、内皮及び血管形成アッセイの結果を証明することができる。

上述したように、種々の組織における遺伝子の増幅及び／又は遺伝子の発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンブロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンブロット法（Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)）、ドットブロット法（DNA分析）、又はインサイツハイブリッド形成法によって測定することができる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。

30

あるいは、種々の組織における遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的方法、例えば組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び／又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列PROポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はPRODNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。抗体生産のための一般的な技術、及びインサイツハイブリッド形成のための特別なプロトコルは以下に提供する。

40

【0139】

i i i . 抗体結合性の研究

心臓血管、内皮及び血管形成アッセイに使用される内皮細胞又は他の細胞におけるPROポリペプチドの効果を阻害する抗-PRO抗体の能力を試験する、心臓血管、内皮及び血管形成研究の結果は、抗体結合性を研究することで証明することができる。抗体の例としては、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロ抱合体抗体が含まれ、その調製は以下に記載する。

抗体結合性の研究は任意の周知のアッセイ方法、例えば競合結合アッセイ、直接及び間接サンドイッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイ等で行われうる。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, (

50

CRC Press, Inc. 1987) pp. 147-158。

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

サンドイッチアッセイでは、検出される互いに異なる免疫原部分、又はエピトープ、又はタンパク質に結合可能な2つの抗体が使用される。サンドイッチアッセイにおいて、分析されるテスト用サンプルは、固体支持体に固定化された第1の抗体に結合し、その後、第2の抗体が分析物に結合し、よって不溶性の3部位複合体が形成される。例えば、米国特許第4,376,100号を参照されたい。第2の抗体は検出可能な部分で、それ自身が標識されてもよく（直接サンドイッチアッセイ）、又は検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を使用して測定してもよい（間接サンドイッチアッセイ）。例えば、一方の種類のサンドイッチアッセイはELISAアッセイであり、この場合、検出可能な部分は酵素である。

免疫組織化学において、組織サンプルは新鮮なものでも凍結されていても、パラフィンに埋設されていてもよく、防腐剤、例えばホルマリンで固定されていてもよい。

【0140】

i v. 細胞ベースの腫瘍アッセイ

心臓血管、内皮及び血管形成疾患、例えば腫瘍のための細胞ベースのアッセイ及び動物モデルは、ここで心臓血管、内皮及び血管形成アッセイの知見を立証し、さらに、ここで同定された遺伝子と所望しない心臓血管、内皮及び血管形成細胞成長の進行及び病因との関係を理解するために使用可能である。所望しない心臓血管、内皮及び血管形成細胞成長、例えば腫瘍の進行及び病因におけるここで同定された遺伝子産物の役割は、PROポリペプチドにより刺激又は阻害されると同定された細胞又は細胞系を使用して試験することができる。このような細胞には、例えば以下の実施例に示すものが含まれる。

異なるアプローチにおいて、特定の心臓血管、内皮及び血管形成疾患に係る周知の細胞種の細胞を、cDNAを用いて形質移入し、これらのcDNAが過度の成長を誘発するか、又は成長を阻害する能力を分析する。心臓血管、内皮及び血管形成疾患が癌である場合、適切な腫瘍細胞には、例えば安定腫瘍細胞系、例えばB104-1細胞系（neu原腫瘍遺伝子で形質移入された安定NIH-3T3細胞系）及びras-形質移入NIH-3T3細胞が含まれ、これらは所望する遺伝子を形質移入することができ、腫瘍形成成長を監視することができる。ついで、このような形質移入細胞系を使用し、ポリマー又はモノクローナル抗体又は抗体組成物が、形質移入細胞の成長における細胞増殖抑制又は細胞毒性活性を働かせることによる、又は抗体-依存性細胞性細胞毒性（ADCC）を媒介することによる腫瘍形成細胞成長を阻害する能力をテストする。さらに、ここで同定された遺伝子のコード化配列で形質移入された細胞を、心臓血管、内皮及び血管形成疾患、例えば癌の治療用の候補薬を同定するのに使用することができる。

さらに、トランスジェニック動物の腫瘍から得られた一次培地（上述に記載）を細胞ベースのアッセイに使用することができるが、安定細胞系が好ましい。トランスジェニック動物から一定の細胞系を誘導するための技術は当該分野においてよく知られている。例えばSmall等, Mol. Cell. Biol., 5:642-648 (1985)を参照されたい。

【0141】

v. 遺伝子治療

ここで、PROポリペプチド、及びポリペプチド性アゴニスト及びアンタゴニストは、これらのポリペプチドをインビボでの発現により本発明に従って用いてもよく、これはしばしば遺伝子治療と呼ばれる。

核酸（場合によってはベクター内に含まれたもの）を患者の細胞に入れるために：インビボ及びエキソビボという2つの主要な方法がある。インビボ送達では、核酸は、通常はP

10

20

30

40

50

ROポリペプチドが必要とされている部位、すなわちPROポリペプチドの合成部位、もし知られているならばPROポリペプチドの生物学的活性が必要とされる部位（例えば創傷）に、患者に直接注入される。エキソビボ処理では、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入し、修飾された細胞を患者に、直接、又は例えば患者に埋め込まれる多孔性膜にカプセル化して投与する（米国特許第4,892,538号及び第5,283,187号参照）。核酸を生細胞に導入するために利用可能な種々の技術がある。これらの技術は、核酸が培養された細胞にインビトロで移入されるか、又は対象とする宿主にインビボで移入されるかに依る。哺乳動物細胞にインビトロで核酸を移入するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などを含む。形質導入は、複製欠陥、組換えウイルス（好ましくはレトロウイルス）粒子の細胞レセプターとの結合、次いで粒子に含まれる核酸の細胞への導入を含む。遺伝子のエキソビボ送達に通常用いられるベクターはレトロウイルスである。

10

【0142】

現在インビボ核酸移入技術で好ましいのは、ウイルス又は非ウイルスベクター（アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスIウイルス、又はアデノ関連ウイルス（AAV））、及び脂質ベースの系（遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、例えば、DOTMA、DOPE、及びDC-Cholである；例えば、Tonkinson等, Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996) 参照）での形質移入を含む。遺伝子治療で使用するために最も好ましいベクターはウイルス、最も好ましくはアデノウイルス、AAV、レンチウイルス、又はレトロウイルスである。レトロウイルスベクター等のウイルスベクターは、少なくとも1つの転写プロモーター／エンハンサー又は位置決定因子、あるいは選択的スプライシング、核RNA輸出、又はメッセンジャーの翻訳後修飾などの他の手段により遺伝子発現を制御する他の因子を含む。さらに、レトロウイルスベクター等のウイルスベクターは、PROポリペプチドをコードする遺伝子の存在下で転写されたとき、それに作用可能に結合し、翻訳開始配列として機能する核酸分子を含む。このようなベクター作成物はまた、用いるウイルスに適したパッケージングシグナル、末端反復配列（LTR）又はその一部、及びポジティブ及びネガティブストランドプライマー結合部位を含む（これらがウイルスベクターに既に存在しない場合）。さらに、これらのベクターは、典型的には、それらが配置される宿主細胞からPROポリペ

20

30

【0143】

幾つかの状況では、核酸供給源に標的細胞をターゲティングする試薬、例えば細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターのリガンドなどを供給するのが望ましい。リポソームが用いられる場合、エンドサイトーシスに伴う細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質が、ターゲティング及び／又は取り込みの促進のために用いられ、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクリンにおいて内部移行を受けるタンパク質の抗体、及び細胞内局在化をターゲティングし細胞内半減期を向上させるタンパク質である。レセプター媒介エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wu等, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432 (1987)；及びWagner等, Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 3410-3414 (1990)に記載されている。現在知られている遺伝子マーキング及び遺伝子治療プロトコルの概説については、Anderson等, Science, 256: 808-813 (1992)を参照のこと。また、WO 93/256

40

50

73及びそこに引用された参考文献も参照。

好適な遺伝子治療及びレトロウイルス粒子及び構造タンパク質の作成方法は、米国特許第5,681,746号に見出される。

【0144】

v i . 診断法としての遺伝子の用途

また本発明は、診断法としてのPROポリペプチドをコードする遺伝子の用途に関する。PROポリペプチド中の変異体は腫瘍の原因であるため、変異した形態のPROポリペプチドの検出は、心臓血管、内皮及び血管形成疾患、又は心臓血管、内皮及び血管形成疾患、例えば腫瘍への感染性の診断を可能にする。

ヒトPROポリペプチドをコードする遺伝子に変異体を持つ個人は、種々の技術でDNAレベルが検出される。診断用の核酸は患者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織バイオプシー、及び検屍物質から得ることができる。ゲノムDNAは、分析の前にPCRを使用して酵素的に増幅させる(Saiki等, Nature, 324:163-166(1986))か、又は直接検出に使用することができる。RNA又はcDNAは同じ目的のために使用することができる。例として、PROポリペプチドをコードする核酸に相補的なPCRプライマーを、PROポリペプチド変異体の同定及び分析に使用することができる。例えば、欠失及び挿入は正常な遺伝子型と比較した増幅産物の大きさの変化により検出することができる。ポイントミューテーションは、PROポリペプチドをコードする放射能標識されたRNA、又はPROポリペプチドをコードする放射能標識されたアンチセンスDNA配列に対し、増幅DNAをハイブリッド形成させることにより同定することができる。好ましい適合配列はRNアーゼA消化又は溶解温度の相違により非適合二重鎖と区別することができる。

【0145】

DNA配列の相違に基づく遺伝子試験は、変性剤有又は無のゲル中でのDNA断片の電気泳動移動度の変化を検出することにより達成される。小配列の欠失及び挿入は高解像度のゲル電気泳動により可視化することができる。異なる配列のDNA断片は、変性ホルムアミジン勾配ゲルにおいて区別され、異なるDNA断片の移動は、特定の溶解又は部分的な溶解温度により、ゲルの異なる位置で阻害される。例えば、Myers等, Science, 230:1242(1985)。

また特定の位置における配列変化はヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばRNアーゼ及びSI保護、又は化学的切断方法、例えばCotton等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:4397-4401(1988)により明らかになる。

よって、特定のDNA配列の欠失はハイブリッド形成、RNアーゼ保護、化学的切断、直接DNA配列化、又は制限酵素の使用、例えば制限断片長多型(RFLP)、及びゲノムDNAのサザンブロット等の方法により達成することができる。

【0146】

v i i . PROポリペプチドレベル検出のための用途

より一般的なゲル電気泳動及びDNA配列決定に加えて、変異はインサーツ分析で検出することもできる。

PROポリペプチドをコードする核酸の発現は、腫瘍形成に関連した血管の病気又は新血管新生に関係している。PROポリペプチドがシグナル配列を有している場合は、mRNAは平滑筋細胞では少ないのに対して内皮細胞では高度に発現しており、このことはPROポリペプチドが血清中に存在していることを示している。従って、このPROポリペプチドのレベルの変化が腫瘍形成に関連した血管の病気、又は新血管新生であることを示しているために、抗PROポリペプチド抗体は、このような疾患の診断に使用することができる。

PROポリペプチドに特異的な抗体を固体支持体に付着させ、標識されたPROポリペプチド及び宿主から誘導されたサンプルを固体支持体上を通過させる競合アッセイを使用することもでき、固体支持体に付着された検出される標識の量がサンプル中のPROポリペプチドの量と相関関係がありうる。

【0147】

v i i i . 染色体マッピング

また、本発明の配列は染色体同定に対して価値がある。配列は特異的に標的とされ、個人のヒト染色体の特定の位置にハイブリッド形成させることができる。さらに、染色体の特定の部位を同定する必要性が現在ある。実際の配列データ（反復多型性）に基づいたいくつかの染色体マーキング試薬は、現在、染色体位置のマーキングに利用できる。本発明の染色体のDNAマッピングは、病気に関連した遺伝子にその配列を相関させる際の重要な第1段階である。

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

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の染色体に特定のDNAを割り当てるための迅速な手順である。本発明において同様のオリゴヌクレオチドプライマーを本発明で使用すると、サブ局所限定を、類似した方法で、大きなゲノムクロンのプール又は特定の染色体からの断片のパネルで達成することができる。同様に、その染色体へのマッピングに使用可能な他のマッピング方法には、インサイツハイブリッド形成、標識されたフローソート染色体を用いたプレススクリーニング、及び染色体特異性cDNAライブラリーを組み立てるためのハイブリッド形成によるプレ選択が含まれる。

【0148】

中期染色体展開へのcDNAクロンの蛍光インサイツハイブリッド形成(FISH)を、正確な染色体位置を一工程で提供するために使用することができる。この技術は500又は600塩基と短いcDNAで使用するができるが；2000塩基対を越える長さのクロンは、単純な検出に対して十分なシグナル強さを有する独特の染色体位置に結合する見込みが高い。FISHには、PROポリペプチドをコードする遺伝子を誘導するクロンの使用が必要であり、長くなればなる程良好になる。例えば、2000塩基対で良好であり、4000塩基対でより好ましく、4000を越えても、時間の合理的なパーセンテージの良好な結果を得るのには、おそらく必要ではない。この技術のレビューについては、Verma等、Human Chromosomes; a Manual of Basic Techniques (Pergamon Press, New York, 1988)を参照されたい。

一度、配列を厳密な染色体位置にマッピングすると、染色体上の配列の物理的位置は遺伝子地図データと相関付けられる。このようなデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryからオンラインで入手可能)に見出される。次に、同じ染色体領域にマッピングされる遺伝子と病気の関係を連鎖アッセイにより同定する（物理的に隣接する遺伝子の共同相続）。

次に、病気に罹患した又は病気に罹患しなかった個体間のcDNA又はゲノム配列における差異を測定する必要がある。変異が病気に罹患し個体の数人又は全員に見出され、正常な個体では見出されない場合、変異は病気の原因であると思われる。

物理的マッピング及び遺伝子マッピング技術の現在の解像度によれば、病気に関連した染色体領域に厳密に位置するcDNAは、50と500潜在的原因遺伝子の間の一つである（このことは、1メガベースのマッピング解像度で、20kb当たり1遺伝子であると仮定している）。

【0149】

i x . 候補薬のスクリーニングアッセイ

本発明は、PROポリペプチドを模倣する（アゴニスト）又はPROポリペプチドの効果

を阻害する（アンタゴニスト）ものを同定するための化合物のスクリーニング方法も包含する。アンタゴニスト候補薬のスクリーニングアッセイは、ここに同定した遺伝子にコードされるPROポリペプチドと結合又は複合体形成する化合物、又は他にコード化ポリペプチドと他の細胞性タンパク質との相互作用を阻害する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、それを特に小分子候補薬の同定に適したものに作る、化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングに適用可能なアッセイを含む。

このアッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ、及び細胞ベースのアッセイを含む種々の方式で実施され、それらはこの分野で良好に特徴付けされている。

アンタゴニストについての全てのアッセイは、それらが候補薬をここで同定された核酸にコードされるPROポリペプチドと、これら2つの成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間で接触させることを必要とすることにおいて共通する。

10

【0150】

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるPROポリペプチド又は候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をPROポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化されるPROポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、それを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体を使用することによって検出できる。

20

【0151】

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

30

40

50

タンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

【0152】

ここで同定されたPROポリペプチドをコードする遺伝子と細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験できる：通常は反応混合物は、遺伝子産物と細胞外又は細胞内成分を、それら2つの生成物が相互作用及び結合する条件下及び時間で含むように調製される。候補化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。さらに、プラシーボを第3の反応混合物に添加してポジティブ対照を提供してもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は細胞外成分との結合（複合体形成）は上記のように監視される。試験化合物を含有する反応混合物ではなく対照反応における複合体の形成は、試験化合物が試験化合物とその結合パートナーとの相互作用を阻害することを示す。

10

PROポリペプチドが同時有糸分裂促進物質Con Aの存在下で内皮細胞の増殖を刺激する能力を有している場合、スクリーニング方法の一例では、この能力の利点が利用される。特に、増殖アッセイにおいて、ヒト臍帯静脈内皮細胞を得、96-ウェル平底培養皿（Costar, Cambridge, MA）で培養し、細胞の増殖を容易にするのに適切な反応混合物を補い、該混合物はCon A（Calbiochem, La Jolla, CA）を含有している。Con A及びスクリーニングされる化合物を添加し、37℃でインキュベートした後、培養物を³-Hチミジンで標識し、ガラス繊維フィルター上に収集する（pH D; Cambridge Technology, Watertown, MA）。3媒体の平均³-Hチミジン取り込み（cpm）を、液体シンチレーション計測器を使用して測定する（Beckman Instruments, Irvine, CA）。有意な³-（H）チミジン混入率が内皮細胞増殖の刺激において示された。

20

【0153】

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

30

40

【0154】

これに換わるレセプター同定のアプローチとして、標識したPROポリペプチドをレセプター分子を発現する細胞膜又は抽出調製物に光親和性結合させることができる。架橋材料はPAGEに溶解させ、X線フィルムに露光する。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチド断片に分離し、タンパク質マイクロ配列決定を施すことができる。マイクロ配

50

列から得たアミノ酸配列は、推定レセプターをコードする遺伝子を同定する cDNA ライブラリーをスクリーニングする分解性オリゴヌクレオチドプローブの組の設計に用いられる。

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

心臓血管、内皮及び血管形成疾患の治療に有用な組成物には、限定するものではないが、標的遺伝子産物の活性及び／又は発現を阻害する抗体、小有機及び無機分子、ペプチド、リンペプチド、アンチセンス及びリボザイム分子、トリプルヘリックス分子が含まれる。潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンと PRO ポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリー及びモノクローナル抗体及び抗体断片、単鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが影響せず、それにより PRO ポリペプチドの作用を競合的に阻害する PRO ポリペプチドの変異形態であってもよい。

10

【0155】

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

20

30

【0156】

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

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

40

50

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

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

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

【0157】

x. 治療される心臓血管、内皮及び血管形成疾患の型

ここで記載された心臓血管、内皮及び血管形成アッセイにおいて活性を有し、及び／又はそれらの遺伝子産物が心臓血管系に位置することが見出されているPROポリペプチド又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニストは、血管に影響を及ぼす全身疾患、例えば真性糖尿病を含む種々の心臓血管、内皮及び血管形成疾患において治療用途を有していると思われる。それらの治療有効性は、動脈、毛細管、静脈、及び／又はリンパ管の病気を含みうる。以下治療例には、筋肉消耗病治療、骨粗鬆症治療、移植周囲の細胞成長を刺激するための移植固定補助、よってその意図する部位への結合を容易にするもの、組織又は血清中のIGF安定性の増加、適切であるならば、IGFレセプターへの結合性の増加（IGFがヒト骨髄赤血球及び顆粒球原種細胞の成長を高めることが、インビトロで示されているため）が含まれる。

また、PROポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストは、赤血球生成又は顆粒球生成を刺激し、傷の治癒及び組織の再生を刺激し、組織、例えば結合組織、皮膚、骨、軟骨、筋肉、肺又は腎臓の再成長に関連した治療に関連し、血管形成の促進、内皮細胞の移動を刺激又は阻害、及び血管平滑筋の成長及び内皮細胞生成を高めるために使用することができる。PROポリペプチド又はアンタゴニストにより媒介される血管形成の増加は、虚血組織と冠動脈狭窄に続く心臓の側枝冠動脈に有益である。アンタゴニストはこのようなポリペプチドの作用を阻害し、PROポリペプチドがこのような生成を促進するならば、例えば傷の治癒又は胚線維症の間に、過度の結合組織の生成を制限するために使用される。これには急性心筋梗塞及び心不全が含まれる。

【0158】

さらに、本発明は、原因にかかわらず、治療的有效量のPROポリペプチド、又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニストを投与することによる、心臓肥大の治療に関する。目的がヒト患者の治療である場合、PROポリペプチドは、好ましくは組換えヒトPROポリペプチド（rhPROポリペプチド）である。心臓肥大の治療は、心筋梗塞、高血圧、肥大性心筋症、及び心臓弁逆流を含む、多種多様な病状の結果おける、その種々の段階の任意において行うことができる。治療は、根本にある心疾患にかかわらず、心筋の構造的ダメージを有するか又は有さない、心臓肥大の進行の全ての段階に広げることができる。分子のアンタゴニストと異なり、特定の適応に対し、分子それ自身又はそのアゴニストを使用するか否かの決定は、主として、分子が心血管新生、内皮細胞の発生、又は血管形成を促進する、又はこれらの病状を阻害するか否かに依存する。例えば、分子が血管形成を促進する場合は、そのアンタゴニストは血管形成の制限又は防止が所望されている疾患の治療に有用である。このような疾病の例には、血管腫瘍、例えば血管腫、腫瘍血管形成、網膜の新血管新生、糖尿病性網膜症又は時期尚早の幼児性網膜症又は黄斑変性及び増殖性硝子体網膜症に関連した脈絡膜又は角膜、慢性関節リュウマチ、クローン病、アテローム性動脈硬化、卵巣過剰刺激、乾癬、新血管新生に関連した子宮内膜症、気球血管形成に続

く再狭窄、瘢痕組織過剰生成、例えば外科手術の後の形成されるケロイドのようなもの、心筋梗塞の後の線維症、又は胚線維症に関連した線維症障害が含まれる。

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

【0159】

他方、分子が血管形成を刺激する場合、それ自体（又はそのアゴニスト）が、例えば末梢血管病、高血圧、血管炎、レーノー病及びレーノー現象、動脈瘤、及び動脈再狭窄、血栓静脈炎、リンパ管炎、リンパ浮腫、創傷治癒及び組織の修復、虚血再灌流傷害、アンギナ、心筋梗塞、例えば急性心筋梗塞、慢性心疾患、心不全、例えば鬱血性心不全、及び骨粗鬆症等のように血管形成が望まれる適応に対して使用される。

10

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

ここでのPROポリペプチド又はそのアンタゴニストが疾患の予防、又は治療のための治療標的として、又は標的とする血管関連剤に有用なものとなる特定のタイプの病気を以下に記載する。アテローム性動脈硬化は、体液の蓄積、平滑筋細胞の増殖、及び動脈壁内の繊維組織の形成により、動脈内の厚みが増した脈管内膜にプラークが蓄積することにより特徴付けられる病気である。病気は、任意の器官において大、中及び小動脈を襲う。内皮及び血管平滑筋細胞機能の変化は、これらのプラークの蓄積及び緩和を調節する、重要な役割を担っていることが知られている。

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

20

【0160】

血管炎には、巨大細胞動脈炎、タカヤス動脈炎、多発性結節性動脈炎（細小血管障害形態を含む）、カワサキ病、微小多発性血管炎、ウェゲナー肉芽腫症、種々の感染症関連の血管疾患（Henoch-Schönlein紫斑病を含む）が含まれる。変更内皮細胞機能はこれらの病気において重要であることが示されている。

レーノー病及びレーノー現象は、冷気にさらされた手足を通して、循環の間欠性異常欠陥により特徴付けられるものである。変更内皮細胞機能がこれらの病気において重要であることが示されている。

30

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

動脈再狭窄（動脈壁再狭窄）は、内皮及び血管平滑筋細胞の増殖及び機能の変更の結果として血管形成に続いて生じる。

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

良性及び悪性血管腫瘍のファミリーは、血管系の細胞エレメントの異常な増殖及び成長により特徴付けられる。例えば、リンパ管腫は、先天的で、しばしば膀胱のリンパ系の良性腫瘍、通常新生児に生じるリンパの奇形である。膀胱腫瘍は隣接した組織内で成長する傾向にある。膀胱腫瘍は、通常、子宮頸部及び腋窩領域に生じる。また、それらは四肢の軟組織でも生じる。主たる徴候は膨張であり、時折、網状に構造化されたリンパ及び結合組織に囲まれたリンパ嚢胞である。リンパ管腫は、胎性リンパ管又はそれらの欠失に不適当に結合することに起因すると仮定されている。結果は局所的にリンパドレナージュを害している。Griener等, Lymphology, 4: 140-144 (1971)。

40

【0161】

ここでのPROポリペプチド又はそのアンタゴニストの他の用途は、成長及び／又は転移可能な腫瘍の血管新生に関与する腫瘍血管形成にある。このプロセスは新しい血管の成長に依存する。新生物及び腫瘍血管形成に係る関連した病状の例には、乳癌腫、肺癌腫、胃

50

癌腫、食道癌腫、結腸直腸癌腫、肝臓癌腫、卵巣癌腫、テコーマ、男性胚腫、子宮頸部癌腫、子宮内膜癌腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、繊維肉腫、絨毛癌、頭部及び首部の癌、鼻咽腔癌腫、喉頭癌腫、肝臓芽腫、カポジ肉腫、黒色腫、皮膚癌腫、血管腫、海面性血管腫、血管芽腫、膵臓癌腫、網膜癌腫、星状細胞腫、膠芽腫、シュワン細胞腫、乏突起膠細胞腫、髓芽腫、神経芽腫、横紋筋肉腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、尿路肉腫、甲状腺癌腫、ウィルムス腫瘍、腎細胞癌腫、前立腺癌腫、母斑症（phakomatoses）に関連した異常な血管増殖、浮腫（例えば脳腫瘍に関連したもの）、及びMeigs症候群が含まれる。

加齢性黄斑変性（AMD）は年輩者の集団における、ひどい視覚損失に至る原因である。AMDの滲出形態は脈絡膜新血管新生及び網膜色素内皮細胞剥離により特徴付けられる。脈絡膜新血管新生が予後の動的低下に関連しているため、PROポリペプチド又はそれらのアンタゴニストは、重症のAMDを低減させるのに有用であることが期待される。 10

【0162】

また、外傷の治癒、例えば傷の治癒及び組織の修復は、ここでのPROポリペプチド又はそれらのアンタゴニストが目的とする用途である。新しい血管の形成及び緩和は、本質的に組織の治癒及び修復である。この範疇には、骨、軟骨、腱、靱帯、及び／又は神経組織の成長又は再生、並びに傷の治癒及び組織の再生及び交換、及び火傷、切断、及び潰瘍の治療が含まれる。骨が正常に形成されない環境で軟骨及び／又は骨の成長を誘発するPROポリペプチド又はそのアンタゴニストは、骨折及び軟骨のダメージ、又はヒト及び他の動物の欠損の治療に適用される。PROポリペプチドまたはそのアンタゴニストを使用するこのような調製物は、骨折の低減及び人工関節の固定の改善において予防的に使用される。骨形成剤により誘発される新たな骨の形成は、先天的、外傷誘発性、又は腫瘍学的、切除誘発性頭蓋欠損の修復に寄与し、また美容形成外科においても有用である。 20

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

またさらに、PROポリペプチド又はそのアンタゴニストは、他の組織、例えば器官（例えば、膵臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚又は内皮を含む）、筋肉（平滑筋、骨格筋又は心筋）、及び血管（血管内皮を含む）組織の生成又は再生、又はこのような組織を含む細胞成長の促進活性を示し得る。所望の効果の一部は、線維性瘢痕化を阻害又は調節して、正常な組織を再生することである。 30

【0163】

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

さらに、PROポリペプチド又はそのアンタゴニストは歯周病の治療及び他の歯修復プロセスに使用することができる。このような薬剤は骨形成細胞を誘引し、骨形成細胞の成長を刺激し、又は骨形成細胞の原種の分化を誘発する環境で提供される。ここでのPROポリペプチド又はそのアンタゴニストは、血管が、骨の回転及び成長の調節において重要な役割を担っているため、骨粗鬆症又は骨関節症の、例えば骨及び／又は軟骨修復を刺激、又は炎症プロセスにより媒介される組織破壊（コラゲナーゼ活性、破骨細胞等）のプロセス又は炎症をブロックすることによる治療に有用である。 40

ここでPROポリペプチド又はそのアンタゴニストにあるとされる組織再生活性の他の範疇は、腱／靱帯形成である。組織が通常形成されない環境での腱／靱帯様組織又は他の組織形成を誘発するタンパク質は、ヒト及び他の動物の腱又は靱帯の裂け目、奇形、及びの腱又は靱帯の欠損の治療に適用される。このような調製物は、腱又は靱帯組織へのダメージの予防、並びに腱又は靱帯の骨又は他の組織への固定の改善、及び腱又は靱帯組織の欠損の修復において予防的に使用される。ここでのPROポリペプチド又はそのアンタゴニ 50

ストの組成物により誘発される新しい腱／靱帯様組織形成は、先天的、外傷誘発性、又は他の由来による腱又は靱帯のたの欠損の修復に寄与し、また腱又は靱帯の取り付け又は修復のための美容形成外科においても有用である。ここでの組成物は、腱－又は靱帯－形成細胞を誘引、腱－又は靱帯－形成細胞の成長を刺激、腱－又は靱帯－形成細胞原種の分化を誘発、又はイクスビボでの回復、インビボでの組織修復効果における腱／靱帯細胞又は原種の成長を誘発する環境で提供される。また、ここでの組成物は、腱炎、手根管症候群、及び他の腱又は靱帯欠損にも有用である。さらに組成物は、当該分野でよく知られている担体と同じ適切なマトリクス及び／又は金属イオン封鎖剤を含む。

【0164】

P R O ポリペプチド又はそのアンタゴニストは神経細胞の増殖、及び神経及び脳組織の再生、すなわち神経細胞又は神経組織の変性、死亡又は外傷に関与する中枢及び末梢神経系の病気及び神経障害、並びに機械的又は外傷的疾患の治療に有用である。特に、P R O ポリペプチド又はそのアンタゴニストは、末梢神経系の病気、例えば末梢神経損傷、末梢神経障害及び局所的神経障害、及び中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、及びシャイ・ドレーガー症候群の治療に使用される。本発明で治療されるさらなる病状には、機械的又は外傷的疾患、例えば脊髄疾患、頭部外傷及び脳血管疾患、例えば脳卒中が含まれる。また、化学療法又は他の医学的療法の結果による末梢神経障害も、P R O ポリペプチド又はそれに対するアンタゴニストを使用しての治療が可能である。

虚血－再灌流傷害は他の徴候である。内皮細胞機能不全は虚血－再灌流傷害に続いて生じる事象の後遺症の開始及び調節の両方において重要である。

慢性関節リュウマチはさらなる徴候である。血管成長及び脈管構造を通過する炎症細胞の標的は、関節炎のリュウマチ様及び血清ネガティブの形態の病因の重要な要因である。

【0165】

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

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

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

上述した観点から、内皮細胞機能、増殖及び／又は形態を変更又はこれに衝撃を与えると示されている、ここで記載されたP R O ポリペプチド、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストは、上述した多くの又は全ての疾患の原因及び病因において重要な役割を担っており、これらの疾患を標的とする血管関連剤、又はこれらのプロセスを増大又は阻害するための治療標的として提供可能であると思われる。

【0166】

x i . 投与プロトコル、スケジュール、用量及び製剤

ここに記載された分子及びそれらのアゴニスト及びアンタゴニストは、上述した種々の疾患及び病気の予防及び治療薬として製薬的に有用である。

P R O ポリペプチド又はアゴニスト又はアンタゴニストの治療用組成物は、適当な純度を持つ所望の分子を任意の製薬的に許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. 編, (1980)）と、凍結乾燥した製剤又は水溶液の形態で混合することにより調製することができる。許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤は、用

いられる投与量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンザルコニウムクロライド；ベンゼトニウムクロライド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び／又はTWEENTM、PLURONICSTM又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0167】

このような担体の更なる例は、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミン、緩衝物質、例えばリン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、塩、又は電解質、例えば硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイダルシリカ、マグネシウムトリシリケート、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質、及びプロピレングリコールを含む。局所用の担体又はアンタゴニストのゲルベースの形態は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース又はメチルセルロース等の多糖類、ポリビニルピロリドン、ポリアクリレート、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロックコポリマー、ポリエチレングリコール、及びモクロウアルコールを含む。あらゆる投与について、従来のデポー形態が好適に用いられる。このような形態は、例えば、マイクロカプセル、ナノカプセル、リポソーム、硬膏剤、吸入形態、鼻スプレー、舌下錠剤、及び除放性製剤を含む。PROポリペプチド又はアゴニスト又はアンタゴニストは、典型的にはそのような媒体中に約0.1mg/mlから100mg/mlの濃度で処方される。

【0168】

他の調製物は、形成された製品中に、PROポリペプチド又はそれらのアンタゴニストを導入して含有される。このような製品は内皮細胞の成長及び血管形成の調節に使用することができる。加えて、腫瘍侵入及び転移をこれらの製品で調節してよい。インビボ投与に用いられるPROポリペプチド又はアンタゴニストは無菌でなければならない。これは、凍結乾燥及び再形成の前又は後の滅菌濾過膜を通した濾過によって容易に達成される。PROポリペプチドは通常は凍結乾燥形態又は全身投与される場合には溶液中に貯蔵される。凍結乾燥形態にある場合、PROポリペプチド又はそのアゴニストは典型的には使用時の適当な希釈剤を含む他の成分と組み合わせて処方される。PROポリペプチド又はアンタゴニストの液体製剤の例は、無菌の、透明な、無色の生鮮溶液で、皮下注射用の1回投与バイアルに充填されている。繰り返し使用に適切な防腐製薬組成物は、例えばポリペプチドの種類及び適応に主として依存し、

- a) PROポリペプチド又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニスト；
- b) 溶液中のポリペプチド又は他の分子の安定性を最大にする範囲内のpH、好ましくは約4-8のpHを維持可能なバッファー；
- c) 主として、攪拌誘発性集合体に対しポリペプチド又は分子を安定化させる洗浄剤／界面活性剤；
- d) 等張剤；
- e) フェノール、ベンジルアルコール及びベンゼトニウムハロゲン化物、例えば塩化物の群から選択される防腐剤；及び
- f) 水；

10

20

30

40

50

を含有し得る。

【0169】

使用される洗浄剤が非イオン性であるならば、それは、例えばポリソルベート（例えば、POLYSORBATETM（TWEENTM）20、80等）、ポロキサマー（例えば、POLOXAMERTM 188等）であってよい。非イオン性界面活性剤を使用することにより、タンパク質の変性を引き起こすことなく、表面応力の剪断に調製物をさらすことができる。さらに、このような界面活性剤含有調製物は、エアゾール装置、例えば肺投与、及びニードレスジェット注入ガンに使用されるものにおいて、使用され得る（例えば、EP 257, 956を参照されたい）。

等張剤は、PROポリペプチド又はそのアンタゴニストの液体組成物を確実に等浸透圧とするために存在し、多価糖アルコール、好ましくは3価又は高級糖アルコール、例えばグリセリン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール及びマンニトールが含まれる。これらの糖アルコールは、単独で、又は組合せて使用することもできる。あるいは、塩化ナトリウム又は他の適切な無機塩を、溶液を等張にするために使用してもよい。

バッファは、所望するpHに応じて、アセタート、シタラート、スクシナート又はホスファートバッファであってよい。本発明の液体製剤のタイプのpHは、約4から8の範囲、好ましくはほぼ生理学的pHで緩衝される。

防腐剤、フェノール、ベンジルアルコール及びベンゼトニウムハロゲン化物、例えば塩化物は、使用可能な周知の抗菌薬である。

【0170】

治療用PROポリペプチド組成物は、一般的に無菌のアクセスポートを具備する容器、例えば、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針で穿孔可能なストッパーを具備するバイアルに配される。製剤は、好ましくは繰り返し静脈内（i. v.）、皮下（s. c.）、又は筋肉内（i. m.）注射として、あるいは鼻内又は肺内送達に適したエアロゾル製剤として投与される（肺内送達については、例えばEP 257, 956参照）。

また、PROポリペプチドは持続放出製剤の形態で投与することもできる。持続放出製剤の好適な例は、タンパク質を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、当該マトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、Langer等, J. Biomed Mater. Res., 15: 167-277 (1981) 及びLanger, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982) に記載されたようなポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、又はポリ（ビニルアルコール）、ポリアクチド（米国特許第3, 773, 919号、EP 58, 481）、L-グルタミン酸及びガンマエチル-L-グルタメートのコポリマー（Sidman等, Biopolymers, 22: 547-556 (1983)）、非分解性エチレン酢酸ビニル（Langer等, 上掲）、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLupron DepotTM（乳酸-グリコール酸コポリマ及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能な微小球）、及びポリ-D-（-）-3-ヒドロキシブチル酸（EP 133, 988）を含む。

【0171】

エチレン酢酸ビニルや乳酸-グリコール酸等の重合体は100日以上分子を放出できるが、特定のヒドロゲルはより短い時間タンパク質を放出する。カプセル化タンパク質は、長時間体内に残存すると、37℃で水分に曝されることで、変性又は凝集し、生理活性の喪失や免疫原生の変化のおそれがある。かかる機構によるタンパク質安定性を得るための合理的な処置が考えられる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合であることが分かたら、スルフヒドリル残基を変更し、酸性溶液から凍結乾燥し、水分量を調整し、適当な添加物を使用し、特定の重合体マトリクス化合物を開発することで安定性を達成することができる。

PROポリペプチドの持続放出組成物は、リポソーム的に封入されたPROポリペプチド

を含む。PROポリペプチドを含有するリポソームは、それ自体周知である方法、例えば、DE 3, 218, 121、Epstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985)、Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4034 (1980) ; EP 52, 322 ; EP 36, 676 ; EP 88, 046 ; EP 143, 949 ; EP 142, 641 ; 日本国特許出願第88-118008号 ; 米国特許第4, 485, 045号及び第4, 544, 545号 ; 及びEP 102, 324等による方法によって調製する。通常、リポソームは、脂質含有量が約30モル%以上コレステロールであり、選択される割合が最適な治療法に対して調整された微小(約200-800オングストローム)な単ラメラ状のものである。

10

【0172】

PROポリペプチド又はそのアンタゴニストの治療的有効量は、当然のことながら、治療(予防を含む)すべき病理学的状態、投与方法、治療に用いられる化合物の型、包含される任意の同時治療、患者の年齢、体重、一般的な医学的状态、医学的履歴などの要因によって変化し、それは担当する医師の技量の範囲内で良好に決定される。従って、治療者は、最大の治療効果が得られるように、投与量を滴定し投与経路を修正する必要がある。PROポリペプチドが狭い範囲の宿主を有しているならば、ヒトの患者の治療には、ヒトPROポリペプチド、より好ましくは天然配列ヒトPROポリペプチドを含有する調製物であることが好ましい。臨床医は投与量が当該病状の治療において所望する効果が得られるまで、PROポリペプチドを投与するであろう。例えば、目的がCHFの治療である場合、この病状に関連した進行性心臓肥大を阻害する量とされる。この治療の進行状況は、エコーカルジオグラフィーにより容易に監視される。同様に、肥大性心筋症の患者には、経験に基づいてPROポリペプチドを投与することができる。

20

上記の指針では、有効投与量は、一般的に約0.001から約1.0mg/kg、好ましくは約0.01-1.0mg/kg、最も好ましくは約0.01-0.1mg/kgの範囲内である。

【0173】

成人の高血圧の治療における非経口用途では、注射の形態で、体重1kg当たり約0.01から50mg、好ましくは約0.05から20mg、最も好ましくは1から20mgのPROポリペプチドを、静脈内注射により1日に1から3回投与するのが有利である。経口投与では、PROポリペプチドをベースとする分子を、好ましくは体重1kg当たり約5mgから1g、好ましくは約10から100mg、1日に1から3回投与する。内毒素汚染物質は、安全レベルの最小量、例えば0.5ng/mgタンパク質未満に保持すべきである。さらにヒト投与では、調製物は好ましくは滅菌され、発熱性であり、一般的に安全で、FDA Office and Biologicals standardsで要求されるようにして精製される。

30

組織再生に使用されるPROポリペプチドを含有する製薬組成物の用量計画は、ポリペプチドの作用を変える種々の要因、例えば形成が望まれる組織、ダメージを受けた部位、ダメージを受けた組織の状態、傷の大きさ、ダメージを受けた組織の種類(例えば骨)、患者の年齢、性別、食餌、感染症の重傷度、投与時間、及び他の臨床的要因を考慮して、担当する医師により決定されるであろう。用量は、再構成に使用されるマトリクスの種類、製薬組成物の他のタンパク質含有物により変わり得る。例えば、他の周知の成長因子、例えばIGF-Iを最終組成物に添加すると、さらに用量に影響を与える。進行状況は組織/骨の成長及び/又は修復を、例えばX線、組織形態測定(histomorphometric determinations)及びテトラサイクリン標識化により、定期的に評価することにより監視可能である。

40

【0174】

PROポリペプチド又はアンタゴニスト又はアゴニスト投与の経路は周知の方法に従い、例えば静脈内、筋肉内、脳内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、眼内、関節内、滑膜内、包膜内、経口、局所又は吸入経路による注射又は注入、あるいは以下に記載する持続放出系によ

50

る。またPROポリペプチド又はそれらのアンタゴニストは腫瘍内、腫瘍周辺、病巣内、又は病巣周辺経路で好適に投与され、局所的並びに全身に治療効果を発揮する。腹腔内経路は、例えば卵巣腫瘍の治療に特に有用であることが期待される。

ペプチド又は小分子がアンタゴニスト又はアゴニストとして使用される場合、好ましくは、液体又は固体の形態で経口的又は非経口的に哺乳動物に投与される。

塩を形成し下記において有用な分子の薬理学的に許容可能な塩類の例には、アルカリ金属塩（例えばナトリウム塩、カリウム塩）、アルカリ土類金属塩（例えばカルシウム塩、マグネシウム塩）、アンモニウム塩、有機塩基塩（例えばピリジン塩、トリエチルアミン塩）、無機酸塩（例えば塩酸、硫酸塩、硝酸塩）及び有機酸塩（例えば酢酸塩、シュウ酸塩、p-トルエンスルホン酸塩）が含まれる。

10

ここで記載され、骨、軟骨、腱、又は靱帯再生に有用な組成物における治療方法には、移植又は装置としての、局所的（topically）、全身的又は局部的（locally）な組成物の投与が含まれる。投与した場合、使用される治療用組成物は、発熱物質を含有しない生理学的に許容可能形態である。さらに組成物は、骨、軟骨又は組織のダメージ部位に送達される粘性のある形態で注射されるかカプセル化されることが望ましい。局所的投与は傷の治療及び組織の修復に適している。好ましくは、骨及び／又は軟骨の形成のためには、組成物は、骨及び／又は軟骨のダメージ部位にタンパク質含有組成物を送達せしめ、好ましくは体内に再吸収可能な骨及び軟骨を発育する構造体を提供することのできるマトリクスを含む。このようなマトリクスは他の移植医療用途に使用される材料で作成される。

20

【0175】

マトリクス材料の選択は、生物学的融和性、生物分解性能、機械的特性、美容的外観、及び界面活性に基づく。組成物の特定の用途は、適切な処方により定義される。組成物の潜在的マトリクスは生物分解性であり、化学的に定義される硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、及びポリ無水物であってよい。他の潜在的マトリクスは生物分解性で生物学的に明確に定義された、例えば骨又は真皮コラーゲンである。さらなるマトリクスは純粋タンパク質又は細胞外マトリクス成分からなる。他の潜在的マトリクスは、非生物分解性であり、化学的に定義された、例えば焼結ヒドロキシアパタイト、生体ガラス、アルミナート、又は他のセラミックスである。マトリクスは上述した任意の種類の材料、例えばポリ乳酸とヒドロキシアパタイト又はコラーゲンとリン酸三カルシウムの組合せからなるものであってもよい。生物セラミックは組成において、例えばカルシウム-アルミナート-ホスファートに変えてもよく、孔サイズ、粒子サイズ、粒子形状及び生物分解性能を変更するための加工が施されていてもよい。

30

特定の一実施態様では、乳酸とグリコール酸が50：50（モル重量）のコポリマーであり、150から180ミクロンの範囲の直径を有する多孔質粒子の形態である。いくつかの用途において、金属イオン封鎖剤、例えばカルボキシメチルセルロース、又は自己移植血塊を利用し、マトリクスからの分離から組成物を保護するのに有用である。

一好適なファミリーの金属イオン封鎖剤は、セルロース材料、例えばメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース及びカルボキシメチルセルロースを含むアルキルセルロース（ヒドロキシアアルキルセルロースを含む）であり、好ましくはカルボキシメチルセルロース（CMC）のカチオン塩である。他の好ましい金属イオン封鎖剤には、ヒアルロン酸、アルギニン酸ナトリウム、ポリ（エチレングリコール）、ポリオキシエチレンオキシド、カルボキシビニルポリマー、及びポリ（ビニルアルコール）が含まれる。ここで有用な金属イオン封鎖剤の量は、調製物の全量に基づき、0.5-20重量%、好ましくは1-10重量%であり、ポリマーマトリクスからのポリペプチド（又はそのアンタゴニスト）の脱着を防止し、組成物に適切な操作性を付与し、さらに原細胞のマトリクスへの浸透を防止し、よって、ポリペプチド（又はそのアンタゴニスト）に原細胞の骨形成活性を助長する機会を付与するのに必要な量である。

40

50

【0176】

x i i . 組合せ治療

当問題となる疾患の防止又は治療におけるPROポリペプチド、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの効力は、同じ組成物又は別個の組成物において、これらの目的のために有効な他の薬剤と組合せるか、又は活性剤を連続して投与することにより改善される。

例えば、心臓肥大の治療のためには、PROポリペプチド治療は、周知の心筋ミオサイト肥大因子のインヒビター、例えばフェニレフリン等の α -アドレナリンアゴニストのインヒビター；エンドセリン-Iインヒビター、例えばBOSENTAN^{T M}及びMOXONODIN^{T M}；CT-1に対するインヒビター（米国特許第5,679,545号）；LIFに対するインヒビター；ACEインヒビター；デス-アスパラタート-アンギオテンシンIインヒビター（米国特許第5,773,415号）及びアンギオテンシンIIインヒビターの投与を組合せることができる。

高血圧に関連した心臓肥大の治療のためには、PROポリペプチドを、 β -アドレナリン様レセプターブロック剤、例えばプロプラノロール、チモロール、タータロロール、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロール、又はカーベジロール；ACEインヒビター、例えばクイナピリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル又はリシノプリル；ジウレティクス、例えばクロロチアザイド、ヒドロクロロチアザイド、ヒドロフルメタザイド、メチルクロチアザイド、ベンズチアザイド、ジクロロフェナミド、アセタゾラミド、又はインダパミド；及び／又はカルシウムチャンネルブロッカー、例えばジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル又はニカルジピンと組合せて投与することができる。一般名によりここで同定された治療薬を含有する製薬用組成物は市販されており、用量、投与方法、副作用、禁忌等の製造者の使用説明書に従い投与される。例えば、Physicians' Desk Reference (Medical Economics Data Production Co.: Montvale, N. J., 1997), 51th Editionを参照されたい。

【0177】

肥大性心筋症の治療における組合せ治療用の好ましい候補薬は、 β -アドレナリン様レセプターブロック剤（例えば、プロプラノロール、チモロール、タータロロール、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロール、又はカーベジロール）、ベラパミル、ジフェジピン、又はジルチアゼムである。高血圧を伴う肥大の治療には、カルシウムチャンネルブロッカー、例えばジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル又はニカルジピン； β -アドレナリン様レセプターブロック剤；ジウレティクス、例えばクロロチアザイド、ヒドロクロロチアザイド、ヒドロフルメタザイド、メチルクロチアザイド、ベンズチアザイド、ジクロロフェナミド、アセタゾラミド、又はインダパミド；及び／又はACEインヒビター、例えばクイナピリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル又はリシノプリルを使用する、抗高血圧治療薬の使用が必要である。

他の徴候のために、PROポリペプチド又はそれらのアンタゴニストは、当該問題における骨及び／又は軟骨欠損、傷又は組織の治療に有用な他の薬剤と組合せてもよい。このような薬剤には、種々の成長因子、例えばEGF、PDGF、TGF- α 又はTGF- β 、IGF、FGF、及びCTGFが含まれる。

加えて、癌の治療に使用されるPROポリペプチド又はそれらのアンタゴニストは、上述にて特定したような細胞毒性薬、化学治療薬又は成長阻害薬と組合せられる。また癌の治療のために、PROポリペプチド又はそのアンタゴニストは適切に連続投与されるか、又は、放射活性物質の照射又は投与を含んでも含まなくても、放射線学的治療と組合せられる。

PROポリペプチド又はそのアンタゴニストと組合せて投与される治療薬の有効量は、医師又は獣医の裁量による。投与量とその調節は処理される病状に最大の治療効果が達成されるようになされる。例えば、高血圧の治療においては、これらの量は、理想的には利尿

10

20

30

40

50

薬又はジギタリスの使用、及び高血圧又は低血圧、腎損傷等を考慮に入れる。用量は、治療される特定の患者及び使用される治療薬の種類等の因子に依存する。典型的には、使用される量は、治療薬をP R Oポリペプチドと共に投与しない場合と同じ用量である。

【0178】

x i i i . 製造品

上述した疾患の診断又は治療に有用なP R Oポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを含むキットのような製造品は、少なくとも1つの容器及びラベルを具備する。適切な容器には、例えばボトル、バイアル、シリンジ及び試験管が含まれる。容器はガラス又はプラスチックのような種々の物質から形成できる。容器は、状態の診断又は治療に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針で穿孔可能なストッパーを具備する静脈液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の活性剤はP R Oポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストである。容器上又は添付されるラベルには、組成物が選択した状態の診断又は治療に使用されることが示されている。この製造品は、製薬的に許容可能なバッファー、例えばリン酸緩衝塩水、リンガー液、及びデキストロース溶液を収容した第2の容器をさらに具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用説明書を備えた包装挿入物を含む、商業的及び使用者の立場から望ましい他の材料を具備してもよい。また、この製造品は、上述の他の活性剤を収容した第2又は第3の容器を具備してもよい。

10

【0179】

E. 抗体

20

本発明で最も有望な候補薬の幾つかは、ここで同定された遺伝子の産生又は遺伝子産物を阻害及び／又は遺伝子産物の活性を低減する抗体及び抗体断片である。

i . ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫化剤、及び所望するのであればアジュバントを、一又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫化剤及び／又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫化剤は、P R Oポリペプチド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫化剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に結合させるのが有用である。このような免疫原タンパク質の例は限られないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びM P L - T D Mアジュバント（モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコラート）が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

30

【0180】

i i . モノクローナル抗体

あるいは、抗-P R O抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、K o h l e r及びM i l s t e i n, N a t u r e, 256:495 (1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用することで調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫化剤により免疫化することで、免疫化剤に特異的に結合する抗体を生成するかあるいは生成可能なリンパ球を誘発する。また、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。免疫化剤は、典型的にはP R Oポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球（「P B L」）が使用され、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する。G o d i n g, M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s : P r i n c i p l e s a n d P r a c t i c e, (New York; Academic Press, 1986) pp. 59-103。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髓腫細胞である

40

50

。通常、ラット又はマウスの骨髄腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不活化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT又はHPR T）を欠いていると、ハイブリドーマ培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプチリン及びチミジンを含み（「HAT培地」）、この物質がHGPRT欠乏性細胞の増殖を阻止する。

【0181】

好ましい不活化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不活化株化細胞はマウス骨髄腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやバージニア州マナサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髄腫及びマウスーヒト異種骨髄腫株化細胞も開示されている。Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) pp. 51-63。

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、PROポリペプチドに対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ（RIA）や酵素結合免疫測定法（ELISA）等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキッチャード分析法によって測定することができる。

【0182】

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

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

【0183】

また、モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作成することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常套的な方法を用いて（例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して）、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に配することができる、これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髄腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより（米国特許第4,816,567号; Morrison等, 上掲）、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメイ

ンに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

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

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

【0184】

i i i . ヒト及びヒト化抗体

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

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒトを源にする一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンター（winter）及び共同研究者（Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536 (1988)）の方法に従って実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体（米国特許第4,816,567号）である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

【0185】

また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリーを含むこの分野で知られた種々の技術を用いて作成することもできる。Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1992); Marks等, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)。また、Cole等及びBoerner等の方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる。Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) 及びBoerner等, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に

類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5, 545, 807号；同第5, 545, 806号；同第5, 569, 825号；同第5, 625, 126号；同第5, 633, 425号；同第5, 661, 016号、及び次の科学文献：Marks等, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992)；Lonberg等, *Nature* 368 856-859 (1994)；Morrison, *Nature* 368, 812-813 (1994)；Fishwild等, *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)；Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996)；Lonberg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995)に記載されている。

10

【0186】

iv. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本ケースの場合において、結合特異性の一方はPROポリペプチドに対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現に基づく。Milstein及びCuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ（クアドローマ）は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のWO 93/08829、及びTraunecker等, *EMBO J.*, 10: 3655-3656 (1991)に開示されている。

20

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

30

【0187】

v. ヘテロ抱合抗体

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

40

【0188】

vi. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌治療における抗体の有効性を向上させるのが望ましい。例えば、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させるようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上した内部移行能力及び／又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗

50

体—依存性細胞毒性 (ADCC) を有しうる。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992) 及び Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992) 参照。向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体はまた、Wolf等, Cancer research 53: 2560-2565 (1993) に記載されたような異種二官能性架橋を用いても調製しうる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989) 参照。

【0189】

vii. 免疫抱合体

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

このような免疫抱合体の生成に有用な化学治療薬は上記した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、（緑膿菌からの）外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン (modecicin) A鎖、アルファーサルシン、アレウリテス・フォーディ (Aleurites fordii) タンパク質、ジアンチン (dianthin) タンパク質、フィトラカ・アメリカナ (Phytolacca americana) タンパク質 (PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア (momordica charantia) インヒビター、クルシン (curcumin)、クロチン (crotonin)、サパオナリア・オフィシナリス (saponaria officinalis) インヒビター、ゲロニン (gellonin)、ミトゲリン (mitogellin)、レストリクトシン (restrictocin)、フェノマイシン (phenomycin)、エノマイシン (enomycin) 及びトリコテセン (tricothecene) を含む。様々な放射性ヌクレオチドが放射性抱合抗体の生成に利用可能である。例として、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及び ^{186}Re を含む。

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

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

【0190】

viii. 免疫リポソーム

また、ここに開示する抗体は、免疫リポソームとして調製してもよい。抗体を含むリポソームは、Epstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第4, 485, 045

10

20

30

40

50

号及び第4, 544, 545号に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5, 013, 556号に開示されている。

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

10

【0191】

ix. 抗体の製薬組成物

ここで同定されるPROポリペプチドに特異的に結合する抗体、並びに上記に開示したスクリーニングアッセイで同定された他の分子は、上記及び下記に記した種々の疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

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

20

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

30

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

【0192】

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

40

持続放出製剤を調製してもよい。持続放出製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。持続放出性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3, 773, 919号)、L-グルタミン酸及びγ-エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOTTM(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リユープロリドの注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク

50

質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは37℃の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオージスルフィド交換を通した分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

【0193】

x. 抗体を使用する治療方法

P R Oポリペプチドに対する抗体を上記した種々の心臓血管、内皮及び血管形成病の治療に使用できることが予期されている。 10

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

他の治療的養生法を例えば本発明の抗体の投与と組み合わせてもよい。例えば、抗体で癌の治療をする場合は、このような抗体で治療される患者は放射線治療を受けてもよい。あるいは、又はそれに加えて、患者に化学治療薬を投与してもよい。このような化学治療薬の調製法及び用量スケジュールは、製造者の指示に従って使用されるか、熟練した実務者により経験的に決定される。そのような化学治療に対する調製法及び用量スケジュールは 20
またChemotherapy Service M. C. Perry編, (Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992)にも記載されている。化学治療薬は、抗体の投与に先立って、又は続いて投与してもよく、あるいはそれらと同時に投与してもよい。抗体は、タモキシフェン又はE V I S T^{T M}等の抗エストロゲン化合物又はオナプリストンなどの抗プロゲステロン (E P 6 1 6 8 1 2 参照) の、それらの分子について知られた用量と組み合わせてもよい。

また、抗体を癌の治療に使用する場合、他の腫瘍関連抗原に対する抗体、例えば一又は複数のE r b B 2、E G F R、E r b B 3、E r b B 4、又はV E G Fレセプターに結合する抗体を投与することも好ましい。また、上述した薬剤も含む。抗体は適切に連続投与されるか、又は、放射活性物質の照射又は投与を含んでも含まなくても、放射線学的治療と 30
組合せられる。あるいは、又はそれに加えて、ここで開示されており、同じか、又は二又はそれ以上の異なる抗原に対して結合する二又はそれ以上の抗体を、患者に同時投与してもよい。ときどきは、患者に一又は複数のサイトカインを投与することも有利である。好ましい実施態様では、この抗体は、成長阻害剤と同時投与される。例えば、まず成長阻害剤を投与し、続いて本発明の抗体を投与する。しかしながら、同時投与、又は本発明の抗癌剤を最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は現在用いられている量であるが、成長阻害剤とこの抗体との組み合わせ（相乗）効果により減少させ得る。

【0194】

一実施態様において、腫瘍の血管新生は、組合せ治療において攻撃される。抗-P R Oポリペプチド抗体及び他の抗体（例えば抗-V E G F）は、例えば腫瘍又は転移病巣の壊死がみられるように決定された治療的有効量で、腫瘍を有する患者に投与される。この治療は、好ましい効果が観察されるか、又は腫瘍又は任意の転移病巣の痕跡がなくなるまで続けられる。ついで、T N Fを、補助剤、例えばアルファー、ベーター又はガンマーインターフェロン、抗-H E R 2抗体、ヘレグリン (h e r e g u l i n)、抗ヘレグリン抗体、D-因子、インターロイキン-1 (I L-1)、インターロイキン-2 (I L-2)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (G M-C S F)、又は腫瘍中の微細血管凝固促進剤、例えば抗-プロテインC抗体、抗-プロテインS抗体、又はC 4 b結合プロテイン (1991年2月21日公開のW O 9 1 / 0 1 7 5 3)、又は熱又は放射線を単独で、又は組合せて投与する。 40

補助剤はその有効性に依りて変わり、便宜的な方式でスクリーニングされるマトリクスにより、腫瘍における影響力と比較することが望ましい。抗-PROポリペプチド抗体及びTNFの投与は、所望する臨床効果が達成されるまで繰り返される。また、抗-PROポリペプチド抗体は、TNF、場合によっては補助剤と共に投与される。固形腫瘍が、四肢又は一般的な循環器からの単離が可能な他の位置で見出される例では、ここに記載される治療薬は単離された腫瘍又は器官に投与される。他の実施態様において、FGF又はPDGFアンタゴニスト、例えば抗-FGF又は抗-PDGF中和剤は、抗-PROポリペプチド抗体と共に患者に投与される。抗-PROポリペプチド抗体を用いた治療は、好ましくは傷の治癒又は所望する新血管新生の期間中は中止する。

【0195】

心臓血管、内皮及び血管形成疾患の予防又は治療のための、ここでの抗体の適切な用量は、上記で定義したような治療される疾患の型、疾患の重篤さ及び経過、防止又は治療目的で薬剤が投与されるか否か、従前の治療、患者の臨床履歴及び抗体に対する反応、及び主治医の裁量による。抗体は、適切には患者に一回又は一連の治療に渡って適切に投与される。

例えば、疾患の型及び重篤さに依りて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $50\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1-20\text{mg}/\text{kg}$ ）の抗体が、例えば、1又はそれ以上の別々の投与あるいは連続注入のいずれにしても、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な1日又は1週間の用量は、上記の要因に依りて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ 又はそれ以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に依りて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。この治療の進行は、例えばX線腫瘍イメージングを含む従来の技術及びアッセイによって容易に監視される。

【0196】

x i . 抗体を収容する製造品

また、抗体を収容する容器とラベルをも具備する製造品も提供される。このような製造品は上述しており、ここで活性剤は抗-PRO抗体である。

x i i . 抗体を使用する腫瘍の診断及び予知

抗体が使用される徴候が癌である場合、或る種の腫瘍で過剰発現される成長レセプター等の細胞表面タンパク質は候補薬剤又は腫瘍（例えば、癌）治療の優れた標的であるが、PROポリペプチドと同じタンパク質は腫瘍の診断及び予知におけるさらなる用途が見出されている。例えば、PROポリペプチドに対して向けられる抗体は腫瘍の診断及び予知に使用することができる。

例えば、抗体断片を含む抗体は、PROポリペプチドをコードする遺伝子を含む遺伝子の発現の定性的又は定量的検出に用いることができる。抗体は、好ましくは検出可能な、例えば蛍光標識を備え、結合は光学顕微鏡、フローサイトメトリー、フルオロメトリー、又はこの分野で知られた他の技術によって監視できる。このような結合アッセイは、実質的に上述のように実施される。

マーカー遺伝子産物に結合する抗体のインサイツ検出は、例えば、免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡によって実施できる。この目的のために、組織学的試料を患者から取り出し、好ましくは生物学的試料に抗体を被せることにより、標識抗体をそれに適用する。この手法はまた、試験される組織におけるマーカー遺伝子産物の分布も決定できるようにする。当業者には、インサイツ検出のために広範な組織学的方法が容易に利用できることは明らかであろう。

【0197】

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

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

（実施例）

10

20

30

40

50

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

【0198】

実施例1

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

Swiss-Prot公的データベースからの約950の既知の分泌タンパク質からの細胞外ドメイン(ECD)配列(もしあれば、分泌シグナル配列を含む)を、ESTデータベースの検索に使用した。ESTデータベースは、公的データベース(例えばGenBank)及び企業のデータベース(例えば、LIFESeq(商品名)、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含む。検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST-2[Altschul等，*Methods in Enzymology* 266: 460-480 (1996)]を用いて、ECDタンパク質配列のEST配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70(又は90の場合もある)又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。

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

【0199】

上記のように得られたコンセンサス配列に基づいて、次いでオリゴヌクレオチドを合成し、PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリーを同定するため、及びPROポリペプチドの全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして用いるために使用した。正方向及び逆方向PCRプライマーは一般的に20から30ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約100-1000bp長のPCR産物を与えるために設計される。プローブ配列は、典型的に40-55bp長である。幾つかの場合には、コンセンサス配列が約1-1.5kbpより大きいときに付加的なオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを、Ausubel等，*Current Protocols in Molecular Biology*, のように、PCRプライマー対でのPCR増幅によりスクリーニングした。ポジティブライブラリーを、次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて関心ある遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、Not I部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSal Iヘミキナーゼアダプターに結合させ、Not Iで切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター (pRK5 B又はpRK5 D等; pRK5 BはSfi I部位を含まないpRK5 Dの前駆体である; Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991) 参照) に、独特のXho I及びNot I部位において、所定の方角でクローニングした。

【0200】

実施例 2

シグナルアルゴリズム分析を用いたcDNAクローンの単離

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

【0201】

実施例 3

ヒトPRO175をコードするcDNAクローンの単離

天然ヒトPRO175ポリペプチドをコードするcDNAクローン (DNA19355-1150-P1) を、一次cDNAクローンの5'末端を優先的に提示するヒト臍帯静脈内皮細胞のcDNAライブラリーにおいて酵母スクリーニングを使用して同定した。単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置21-23に見かけの翻訳開始部位を、ヌクレオチド位置552-554に停止シグナルを持つ全長クローン (Fig 1; 配列番号: 1) を単離した。予測されるポリペプチド前駆体は177アミノ酸長であり、約20,308ダルトンの算定分子量を持つ。

Fig 2 (配列番号: 2) に示した全長PRO175配列の分析により、Fig 2に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、上記の通りおおよそのものである。全長PRO175配列 (Fig 2; 配列番号: 2) の分析により、II型膜貫通タンパク質の類型であり、以下の存在が明らかになった: 約アミノ酸1~約アミノ酸25のシグナルペプチド; 約アミノ酸26~約アミノ酸51の膜貫通ドメイン; 約アミノ酸52~約アミノ酸177の細胞外ドメイン; 約アミノ酸129~約アミノ酸133及び約アミノ酸161~約アミノ酸165の潜在的N-結合グリコシル化部位; 及び約アミノ酸18~約アミノ酸24のN-ミリスチル化部位。クローンDNA19355-1150-P1は1997年11月18日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209466が付与された。

Fig 2 (配列番号: 2) に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース (バージョン35.45 SwissProt 35) の分析により、PRO175アミノ酸配列といくつかのTNFサイトカインファミリーのメンバーとの間の有意な同一性が明らかになり、特にヒトApo-2L (19.8%)、

10

20

30

40

50

Fas/Apo-リガンド (19.0%)、TNF- α (20.6%) 及びリンフォトキシン- α (17.5%) に対して明らかになった。ほとんどのアミノ酸配列同一性は、TNF- α の結晶構造のベータストランドに相当する領域に見出される [Bannerら, Cell, 73:431-435 (1993); Eckら, J. Biol. Chem., 264:17595-605 (1989); Lewitt-Bentleyら, J. Mol. Biol., 199:389-92 (1988)]。ストランドCの配列は特にファミリーの全てのメンバーで保存されている。DNA19355-1150-P1ポリペプチドの第1のベータストランドと推定膜貫通ドメインとの間の配列は、TNF- α 、CD95L又はApo-2リガンドで約30～約80残基であるのと比較して、5残基を含むといった具合に比較的短い。

10

【0202】

実施例 4

ヒトPRO200をコードするcDNAクローンの単離

発現配列タグ (EST) DNAデータベース (LIFESeq (登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA) を検索し、VEGFと相同性を示すIncyte ESTクローン「INC1302516」を同定した。Incyte ESTクローン「INC1302516」をベースとするプローブを、ヒト神経膠腫細胞系G61から誘導されたcDNAライブラリーのスクリーニングに使用した。特にIncyteクローン「INC1302516」は以下の4つのプローブを作成するのに使用した：

20

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

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

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

5'-ACAACAGGCACAGTTCCAC-3' (配列番号：38)

ヒトPRO200をコードするcDNAクローンを単離するために用いたcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的方法によって形成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライムし、SalIヘミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター (p

30

RKB又はpRKD等；pRK5Bは、SfiI部位を持たないpRK5Dの前駆体である；Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991)を参照されたい) に独特のXhoI及びNotI部位においてクローン化した。cDNAクローンを同定し、全体を配列決定した。DNA29101-1122の全ヌクレオチド配列をFig 3 (配列番号：3) に示す。クローンDNA29101-1122は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置285-287に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置1320-1322に停止コドンを持つ (Fig 3; 配列番号：3)。予測されるポリペプチド前駆体は345アミノ酸長である。全長PRO200タンパク質をFig 4 (配列番号：4) に示す。

Fig 4 (配列番号：4) に示した全長PRO200配列の分析により、Fig 4に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、上記の通りおおよそのものである。全長PRO200配列 (Fig 4; 配列番号：4) の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸1～約アミノ酸14のシグナルペプチド；約アミノ酸25～約アミノ酸29、約アミノ酸55～約アミノ酸59、及び約アミノ酸254～約アミノ酸258のN-グリコシル化部位；約アミノ酸15～約アミノ酸21、約アミノ酸117～約アミノ酸123、約アミノ酸127～約アミノ酸133、約アミノ酸281～約アミノ酸287、約アミノ酸282～約アミノ酸288、及び約アミノ酸319～約アミノ酸325のN-ミリスチル化部位；及び約アミノ酸229～約アミノ酸233のアミド化部位。

40

クローンDNA29101-1122は1998年3月5日にATCCに寄託され、AT

50

C C 寄託番号 2 0 9 6 5 3 が付与された。寄託されたクローンは、ここに提供する表示より実際の正しい配列を有すると理解される。

F i g 4 (配列番号: 4) に示した全長配列の A L I G N - 2 配列アラインメント分析法を用いた D a y h o f f データベース (バージョン 3 5 . 4 5 S w i s s P r o t 3 5) の分析により、P R O 2 0 0 アミノ酸配列と血管内皮細胞成長因子 (V E G F) 及び骨形態形成タンパク質 (V E G F - E ポリペプチド) との間にある程度の配列同一性があることが示された。

【0203】

実施例 5

ヒト P R O 1 9 8 をコードする c D N A クローンの単離

P R O 1 9 8 をコンピュータプログラム B L A S T (A l t s c h u l ら, M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 2 6 6 : 4 6 0 - 4 8 0 (1996)) を用いて G e n b a n k データベースをスクリーニングすることにより同定した。P R O 1 9 8 配列は既知の E S T 配列 T 5 7 2 8 0 及び T 5 0 7 1 9 と相同性を有することが示された。既知の E S T 配列で、全長配列として同定されているか、又は T I E レセプターと結合するリガンドとして記載されているものはない。同定に続いて、C l o n t e c h , I n c . , (P a l o A l t o , C A) から購入した m R N A、カタログ番号 # 6 5 2 8 - 1 から調製したヒト胎児肺ライブラリーを、製造者の指示に従ってクローニングした。ライブラリーを合成オリゴヌクレオチドプローブを用いたハイブリッド形成によりスクリーニングした。

使用したオリゴヌクレオチド配列は次の通りである:

5' - T G G T T G G C A A A G G C A A G G T G G C T G A C G A T C C G G - 3' (配列番号: 39)

5' - G T G G C C C T T A T C T C T C C T G T A C A G C T T C C G G A T C G T C A G C C A C - 3' (配列番号: 40)

5' - T C C A T T C C C A C C T A T G A C G C T G A C C C A - 3' (配列番号: 41)

c D N A クローンを同定し、全体を配列決定した。D N A 3 3 4 5 7 - 1 0 7 8 の全ヌクレオチド配列を F i g 5 (配列番号: 5) に示す。クローン D N A 3 3 4 5 7 - 1 0 7 8 は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 3 3 - 3 5 に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置 8 9 7 - 8 9 9 に停止コドンを持つ (F i g 5 ; 配列番号: 5)。予測されるポリペプチド前駆体は 2 8 8 アミノ酸長である。全長 P R O 1 9 8 タンパク質を F i g 6 (配列番号: 6) に示す。

F i g 6 (配列番号: 6) に示した全長 P R O 1 9 8 配列の分析により、F i g 6 に示すような重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、上記の通りおおよそそのものである。全長 P R O 1 9 8 配列 (F i g 6 ; 配列番号: 6) の分析により、以下の存在が明らかになった: 約アミノ酸 1 ~ 約アミノ酸 1 6 のシグナルペプチド; 約アミノ酸 1 7 8 ~ 約アミノ酸 1 8 2 の N - グリコシル化部位; 約アミノ酸 2 7 2 ~ 約アミノ酸 2 7 6 のグリコサミノグリカン付着部位; 約アミノ酸 1 8 8 ~ 約アミノ酸 1 9 7 のチロシンキナーゼリン酸化部位; 約アミノ酸 1 6 ~ 約アミノ酸 2 2、約アミノ酸 8 9 ~ 約アミノ酸 9 5、約アミノ酸 1 4 4 ~ 約アミノ酸 1 5 0、及び約アミノ酸 2 6 7 ~ 約アミノ酸 2 7 3 の N - ミリスチル化部位; 及び約アミノ酸 2 4 2 ~ 約アミノ酸 2 5 5 のフィブリノーゲンベータ及びガンマ鎖 C - 末端ドメインシグネチャー。

クローン D N A 3 3 4 5 7 - 1 0 7 8 は 1 9 9 7 年 9 月 1 8 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 2 8 3 が付与された。寄託されたクローンは、ここに提供する表示より実際に正しい配列を有すると理解される。

F i g 6 (配列番号: 6) に示した全長配列の A L I G N - 2 配列アラインメント分析法を用いた D a y h o f f データベース (バージョン 3 5 . 4 5 S w i s s P r o t 3 5) の分析により、P R O 1 9 8 アミノ酸配列と T I E レセプターに結合するリガンドとの

間の配列同一性が示された。「T I E」という略語は、「チロシンキナーゼ含有 I g 及び E G F 相同ドメイン (t y r o s i n e k i n a s e c o n t a i n i n g I g a n d E G F h o m o l o g y d o m a i n s) 」の頭文字を表し、レセプターチロシンキナーゼ類の新たなファミリーを指すために作られた。

【0204】

実施例 6

ヒト P R O 3 6 4 をコードする c D N A クロンの単離

発現配列タグ (E S T) D N A データベース (L I F E S E Q (登録商標)、I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s、P a l o A l t o, C A) を検索し、ポリペプチドの腫瘍壊死因子レセプター (T N F R) ファミリーのメンバーと相同性を示す I n c y t e E S T 配列 (I n c y t e E S T 番号 3 0 0 3 4 6 0) を同定した。 10

次に、B L A S T (A l t s c h u l 等, M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 2 6 6 : 4 6 0 - 4 8 0 (1 9 9 6)) 及び「p h r a p」(P h i l G r e e n, U n i v e r s i t y o f W a s h i n g t o n, S e a t t l e, W a s h i n g t o n) の繰り返しサイクルを用いて I n c y t e 3 0 0 3 4 6 0 E S T 及び他の E S T 配列に対してコンセンサス D N A 配列を構築した。コンセンサス配列を、ここで「< c o n c e n 0 1 >」と命名し、またここで D N A 4 4 8 2 5 と呼ぶ。

D N A 4 4 8 2 5 及び「< c o n c e n 0 1 >」コンセンサス配列に基づいて、1) P C R により関心ある配列を含む c D N A ライブラリーを同定するため、及び 2) P R O 3 6 4 の全長コード化配列のクロンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドプローブを合成した。正方向及び逆方向 P C R プライマーは一般的に 2 0 から 3 0 ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約 1 0 0 - 1 0 0 0 b p 長の P C R 産物を与えるように設計される。プローブ配列は典型的には 4 0 - 5 5 b p 長である。全長クロンについて幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからの D N A を上掲の A u s u b e l 等, C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y に従って、P C R プライマー対での P C R 増幅によりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いた関心ある遺伝子をコードするクロンの単離に使用した。 20

P C R プライマー対 (正方向及び逆方向) を合成した：

正方向 P C R プライマー (4 4 8 2 5 . f 1) ： 30

5' - C A C A G C A C G G G G C G A T G G G - 3' (配列番号：42)

正方向 P C R プライマー (4 4 8 2 5 . f 2) ：

5' - G C T C T G C G T T C T G C T C T G - 3' (配列番号：43)

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

5' - G G C A C A G C A C G G G G C G A T G G G C G C G T T T - 3' (配列番号：44)

逆方向 P C R プライマー (4 4 8 2 5 . r 1) ：

5' - C T G G T C A C T G C C A C C T T C C T G C A C - 3' (配列番号：45)

逆方向 P C R プライマー (4 4 8 2 5 . r 2) ：

5' - C G C T G A C C C A G G C T G A G - 3' (配列番号：46) 40

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

5' - G A A G G T C C C C G A G G C A C A G T C G A T A C A - 3' (配列番号：47)

さらに、コンセンサス D N A 4 4 8 2 5 配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリッド形成プローブ (4 4 8 2 5 . p 1) ：

5' - G A G G A G T G C T G T T C C G A G T G G G A C T G C A T G T G T G T C C A G C - 3' (配列番号：48)

ハイブリッド形成プローブ (4 4 8 2 5 . G I T R . p) ：

5' - A G C C T G G G T C A G C G C C C C A C C G G G G G T C C C G G G T G C G 50

G C C - 3 ' (配列番号 : 49)

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

【0205】

cDNAライブラリーの構築のためのRNAはヒト小腸組織 (LIB231) から単離した。cDNAクローンを単離するために用いたcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CA からのもの等の市販試薬を用いて標準的方法によって形成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライムし、ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター (pRKB又はpRKD等; pRK5Bは、SfiI部位を持たないpRK5Dの前駆体である; Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991)) を参照されたい) に独特のXhoI及びNotI部位においてクローン化した。

cDNAクローンを同定し、全体に配列決定した。DNA47365-1206の全ヌクレオチド配列をFig7 (配列番号: 7) に示す。クローンDNA47365-1206は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置121-123に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置844-846に停止コドンを持つ (Fig7; 配列番号: 7)。予測されるポリペプチド前駆体は241アミノ酸長であり、約26,000ダルトンの予測分子量及び約6.34の推定pIを持つ。全長PRO364タンパク質をFig8 (配列番号: 8) に示す。

Fig8 (配列番号: 8) に示した全長PRO364配列の分析により、Fig8に示すような重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、上記のようにおおよそそのものである。全長PRO364配列 (Fig8; 配列番号: 8) の分析により、以下の存在が明らかになった: 約アミノ酸1~約アミノ酸25のシグナルペプチド; 約アミノ酸162~約アミノ酸180の潜在的膜貫通ドメイン; 約アミノ酸146~約アミノ酸150のN-グリコシル化部位; 約アミノ酸5~約アミノ酸11、約アミノ酸8~約アミノ酸14、約アミノ酸25~約アミノ酸31、約アミノ酸30~約アミノ酸36、約アミノ酸33~約アミノ酸39、約アミノ酸118~約アミノ酸124、約アミノ酸122~約アミノ酸128、約アミノ酸156~約アミノ酸162のN-ミリスチル化部位; 約アミノ酸166~約アミノ酸177の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位; 及び約アミノ酸171~約アミノ酸193のロイシンジッパーパターン。

クローンDNA47365-1206は1997年11月7日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209436が付与された。寄託されたクローンは、ここに提供する表示より実際に正しい配列を有すると理解される。

全長PRO364ポリペプチドのアミノ酸配列の分析は、その一部が腫瘍壊死因子レセプターファミリーのメンバーと相同性を有することを示唆し、よってPRO364が腫瘍壊死因子レセプターファミリーの新規なメンバーであることを示している。PRO364の細胞内ドメインは、TRAF2結合に必要であることが示されたCD30内、そしてTNFR2内にも存在する最小ドメインに類似するモチーフ (アミノ酸207-214の領域内) を含む。TNFRファミリーに特徴的な (Naismith及びSprang, Trends Biochem. sci., 23:74-79 (1998)) 3つの見かけの細胞外システイン富むドメインがあり、その中で第3のCRDは、TNFRファミリーにより典型的な4または6個のシステインではなく3つのシステインを有する。マウスGITRと比較すると、マウスGITRのCRD1における5つのシステインに対してPRO364アミノ酸配列はCRD1に8個のシステインを有し、マウスGITRにおける4つの潜在的なN-結合グリコシル化部位と比較してECDに1つの潜在的N-結合グリコシル化部位が存在する。

全長天然PRO364ポリペプチドの推定アミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチ

ド配列の詳細な検討により、Nocentini等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6216-6221 (1997)に報告されたマウスGITR (mGITR) タンパク質との配列相同性が明らかとなる。従って、PRO364はNocentini等によって報告されたマウスGITRタンパク質のヒト対応物又は相同分子種を表していることが可能である。

【0206】

実施例7

ヒトPRO356をコードするcDNAクローンの単離

発現配列タグ (EST) DNAデータベース (LIFESEQ (登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA) を検索し、TIERI 10
ガンドファミリーと相同性を示すEST (#2939340) を同定した。PRO356
をクローニングするために、Clontech, Inc. (Palo Alto, CA)
, カタログ#6537-1から得たヒト子宮mRNAを、製造者の指示に従い使用し
た。

ヒトPRO356をコードするcDNAクローンを単離するために用いたcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬
を用いて標準的方法によって形成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプ
ライムし、SalIヘミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、NotIで切断し、
ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター (p
RKB又はpRKD等; pRK5Bは、SfiI部位を持たないpRK5Dの前駆体である; Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991) を
参照されたい) に独特のXhoI及びNotI部位においてクローン化した。 20

上述のEST配列に基づいて、1) PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリー
をPCRにより同定するため、及び2) PRO356の全長コード化配列のクローンを
単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。正方向及び逆
方向PCRプライマーは一般的に20から30ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約1
00-1000bp長のPCR産物を与えるように設計される。プローブ配列は典型的に
は40-55bp長である。全長クローンについて幾つかのライブラリーをスクリーニン
グするために、ライブラリーからのDNAを上掲のAusubel等, Current
Protocols in Molecular Biologyに従って、PCRプライ 30
マー対でのPCR増幅によりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリーを、プ
ローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いた関心ある遺伝子をコードする
クローンの単離に使用した。

使用したオリゴヌクレオチド配列は次の通りである：

5'-TTCAGCACCAAGGACAAAGGACAAATGACAAACT-3' (配列
番号：50)

5'-TGTTGCACACTTGTCCAAGCAGTTGTCAATTGTC-3' (配
列番号：51)

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

cDNAクローンを同定し、全体に配列決定した。DNA47470-1130-P1の 40
全ヌクレオチド配列をFig9 (配列番号：9) に示す。クローンDNA47470-1
130-P1は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置215-
217に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置1253-1255に停止コ
ドンを持つ (Fig9; 配列番号：9)。予測されるポリペプチド前駆体は346アミノ酸
長である。全長PRO356タンパク質をFig10 (配列番号：10) に示す。

Fig10 (配列番号：10) に示した全長PRO356配列の分析により、Fig10
に示すような重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペ
プチドドメインに与えられた位置は、上記のようにおおよそのものである。全長PRO3
56配列 (Fig10; 配列番号：10) の分析により、以下の存在が明らかになった：
約アミノ酸1～約アミノ酸26のシグナルペプチド；約アミノ酸58～約アミノ酸62、 50

約アミノ酸 253～約アミノ酸 257、及び約アミノ酸 267～約アミノ酸 271 の N-グリコシル化部位；約アミノ酸 167～約アミノ酸 171 のグリコサミノグリカン付着部位；約アミノ酸 176～約アミノ酸 180 の cAMP-及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸 168～約アミノ酸 174、約アミノ酸 196～約アミノ酸 202、約アミノ酸 241～約アミノ酸 247、約アミノ酸 252～約アミノ酸 258、約アミノ酸 256～約アミノ酸 262、及び約アミノ酸 327～約アミノ酸 333 の N-ミリスチル化部位；約アミノ酸 199～約アミノ酸 202 の細胞接着配列。

クローン DNA 47470-1130-P1 は 1997 年 10 月 28 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 209422 が付与された。寄託されたクローンは、ここに提供する表示より実際に正しい配列を有すると理解される。

Fig 10 (配列番号：10) に示した全長配列の ALIGN-2 配列アラインメント解析法を用いた Dayhoff データベース (バージョン 35.45 SwissProt 35) の分析により、PRO356 アミノ酸配列と、TIE-2L1 (32%) 及び TIE-2L2 (34%) の双方との間の配列同一性が示された。「TIE」という略語は、「チロシンキナーゼ含有 Ig 及び EGF 相同ドメイン」の頭文字を表し、レセプターチロシンキナーゼ類の新たなファミリーを指すために作られた。

10

【0207】

実施例 8

ヒト PRO535 をコードする cDNA クローンの単離

上記の実施例 2 に記載したシグナル配列アルゴリズムを使用して、ここで ss.clu12694.init. と称される Incyte データベースからの EST クラスター配列の同定が可能となった。次いでこの ss.clu12694.init. EST クラスター配列を、公的 EST データベース (例えば、GenBank) 及び企業の EST DNA データベース (LIFESeq (商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA) を含む種々の発現配列タグ (EST) データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラム BLAST 又は BLAST2 (Altschul 等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)) を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLAST スコア 70 (90 の場合もある) 又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington) で集団化してコンセンサス DNA 配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここで DNA48352 と命名する。

20

30

DNA48352 配列と Merck データベースからのクローン番号 H86994 に含まれる EST 配列との間の配列相同性に鑑みて、クローン H86994 を購入し、cDNA 挿入物を得て配列決定した。この挿入物は全長タンパク質をコードすることがここで見出された。この cDNA 挿入物の配列を Fig 11 (配列番号：11) に示し、ここで DNA49143-1429 と命名する。

クローン DNA49143-1429 は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 78-80 に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置 681-683 に停止コドンを持つ (Fig 11)。予測されるポリペプチド前駆体は 201 アミノ酸長である (Fig 12; 配列番号：12)。Fig 12 に示す全長 PRO535 タンパク質は、約 22, 180 の推定分子量及び約 9.68 の pI を有する。

40

Fig 12 (配列番号：12) に示した全長 PRO535 配列の分析により、Fig 12 に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、上記のようにおおよそのものである。全長 PRO535 配列の分析により、以下の特徴の存在が明らかになった：約アミノ酸 1～約アミノ酸 25 のシグナルペプチド；約アミノ酸 155～約アミノ酸 174 の膜貫通ドメイン；約アミノ酸 196～約アミノ酸 200 の N-グリコシル化部位；約アミノ酸 95～約アミノ酸 101 の N-ミリスチル化部位；約アミノ酸 119～約アミノ酸 123 のアミド

50

化部位；及び約アミノ酸62～約アミノ酸78、約アミノ酸87～約アミノ酸124及び約アミノ酸128～約アミノ酸142のFKBP型ペプチジルプロリルシスーシグネーチャー1配列。クローンDNA49143-1429は1998年6月23日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203013が付与された。

Fig 12（配列番号：12）に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、PRO535アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の配列同一性が明らかになったS71237, P_R93551, P_R28980, S71238, FKBP2_HUMAN, CELC05C8_1, S55383, S72485, CELC50F2_6及びS75144。

10

【0208】

実施例9

ヒトPRO819をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例2に記載したシグナル配列発見アルゴリズムを適用して、ここで49605と命名されるIncyteデータベースからのESTクラスター配列の同定が可能となった。次いでこのEST49605クラスター配列を、公的データベース（例えば、GenBank）及び企業のEST DNAデータベース（LIFESeq（商品名）、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（EST）データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480（1996））を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70（90の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでDNA56015と命名する。

20

DNA56015配列とMerckデータベースからのクローン番号H65785に含まれるEST配列との間の配列相同性に鑑みて、クローンH65785を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。この挿入物は全長タンパク質をコードすることがここで見出された。このcDNA挿入物の配列をFig 13（配列番号：13）に示し、ここでDNA57695-1340と命名する。

30

クローンDNA57695-1340は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置46-48に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置202-204の停止コドンで終端する（Fig 13）。予測されるポリペプチド前駆体は52アミノ酸長である（Fig 14；配列番号：14）。Fig 14に示す全長PRO819タンパク質は、約5,216の推定分子量及び約4.67のpIを有する。

Fig 14（配列番号：14）に示した全長PRO819配列の分析により、Fig 14に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、上記のようにおおよそのものである。全長PRO819配列の分析により、以下の特徴の存在が明らかになった：約アミノ酸1～約アミノ酸24のシグナルペプチド；約アミノ酸2～約アミノ酸8のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸5～約アミノ酸33の免疫グロブリン軽鎖に対する相同性を有する領域。クローンDNA57695-1340は1998年6月23日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203006が付与された。

40

Fig 14（配列番号：14）に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、PRO819アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の配列同一性が明らかになった：HSU03899_1, HUMIGLITEB_1, VG28_HSVSA, AF031522_1, PAD1_YEAST及びAF045484_1。

50

【0209】

実施例10：ヒトPRO1002をコードするcDNAクローンの単離

コンセンサスDNA配列を、上記の実施例1に記載したように、phrapを用いて他のEST配列に対して作成した。次いでこのコンセンサス配列を、ここで<Concen0257>と命名する。

Incyteクローン197165を同定し、クローンをここで見出された結果に基づいてさらに配列決定した。197165クローンは胸部腫瘍組織ライブラリー、BRSTTUT13から得た。

上記のようにクローンのDNA配列決定により、PRO1002 [ここで、UNQ486 (DNA59208-1373) と命名される] の全長DNA配列；及びPRO1002 10の誘導タンパク質配列が付与された。

UNQ486 (DNA59208-1373) の全ヌクレオチド配列をFig15 (配列番号：15) に示す。クローンUNQ486 (DNA59208-1373) は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置91-93に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置766-768の停止コドンで終端する (配列番号：15)。予測されるポリペプチド前駆体は225アミノ酸長である (Fig16；配列番号：16)。Fig16に示す全長PRO1002タンパク質は、約25, 447ダルトンの推定分子量及び約4.79のpIを持つ。UNQ486 (DNA59208-1373) は1998年5月20日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209881が付与された。配列に関して、寄託されたクローンは正しい配列を含み、ここで提供される配列は公 20知の配列決定技術に基づくと理解される。

全長PRO1002ポリペプチドのアミノ酸配列の分析により、その一部がMBPと有意な相同性を有することが示唆され、よってPRO1002が新規な細胞刺物及び／又は毒素であることが示された。

配列番号：16のアミノ酸配列をさらに分析することにより、推定シグナルペプチドが配列番号：16の約アミノ酸1-17に存在する。N-ミリスチル化部位は約アミノ酸13-19、103-109、134-140、164-170、180-186、191-197、194-200、196-202及び198-204に存在する。C型レクチンドメインは配列番号：16の約アミノ酸200-224に存在する。対応するヌクレオチドはここに与えられた配列により常套的に決定できる。 30

【0210】

実施例11

ヒトPRO1308をコードするcDNAクローンの単離

コンセンサスDNA配列を、上記の実施例1に記載したように、phrapを用いて他のEST配列に対して作成した。次いでこのコンセンサス配列を、ここで<Concen0616>と命名する。さらに、Concen0616コンセンサス配列をBLAST及びphrapの繰り返しサイクルを用いて伸長させて、上述したEST配列の供給源を用いてコンセンサス配列をできるだけ伸長させた。伸長したコンセンサス配列をここで「DNA35726」と命名する。

DNA35726コンセンサス配列に基づいて、1) PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリーを同定するため、及び2) PRO1308の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。正方向及び逆方向PCRプライマーは一般的に20から30ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約100-1000bp長のPCR産物を与えるように設計される。プローブ配列は典型的には40-55bp長である。幾つかの場合には、コンセンサス配列が約1-1.5kbpより大きな場合に更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幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを上掲のAusubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、PCRプライマー対でのPCR増幅によりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を 50

用いた興味ある遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

次のPCRプライマー対（正方向及び逆方向）を合成した：

正方向PCRプライマー：

5' - T C C T G T G A G C A C G T G G T G T G - 3' (35726, f1; 配列番号：53)

5' - G G G T G G G A T A G A C C T G C G - 3' (35726, f2; 配列番号：54)

5' - A A G G C C A A G A A G G C T G C C - 3' (35726, f3; 配列番号：55)

5' - C C A G G C C T G C A G A C C C A G - 3' (35726, f4; 配列番号：56) 10

逆方向PCRプライマー：

5' - C T T C C T C A G T C C T T C C A G G A T A T C - 3' (35726, r1; 配列番号：57)

5' - A A G C T G G A T A T C C T C C G T G T T G T C - 3' (35726, r2; 配列番号：58)

5' - C C T G A A G A G G C A T G A C T G C T T T T C T C A - 3' (35726, r16, mm; 配列番号：59)

5' - G G G G A T A A A C C T A T T A A T T A T T G C T A C - 3' (35726, r15, mm; 配列番号：60) 20

さらに、コンセンサスDNA 35726配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリッド形成プローブ：

5' - A A C G T C A C C T A C A T C T C C T C G T G C C A C A T G C G C C A G G C C A C C T G - 3' (配列番号：61)

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でPCR増幅してスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマー対の一方を用いてPRO1308遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。 30

【0211】

cDNAライブラリーの構築のためのRNAはヒトSK-Lu-1腺癌細胞系から単離した。cDNAクローンを単離するために用いたcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いた標準的方法によって形成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライミングし、SalIヘミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター（pRKB又はpRKD等；pRK5Bは、SfiI部位を持たないpRK5Dの前駆体である；Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991)を参照されたい）に独特のXhoI及びNotI部位においてクローン化した。 40

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、DNA 62306-1507 [Fig 17、配列番号：17]の全長DNA配列；及びPRO1308の誘導タンパク質配列が得られた。

PRO1308の全コード化配列をFig 17（配列番号：17）に示す。クローンDNA 62306は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置17-19に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置806-808に見かけの停止コードを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は263アミノ酸長である。Fig 18に示す全長PRO1308タンパク質は約27,663ダルトンの推定分子量及び約6.77のpIを持つ。さらなる特徴には、約アミノ酸1-20のシグナルペプチド、約アミノ酸73-77及び215-219の潜在的N-グルコシル化部位、及び約アミノ酸97-13 50

0及び169-202のオステオネクチンドメインと相同性を有する領域が含まれる。
 Fig 18 (配列番号: 18) に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース (バージョン35.45 SwissProt 35) の分析により、PRO1308アミノ酸配列とDayhoff配列S55369との間の有意な相同性が明らかになった。また相同性はPRO1308アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間でも明らかになった: FSA__HUMAN, P__R20063, CELT13C2__1, AGRI__RAT, p__W09406, GO1639, SC1__RAT, S60062, S51362, 及びIOV7__CHICK。

クローンDNA62306 (UNQ674) は1998年9月9日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203254が付与された。 10

【0212】

実施例12

ヒトPRO1304をコードするcDNAクローンの単離
 コンセンサスDNA配列を、上記の実施例1に記載したように、phrapを用いて他のEST配列に対して作成した。次いでこのコンセンサス配列をここでDNA35745と命名する。DNA35745コンセンサス配列に基づいて、1) PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリーを同定するため、及び2) PRO1304の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。 20

PCRプライマー対 (正方向及び逆方向) を合成した:

正方向PCRプライマー (35745. f1):

5'-GTGTTCTGCTGGAGCCGATGCC-3' (配列番号: 62)

正方向PCRプライマー (35745. f2):

5'-GACATGGACAATGACAGG-3' (配列番号: 63)

正方向PCRプライマー (35745. f3):

5'-CCTTTCAGGATGTAGGAG-3' (配列番号: 64)

正方向PCRプライマー (35745. f4):

5'-GATGTCTGCCACCCCAAG-3' (配列番号: 65)

逆方向PCRプライマー (35745. r1): 30

5'-GCATCCTGATATGACTTGTCACTGGC-3' (配列番号: 66)

逆方向PCRプライマー (35745. r2):

5'-TACAAGAGGGAAGAGGAGTTGCAC-3' (配列番号: 67)

さらに、コンセンサスDNA35745配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた:

ハイブリッド形成プローブ (35745. p1):

5'-GCCCCATTATGACGGCTACCTGGCTAAAGACGGCTCGA
 AATTCTACTGCAG-3' (配列番号: 68)

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でPCR増幅してスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマー対の一方を用いてPRO1304遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリーの構築のためのRNAはヒト卵巣組織から単離した。 40

【0213】

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、DNA65406-1567 [Fig 19、配列番号: 19] の全長DNA配列; 及びPRO1304の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA65406-1567の全コード化配列をFig 19 (配列番号: 19) に含む。

クローンDNA65406-1567は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌ 50

クレオチド位置 23-25 に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置 689-691 に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は 222 アミノ酸長であり、約 25, 794 ダルトンの推定分子量及び約 6.24 の pI を持つ。Fig 20 (配列番号: 20) に示した全長 PRO1304 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らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、上記のようにおおよそのものである。Fig 20 に示す全長 PRO1304 ポリペプチドの分析により以下の存在が明らかになった: 約アミノ酸 219~約アミノ酸 224 の小胞体標的化配列; 約アミノ酸 45~約アミノ酸 49 の N-グルコシル化部位; 約アミノ酸 87~約アミノ酸 124、及び約アミノ酸 129~約アミノ酸 143 の FKB P 型ペプチジル-プロリル-シス-トランスイソメラーゼ相同ブロック; 約アミノ酸 202~約アミノ酸 215 及び約アミノ酸 195~約アミノ酸 215 の EF-ハンドカルシウム結合ドメインタンパク質相同ブロック; 約アミノ酸 183~約アミノ酸 190 のチロシンキナーゼリン酸化部位; 及び約アミノ酸 19~約アミノ酸 25 及び約アミノ酸 95~約アミノ酸 101 の N-ミリスチル化部位。クローン DNA 65406-1567 は 1998 年 9 月 15 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 203219 が付与された。Fig 20 (配列番号: 20) に示した全長配列の WU-BLAST-2 配列アラインメント分析を用いた Dayhoff データベース (バージョン 35.45 SwissProt 35) の分析により、PRO1304 アミノ酸配列と以下の Dayhoff 配列との間の有意な相同性が明らかになった: P_R28980, S71238, CELC05C8_1, VFU52045_1, S75144, FKB3_BOVIN, CELC50F2_6, CELB0511_12, 及び P_R41781。DNA 65406-1567 配列は、Incycyte EST クローン番号 2813577 の挿入物の単離及び配列決定によっても得られた。

【0214】

実施例 13

心臓新生児肥大の刺激 (アッセイ #1)

このアッセイは新生児心臓の肥大を刺激する PRO ポリペプチドの能力を測定するために設計されている。このアッセイで陽性であると試験される PRO ポリペプチドは種々の心不全疾患の治療に有用であることが予想される。

1 日齢の Harlan Sprague Dawley ラットから心筋細胞を得た。細胞 ($7.5 \times 10^4 / \text{ml}$ で $180 \mu\text{l}$ 、血清 < 0.1%、新たに単離) を DMEM/F12 + 4% FCS で予めコートした 96 ウェルプレートに 1 日目に添加した。試験 PRO ポリペプチドを含有する試験試料を 2 日目に $20 \mu\text{L}$ の容量でウェルに直接添加した。さらに 2 日後に細胞をクリスタルバイオレットで染色し、次の日に視覚によりスコアをつけた。インキュベータ条件は重要であり 5% の CO_2 を必要とする。

活性基準: $1-100 \mu\text{M}$ のフェニルエフリン (phenylephrine)、 $0.1-1.0 \mu\text{M}$ の PGF-2 アルファ、 $1-10 \text{nM}$ のエンドセリン、 $1-10 \text{nM}$ の CT1 (LIF)。アッセイ反応に Ca 濃度が重要であるため PBS は含有しない。アッセイ媒体は以下を含む: DMEM/F12 (2.44g の重炭酸塩を含む)、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のトランスフェリン、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のインシュリン、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアプロチニン、 $2 \text{mmol}/\text{L}$ のグルタミン、 $100 \text{U}/\text{ml}$ のペニシリン G、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシン。マンニトール (4%) を含むタンパク質バッファーは $1/10$ (0.4%) 及び $1/100$ (0.04%) ではポジティブシグナル (スコア 3.5) を与えたが、 $1/1000$ (0.004%) では与えなかった。従って、マンニトールを含む試験試料バッファーは実行しなかった。二次アッセイは細胞からの条件培地中での ELISA による ANP レベル (ng/ml) の測定からなる。ANP メッセージの増加は数時間後の細胞からの PCR により測定できる。

結果を細胞サイズの視覚的観察により評価し: 条件培地についてはスコア = 3.5 又はそれ以上を陽性と考え; 精製タンパク質についてはスコア = 3.0 又はそれ以上を陽性と考えた。

P R O 1 8 3 は新生児心臓肥大を刺激し、このアッセイで正の対照体と比較して陽性スコアがつけられることが観察された。

【0215】

実施例 1 4

内皮細胞増殖の刺激（アッセイ # 8）

このアッセイは、本発明の P R O ポリペプチドが副腎皮質毛細管内皮細胞（A C E）成長を刺激する能力を示すか否かを測定する用に設計されている。このアッセイで陽性であると試験される P R O ポリペプチドは、例えば傷治癒等を含む血管形成が有益な状態又は疾患の治療に有用であることが予想される（これらの P R O ポリペプチドのアゴニストも同様）。

ウシ副腎皮質毛細管内皮（A C E）細胞（初代培養からのもの、最大 1 2 - 1 4 継代）を 9 6 ウェルのプレートにおいて 1 0 0 マイクロリットル当たり 5 0 0 細胞／ウェルでプレATINGした。アッセイ媒体は、低グルコース D M E M、1 0 % 子ウシ血清、2 m M グルタミン、及び 1 x ペニシリン／ストレプトマイシン／ファンギゾンを含む。対照ウェルは以下を含む：（1）A C E 細胞無添加；（2）A C E 細胞のみ；（3）A C E 細胞 + V E G F（5 n g / m l）；及び（4）A C E 細胞 + F G F（5 n g / m l）。次いで、対照及び試験試料（1 0 0 マイクロリットル容量）をウェルに添加した（各々、1 %、0.1 % 及び 0.01 % 希釈）。細胞培地を 3 7 °C / 5 % C O₂ で 6 - 7 日間インキュベートした。インキュベーションの後、ウェル中の培地を吸引して細胞を P B S で 1 x 洗浄した。次いで、酸ホスファターゼ反応混合物（1 0 0 マイクロリットル、0.1 M 酢酸ナトリウム、p H 5.5、0.1 % トリトン X - 1 0 0、1 0 m M のリン酸 p - ニトロフェニル）を各ウェルに添加した。3 7 °C で 2 時間のインキュベーション後に、1 0 マイクロリットルの 1 N の N a O H の添加により反応を停止させた。光学密度（O D）を 4 0 5 n m でマイクロプレートリーダーで測定した。

P R O ポリペプチドの活性は、（1）細胞のみのバックグラウンドに対する、及び（2）V E G F による最大阻害に対する（酸ホスファターゼ活性、O D 4 0 5 n m で測定した）増殖増加の倍数として計算した。最大阻害についての活性参照として V E G F（3 - 1 0 n g / m l）及び F G F（1 - 5 n g / m l）を使用した。アッセイの結果は、観察された刺激がバックグラウンドを越えて ≥ 5 0 % である場合に「陽性」と考えた。V E G F（5 n g / m l）対照は 1 % 希釈において 1.24 倍の刺激を与え；F G B（5 n g / m l）対照は 1 % 希釈において 1.46 倍の刺激を与えた。

P R O 1 7 1 0 はこのアッセイにおいて陽性と検定された。

【0216】

実施例 1 5

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

内皮細胞の V E G F 刺激増殖を阻害する様々な P R O ポリペプチドの能力を試験した。このアッセイで陽性であると試験されるポリペプチドは哺乳動物の内皮細胞成長の阻害に有用であり、このような効果は、例えば腫瘍成長の阻害に有益である。

特に、ウシ副腎皮質毛細管内皮（A C E）細胞（初代培養からのもの、最大 1 2 - 1 4 継代）を 9 6 ウェルのプレートにおいて 1 0 0 マイクロリットル当たり 5 0 0 細胞／ウェルでプレATINGした。アッセイ媒体は、低グルコース D M E M、1 0 % 子ウシ血清、2 m M グルタミン、及び 1 x ペニシリン／ストレプトマイシン／ファンギゾンを含む。対照ウェルは以下を含む：（1）A C E 細胞無添加；（2）A C E 細胞のみ；（3）A C E 細胞 + 5 n g / m l F G F；（4）A C E 細胞 + 3 n g / m l V E G F；（5）A C E 細胞 + 3 n g / m l V E G F + 1 n g / m l T G T - ベータ；及び（6）A C E 細胞 + 3 n g / m l V E G F + 5 n g / m l L I F。次いで、試験試料、ポリ - H i s タグ P R O ポリペプチド（1 0 0 マイクロリットル容量）をウェルに添加した（各々、1 %、0.1 % 及び 0.01 % 希釈）。細胞培地を 3 7 °C / 5 % C O₂ で 6 - 7 日間インキュベートした。インキュベーションの後、ウェル中の培地を吸引して細胞を P B S で 1 x 洗浄した。次いで、酸ホスファターゼ反応混合物（1 0 0 マイクロリットル、0.1 M 酢酸ナトリウム、

10

20

30

40

50

pH 5.5, 0.1% トリトン X-100, 10 mM のリン酸 p-ニトロフェニル) を各ウェルに添加した。37℃で2時間のインキュベーション後に、10マイクロリットルの1NのNaOHの添加により反応を停止させた。光学密度(OD)を405nmでマイクロタイタープレートで測定した。

PROポリペプチドの活性は、刺激なしの細胞に対する、(OD 405nmでの酸性ホスファターゼ活性を測定したときの) VEGF (3 ng/ml) 刺激増殖の阻害パーセントとして計算した。TGF-βは、VEGF-刺激ACE細胞増殖の70-90%をブロックするため、TGF-βを1 ng/mlにおいて活性対照として用いた。以下は、癌治療、特に腫瘍血管形成の阻害におけるPROポリペプチドの有用性を示す。数値(相対的阻害)は、刺激なしの細胞に対するPROポリペプチドによるVEGF刺激増殖の阻害パーセントを算定し、次いでVEGF刺激細胞増殖の70-90%を阻害することが知られている1 ng/mlのTGF-βにより得られた阻害パーセントでそのパーセントを割ることにより決定される。結果は、PROポリペプチドが内皮細胞成長のVEGF刺激の30%又はそれ以上の阻害を示した場合(30%以上の相対的阻害)を陽性と考えた。

10

PRO 183 及び PRO 202 はこのアッセイにおいて陽性と検定された。

【0217】

実施例 16

内皮細胞における c-fos の誘導 (アッセイ # 34)

このアッセイはPROポリペプチドが内皮細胞においてc-fosを誘導する能力を示すか否を決定するために設計されている。このアッセイで陽性であると試験されるPROポリペプチドは、例えば傷治癒等を含む血管形成が有益な状態又は疾患の治療に有用であることが予想される(これらのPROポリペプチドのアゴニストも同様)。また、このアッセイで陽性であると試験されるPROポリペプチドは癌腫瘍の治療に有用であることが予想される(これらのPROポリペプチドのアゴニストも同様)。

20

成長培地(50%のハムのF12w/oGHT:低グルコース、及びグリシンなしの50%DMEM:NaHCO₃、1%グルタミン、10mMのHEPES、10%のFBS、10ng/mlのbFGF)中のヒト静脈臍静脈内皮細胞(HUVEC, Cell Systems)を1x10⁴細胞/ウェルの細胞密度で96ウェルマイクロタイタープレートにプレーティングした。プレーティングの次の日、成長培地を除き、細胞を100μl/ウェルの試験試料と対照(陽性対照=成長培地;陰性対照=プロテイン32バッファー=10mMのHEPES、140mMのNaCl、4%(w/v)マンニトール、pH6.8)で処理することにより、細胞を飢餓させた。細胞を5%CO₂中で37℃において30分間インキュベートした。試料を取り除いて、bDNAキットプロトコール(Chiron Diagnostics, cat. #6005-037)の最初の部分に従った。ここで、下記の各大文字の試薬/バッファーはキットから利用可能であった。

30

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

40

50

【0218】

次の日に、bDNAキットプロトコルの第2の部分に従った。特に、プレートインキュベーターから取り除き、ベンチに配置して10分間冷却した。必要な添加の容積は製造者により適用された情報に基づいて計算した。ALハイブリッド形成バッファー中に1:100の希釈のアンプリファイアー濃縮物 (Amplifier Concentrate) ($20 \text{ fm}/\mu\text{l}$) を作成することにより $50 \mu\text{l}$ のアンプリファイアー作用液を調製した。ハイブリッド形成混合物をプレートから除去し、洗浄剤Aで2回洗浄した。 $50 \mu\text{l}$ のアンプリファイアー作用液を各ウェルに添加し、ウェルを 53°C で30分間インキュベートした。次にプレートをインキュベーターから取り除き、ベンチに配置して10分間冷却した。標識プローブ作用液を、ALハイブリッド形成バッファー中に1:100の希釈で標識濃縮物 ($40 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) を作成することにより調製した。10分の冷却期間後、アンプリファイアーハイブリッド形成混合物を除去し、プレートを洗浄剤Aで2回洗浄した。 $50 \mu\text{l}$ の標識プローブ作用液を各ウェルに添加し、ウェルを 53°C で15分間インキュベートした。10分間の冷却後、基質を室温まで温めた。アッセイに必要な各モルの基質に $3 \mu\text{l}$ の基質エンハンサーを添加して、プレートを10分間冷却し、標識ハイブリッド形成混合物を取り除き、プレートを洗浄剤Aで2回、洗浄剤Dで3回洗浄した。 $50 \mu\text{l}$ のエンハンサーを伴う基質溶液を各ウェルに添加した。プレートを 37°C で30分間インキュベートし、RLUを適当な照度計で読みとった。

10

複製を平均化し変動係数を決定した。陰性対照 (上述のプロテイン32/HEPESバッファー) 値に対する増加倍数の活性の測定は化学発光単位 (RLU) によって示された。PROポリペプチドが陰性対照値に対して少なくとも2倍の値を示す場合は陽性と考えた。陰性対照 = 1.00% 希釈で 1.00 RLU。陽性対照 = 1.00% 希釈で 8.39 RLU。

20

このアッセイにおいてPRO861は陽性と検定された：

【0219】

実施例19

F2aにより誘発される心臓新生児肥大の向上 (アッセイ#37)

このアッセイは新生児心臓の肥大を刺激するPROポリペプチドの能力を測定するように設計されている。このアッセイで陽性であると検定されるPROポリペプチドは種々の心不全疾患の治療に有用であることが予想される。

30

1日齢のHarlan Sprague Dawleyラットから心筋細胞を得た。細胞 ($7.5 \times 10^4 / \text{ml}$ で $180 \mu\text{l}$ 、血清 < 0.1%、新たに単離) をDMEM/F12 + 4% FCSで予めコートした96ウェルプレートに1日目に添加した。試験PROポリペプチド ($20 \mu\text{l}/\text{ウェル}$) を含有する試験試料を1日目にウェルに直接添加した。次いで2日後にPGF ($20 \mu\text{l}/\text{ウェル}$) を最終濃度 10^{-6} M で添加した。次いで細胞を4日目に染色し、5日目にスコアをつけた。視覚的スコアは細胞サイズに基づき、陰性対照と比較してサイズの増加を示さない細胞を0.0とスコア付けし、陰性対照と比較してサイズの小さな増加を示す細胞を1.0とスコア付けし、陰性対照と比較してサイズの大きな増加を示す細胞を2.0とスコア付けした。1.0又はそれ以上のスコアを陽性と考えた。

40

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

このアッセイにおいてPRO183及びPRO202は陽性と検定された。

50

【0220】

実施例18

内皮細胞アポトーシスの誘導（アッセイ#73）

内皮細胞においてアポトーシスを誘導するPROポリペプチドの能力をヒト静脈の臍静脈内皮細胞（HUVEC, Cell Systems）中で試験した。このアッセイで陽性であると、腫瘍及び血管疾患の治療にポリペプチドが有用であることを示し、内皮細胞のアポトーシスに有益であることが含まれる。

細胞を96ウェルマイクロタタープレート（Amersham Life Science, cytostar-Tシンチレーティングマイクロプレート、RPNQ160、無菌、組織培地処理、個々にラッピング）で10%の血清（CSG-媒体、Cell Systems）中、ウェル当たり 2×10^4 細胞の密度で全容量100 μ lでプレATINGした。2日目に、PROポリペプチドを含有する試験試料を1%、0.33%及び0.11%希釈の3段階で添加した。細胞無しのウェルをブランクとして用い、細胞のみのウェルを陰性対照として用いた。陽性対照としてスタウロスポリンの3xストックの1:3連続希釈50 μ lを用いた。PROポリペプチドのアポトーシスを誘導する能力は、カルシウム及びリン脂質結合タンパク質のメンバーであるアネキシンVの検出のために96ウェルをプロセッシングしてアポトーシスを検出することにより決定した。

0.2mlのアネキシンV-ビオチンのストック溶液（100 μ g/ml）を、4.6mlの $2 \times \text{Ca}^{2+}$ 結合バッファー及び2.5%BSA中に希釈した（1:25希釈）。50 μ lの希釈アネキシンV-ビオチン液を、1.0 μ g/mlの最終濃度になるまで各ウェル（対照を除く）に添加した。試料を ^{35}S -ストレプトアビジンの直接添加の前にアネキシン-ビオチンと共に10-15分間インキュベートした。 ^{35}S -ストレプトアビジンは $2 \times \text{Ca}^{2+}$ 結合バッファー、2.5%BSA中に希釈し、最終濃度が 3×10^4 cpm/ウェルになるまで全てのウェルに添加した。次いでプレートを密封し、1000rpmで15分間遠心分離し、2時間の間、軌道シェイカー上に配した。分析は1450 Microbeta Trilux（Wallac）で実施した。バックグラウンドを越えるパーセントが陰性対照を越える毎分当たりのカウントのパーセント量を表す。バックグラウンドを越えるパーセントが30%以上のものが陽性であると考えられる。PRO198は、上記のアッセイにおいて陽性の結果を与えた（内皮細胞アポトーシスを誘導した）。

【0221】

実施例19

LIF+ET-1により誘発される心臓新生児肥大の向上（アッセイ#75）

このアッセイは新生児心臓の肥大を刺激するPROポリペプチドの能力を測定するように設計されている。このアッセイで陽性であると検定されるPROポリペプチドは種々の心不全疾患の治療に有用であることが予想される。

1日齢のHarlan Sprague Dawleyラットから心筋細胞を得た。細胞（ 7.5×10^4 /mlで180 μ l、血清<0.1%、新たに単離）をDMEM/F12+4%FCSで予めコートした96ウェルプレートに1日目に添加した。

試験PROポリペプチドを含有する試験試料を2日目に20 μ L容量でウェルに直接添加した。LIF及びETを3日目に添加した。さらに2日後に細胞をクリスタルバイオレットで染色し、次の日に視覚によりスコアをつけた。インキュベータ条件は重要であり5%のCO₂を必要とする。

活性基準：0.1nM nM 0.01nMのCT1（LIF）；1.0nMのエンドセリン-1。アッセイ反応にCa濃度が重要であるためPBSは含有しない。アッセイ媒体は以下を含む：DMEM/F12（2.44gmの重炭酸塩を含む）、10 μ g/mlのトランスフェリン、1 μ g/mlのインシュリン、1 μ g/mlのアプロチニン、2mmol/Lのグルタミン、100U/mlのペニシリンG、100 μ g/mlのストレプトマイシン。マンニトール（4%）を含むタンパク質バッファーは1/10（0.4%）及び1/100（0.04%）ではポジティブシグナル（スコア3.5）を与えたが、1/1

000 (0.004%)では与えなかった。従って、マンニトールを含む試験試料バッファーは実行しなかった。二次アッセイは細胞からの条件培地中でのELISAによるANPレベル (ng/ml) の測定からなる。ANPメッセージの増加は数時間後の細胞からのPCRにより測定できる。

結果を細胞サイズの視覚的観察により評価し：条件培地についてはスコア=3.5又はそれ以上を陽性と考え；精製タンパク質についてはスコア=3.0又はそれ以上を陽性と考えた。

PRO200及びPRO882精製ポリペプチドは新生児心臓肥大を刺激し、このアッセイで陽性対照体と比較して陽性のスコアがつけられることが観察された。

【0222】

実施例20

内皮細胞アポトーシスの検出 (FACS) (アッセイ#96)

内皮細胞においてアポトーシスを誘導する本発明のPROポリペプチドの能力を、10世代未満のHUV細胞を用いてゼラチン化T175フラスコ内でのヒト静脈の臍静脈内皮細胞 (HUVEC, Cell Systems) 中で試験した。このアッセイで陽性であると検定されたPROポリペプチドは病状の治療に有用であることが予期され、例えば腫瘍の治療を含む内皮細胞のアポトーシスに有益である。

1日目に細胞を分裂させ [6cmのゼラチン化ディッシュ当たり420,000細胞 - (1.1×10^3 細胞/cm² Falcon, Pharmacia)]、血清 (CS-C, Cell System) 含有培地中で終夜又は16~24時間成長させた。

2日目に、細胞を5mlのPBSで洗浄し；3mlの0%血清培地をVEGF (100ng/ml) とともに添加し；そして30μlのPRO試験化合物 (最終希釈1%) 又は0%血清培地 (陰性対照) を添加した。混合物を回収の前に48時間インキュベートした。次いで細胞をFACS分析のために回収した。培地を吸引し、細胞をPBSで1回洗浄した。T-175フラスコ内で細胞に5mlの1xトリプシンを添加し、細胞をそれらがプレートから放出されるまで (約5-10分間) 放置した。5mlの成長培地を添加することによりトリプシン化を停止させた。細胞を4℃において1000rpmで5分間スピンのさせた。培地を吸引し、10mlの10%血清補充培地 (Cell Systems) 中に細胞を再懸濁させ、5μlのアネキシン-FITC (Bio Vision) を添加して冷却管をFACSに提示した。陰性対照と比較して、PROポリペプチド処理試料ではアポトーシスが高められるという陽性の結果が決定した。

PRO1002及びPRO1304はこのアッセイで陽性であると検定された。

【0223】

実施例21

線維芽細胞 (BHK-21) 増殖 (アッセイ#98)

このアッセイでは、本発明のある種のPROポリペプチドが培養中の哺乳動物線維芽細胞の増殖を誘発するように作用し、よって哺乳動物系の有用な成長因子として機能することを示す。このアッセイは次のようにして実施する。BHK-21線維芽細胞を2500細胞/ウェルで全容量100μlで標準的な成長培地にプレティングした。次にPROポリペプチド、β-FGF (陽性対照) 又は何もなし (陰性対照) を、最終的な全容量200μlで、1μg/mlのヘパリンの存在下でウェルに添加した。ついで細胞を37℃で6~7日間インキュベートした。インキュベート後、培地を除去し、細胞をPBSで洗浄し、次に酸ホスファターゼ基質反応混合物 (100μl/ウェル) を添加する。次に細胞を37℃で2時間インキュベートする。ウェル当たり10μlの1N NaOHを添加し、酸ホスファターゼ反応を停止する。次にプレートをOD405nmで読みとる。このアッセイでは、陰性対照よりも少なくとも50%を越えていると酸ホスファターゼ活性が陽性であるとされる。

このアッセイでPRO356とPRO1308が陽性であると検定された。

【0224】

実施例22

10

20

30

40

50

内皮細胞成長 (H U V E C) の b F G F 刺激性増殖の阻害 (アッセイ # 1 0 4)

内皮細胞の b F G F 刺激性増殖を阻害する種々の P R O ポリペプチドの能力を試験した。このアッセイで陽性であると検定されたポリペプチドは、哺乳動物における内皮細胞成長を阻害するのに有用であり、例えば腫瘍成長の阻害に対してこのような効果は有益である。

特に、培地 1 9 9 (S i g m a) w / 2 % F B S (H y c l o n e) 中の H U V E C 細胞を 1 0 0 マイクロリットル当たり 5 0 0 細胞 / ウェルで、9 6 ウェルプレートにプレーティングし、終夜放置した。成長培地は次のものを含む: E G M プラス 1 x P e n S t r e p プラス 1 x L - グルタミンプラス 1 0 % F B S アッセイ用培地: 培地 1 9 9 プラス 2 % F B S プラス 5 0 n g / m l b F G F。2 日目、タンパク質を、b F G F (5 0 m g / m l) の存在下、3 つの濃度 (1 %, 0 . 1 %, 0 . 0 1 %) に希釈し、細胞に添加した。次の工程は、B o e h r i n g e r M a n n h e i n B r d U C e l l P r o l i f e r a t i o n E L I S A (C a t N o . 1 6 3 7 2 2 9) 用の使用説明書に記載されたようにして行った。3 日目、細胞を B r d U (最終濃度 1 0 μ M) で標識した。4 日目、細胞を固定し、DNA を 3 0 分間 F i x D e n a t を添加することにより変性させた。F i x D e n a t を取り除き、2 時間後に抗 - B r d U - P O D を添加した。次にプレートを洗浄し、基質を添加した。5 分間発色させた後、1 M の H ₂ S O ₄ を用いて反応を停止した。吸光度 (O D) をマイクロプレートにより 4 0 5 n m で測定した。H U V E C 増殖の b F G F 刺激を阻害する P R O ポリペプチドの活性は、対照細胞 (b F G F 単独) に対して測定した。読みとった吸光度が b F G F より有意に低い任意の試験試料がこのアッセイで陽性であるとみなされる。P R O ポリペプチドの、癌治療、特に腫瘍血管形成の阻害における有用性がこの結果に示されている。P R O 1 7 5、P R O 3 6 4、P R O 5 3 5、P R O 8 1 9 及び P R O 8 7 9 ポリペプチドがこのアッセイで陽性であると検定された。

【0 2 2 5】

実施例 2 3

内皮細胞アポトーシスの誘導 (E L I S A) (アッセイ # 1 0 9)

内皮細胞においてアポトーシスを誘導する P R O ポリペプチドの能力を、1 0 0 n g / m l の V E G F、0 . 1 % の B S A、1 X p e n n / s t r e p を補充した 0 % 血清培地中で 9 6 ウェルフォーマットを使用して、ヒト静脈の臍静脈内皮細胞 (H U V E C, C e l l S y s t e m s) 中で試験した。使用した 9 6 ウェルプレートは F a l c o n により製造された (番号 3 0 7 2)。9 6 ウェルのコーティングは、P B S 溶液中の 0 . 2 % ゼラチン 1 0 0 μ l で > 3 0 分間ゼラチン化を起こすことにより調製した。1 0 % 血清含有培地中で最終濃度 2 x 1 0 ⁴ 細胞 / m l の最終濃度 - ウェル当たり 1 0 0 μ l 容量でプレーティング前に、ゼラチン混合物を全部吸引した。関心ある P R O ポリペプチドを含有する試験試料を添加する前に細胞を 2 4 時間成長させた。

全てのウェルに、1 0 0 n g / m l の V E G F、0 . 1 % の B S A、1 X p e n n / s t r e p を補充した 0 % 血清培地中 1 0 0 μ l を添加した。P R O ポリペプチドを含有する試験試料を 1 %, 0 . 3 3 % 及び 0 . 1 1 % の希釈で三つ組で添加した。細胞の無いウェルをブランクとして使用し、細胞だけのウェルを陰性対照として使用した。陽性対照として、3 x 原液のスタウロスポリンの 5 0 μ l の 1 : 3 の連続希釈物を使用した。E L I S A に先立って、細胞を 2 4 から 3 5 時間インキュベートした。

E L I S A を、B o e h r i n g e r マニュアル [B o e h r i n g e r, 細胞死検出 E L I S A p l u s, カタログ番号 1 9 2 0 6 8 5] に従ってアポトーシス調製溶液のレベルを決定するのに使用した。試料調製: 9 6 ウェルプレートを 1 k r p m で 1 0 分間スピン沈降させ (2 0 0 g)、高速回転により上清を除去し、プレートをペーパータオル上に上下逆に置いて残りの液体を除去した。各ウェルに、2 0 0 μ l の 1 x 溶菌バッファを添加して振盪させずに 3 0 分間室温でインキュベートした。プレートを 1 k r p m で 1 0 分間スピン沈降させ、2 0 μ l の溶菌液 (細胞質画分) をストレプトアビジン被覆 M T P に移した。8 0 μ l の免疫試薬混合物を各ウェルで 2 0 μ l 溶菌液に加えた。M T P

を粘着性ホイルでカバーし、それを軌道振盪機（200 rpm）に配することにより2時間室温でインキュベートした。2時間後、上清を吸引により除去し、ウェル当たり250 μ lの1Xインキュベーションバッファーで3回ウェルをリンスした（吸引で除去した）。各ウェルに基質溶液を添加し（100 μ l）、軌道振盪機で室温において250 rpmで、光度測定分析に十分な発色がされるまでインキュベートした（約10-20分後）。参照波長492 nmとして405 nmでプレートを読むのに96ウェルリーダーを用いた。PIN32（対照バッファー）について得られたレベルを100%に設定した。レベル>130%の試料をアポトーシス誘導についての陽性と考えた。PRO877は、上記のELISAアッセイによって測定したときに陽性の結果を与えた。

【0226】

10

実施例24

インサイツハイブリッド形成

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

インサイツハイブリッド形成は、Lu及びGillet, Cell Vision 1: 169-176 (1994)のプロトコルの最適化バージョンに従って、PCR生成³³P-標識リボプローブを用いて実施される。簡単には、ホルマリン固定、パラフィン包埋ヒト組織を切片化し、脱パラフィンし、プロテイナーゼK（20 g/ml）で15分間37℃で脱タンパクし、さらに上掲のLu及びGilletに記載されたようにインサイツハイブリッド形成する。（³³P）UTP-標識アンチセンスリボプローブをPCR産物から生成し、55℃で終夜ハイブリッド形成する。スライドをKodak NTB2^{T M}核トラックエマルジョンに浸漬して4週間露出する。

20

【0227】

³³P-リボプローブ合成

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

30

2.0 μ lの5x転写バッファー

1.0 μ lのDTT（100 mM）

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

1.0 μ lのUTP（50 μ M）

1.0 μ lのRNAsin

1.0 μ lのDNAテンプレート（1 μ g）

1.0 μ lのH₂O

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

管を37℃で1時間インキュベートし、1.0 μ lのRQ1 DNaseを添加し、次いで37℃で15分間インキュベートした。90 μ lのTE（10 mM トリス pH 7.6 / 1 mMのEDTA pH 8.0）を添加し、混合物をDE81紙にピペットした。残りの溶液をMICROCON-50限外濾過ユニットに負荷し、プログラム10を用いてスピンのさせた（6分間）。濾過ユニットを第2の管に変換し、プログラム2を用いてスピンのさせた（3分間）。最終回収スピンの後、100 μ lのTEを添加し、次に1 μ lの最終生成物をDE81紙にピペットし6 mlのBIOFLUOR II^{T M}で数えた。

40

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

50

【0228】

³³P-ハイブリッド形成

A. 凍結切片の前処理

スライドを冷凍機から取り出し、アルミニウムトレイに配置して室温で5分間解凍した。トレイを55℃のインキュベータに5分間配置して凝結を減らした。スライドを蒸気フード内において4%パラホルムアルデヒド中で5分間固定し、0.5xSSCで5分間室温で洗浄した(25ml 20xSSC + 975ml SQ H₂O)。0.5μg/mlのプロテイナーゼK中、37℃で10分間の脱タンパクの後(250mlの予備加熱RNase無しRNaseバッファー中の10mg/mlストック12.5μl)、切片を0.5xSSCで10分間室温で洗浄した。切片を、70%、95%、100%エタノール中、各2分間脱水した。 10

B. パラフィン包埋切片の前処理:

スライドを脱パラフィンし、SQ H₂O中に配置し、2xSSCで室温において各々5分間2回リンスした。切片を20μg/mlのプロテイナーゼK(250mlのRNase無しRNaseバッファー中10mg/mlを500μl; 37℃、15分間)ーヒト胚組織又は8xプロテイナーゼK(250mlのRNaseバッファー中100μl、37℃、30分間)ーホルマリン組織で脱タンパクした。続く0.5xSSCでのリンス及び脱水は上記のように実施した。

【0229】

C. プレハイブリッド化:

スライドをBoxバッファー(4xSSC、50%ホルムアミド)ー飽和濾紙で列を作ったプラスチックボックスに並べた。組織を50μlのハイブリッド形成バッファー(3.75gデキストラン硫酸+6ml SQ H₂O)で被覆し、ボルテックスし、キャップを外して2分間マイクロ波で加熱した。氷上で冷却した後、18.75mlのホルムアミド、3.75mlの20xSSC及び9mlのSQ H₂Oを添加し、組織を良くボルテックスし、42℃で1-4時間インキュベートした。 20

D. ハイブリッド形成:

スライド当たり1.0x10⁶ cpmのプローブ及び1.0μlのtRNA(50mg/mlストック)を95℃で3分間加熱した。スライドを氷上で冷却し、スライド当たり48μlのハイブリッド形成バッファーを添加した。ボルテックスの後、50μlの³³P混合物をスライド上のプレハイブリッド50μlに添加した。スライドを55℃で終夜インキュベートした。 30

E. 洗浄:

洗浄は、2xSSC、EDTAで2x10分間、室温で実施し(400mlの20xSSC+16mlの0.25M EDTA、V_f=4L)、次いでRNaseA処理を37℃で30分間行った(250ml RNaseバッファー中10mg/mlを500μl=20μg/ml)。スライドを2x10分間、2xSSC、EDTAで室温において洗浄した。緊縮性洗浄条件は次の通り: 55℃で2時間、0.1xSSC、EDTA(20mlの20xSSC+16mlのEDTA、V_f=4L)。 40

【0230】

F. オリゴヌクレオチド

ここに開示したDNA配列の4つについてインサイツ分析を実施した。これらの分析に対して用いたオリゴヌクレオチドは次の通りである:

(1) DNA 19355-1150 (PRO175) (TNFモチーフ相同体)

19355 p1:

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

19355 p2:

5'-TGAAATTAACCCCTCACTAAAGCAGTGCAATGCAGGGGACCTA-3' (配列番号: 70) 50

(2) DNA 29101-1122 (PRO200)

p1:

5' - GGATTCTAATAACGACTCACTATAGGGCGGCGGAATCC
AACCTGAGTAG - 3' (配列番号: 71)

p2:

5' - CTATGAAATTAAACCCCTCACTAAAGGGAGCGGCTATCC
TCCCTGTGCTC - 3' (配列番号: 72)

(3) DNA 47365-1206 (PRO364) (TNFレセプター相同体)

p1:

5' - CTATGAAATTAAACCCCTCACTAAAGGGAGCGGCTATCC 10
TCCCTGTGCTC - 3' (配列番号: 73)

p2:

5' - CTATGAAATTAAACCCCTCACTAAAGGGATCTCCCAAGCC
GCCCTTCTC - 3' (配列番号: 74)

(4) DNA 28498 (PRO183) (FHF-2)

p1:

5' - GGATTCTAATAACGACTCACTATAGGGCCAGCAAAAGA
AGCGGTGTGTG - 3' (配列番号: 75)

p2:

5' - CTATGAAATTAAACCCCTCACTAAAGGGATTTCAGCACGC 20
CAGAGACACTT - 3' (配列番号: 76)

p3:

5' - GGATTCTAATAACGACTCACTATAGGGCATTCGCTTG
CACAGTGTCCG - 3' (配列番号: 77)

p4:

5' - CTATGAAATTAAACCCCTCACTAAAGGGACCACTCTCG
CAGACCCACAG - 3' (配列番号: 78)

【0231】

G. 結果

ここに開示した上記の4のDNA配列についてインサイト分析を実施した。これらの分析 30
からの結果は次の通りである:

(1) DNA 19355-1150-1 (PRO175) (TNFモチーフ)

特定の陽性シグナルが胎児副腎の内皮細胞集団で見出された。他の内皮細胞では陰性であ
った。

(2) DNA 29101-1122 (PRO200) (VEGF相同体)

ヒト組織における発現

胎児組織において: 発現は、軟骨原基の縁における発育中の下肢骨(即ち、外縁周辺)に
おいて観察された。また、発育中の腱、血管平滑筋及び細胞包含発育骨格筋の筋細胞及び
筋小管においても観察された。また発現は骨端成長板でも観察された。さらに発現は発育
中のリンパ節の辺縁洞で見られた。発現は胸腺皮質の被膜下領域で観察され、おそらく、 40
この領域で見られる被膜下上皮細胞又は増殖中の胸腺細胞のいずれかを表している。さら
に気管の平滑筋における発現も報告されている。脳の大脳皮質における皮質ニューロンで
の局所的発現。また、発現は次の組織: 小腸の平滑筋での発現; 胸腺上皮全体の全般的な
発現; 肝臓の管板細胞における発現; 胃の壁在性平滑筋での発現; 胎児皮膚の扁平上皮の
基底層での発現; 胎盤における間質細胞(栄養芽層絨毛)での発現; 及び静脈及び動脈の
壁でのコード発現。脾臓、脊髄及び副腎では陰性の結果が示された。

腫瘍及び胎児組織における発現

高い発現は以下の部位で観察された:

チンパンジーの卵巣-成熟中の濾胞の顆粒膜、低い強度のシグナルが包膜細胞全体で観察
された;

チンパンジーの副甲状腺－高い発現が主細胞全体で見られた；

ヒト胎児の精巣－発育中の管を取り囲む間質細胞全体に中程度の発現が見られた。

ヒト胎児の肺－発育中の気管支樹における軟骨細胞で高い発現が見られ、分岐している気管支上皮で低レベルの発現が見られた。

特定の発現は腎細胞、胃及び結腸癌では観察されなかった。

試験した胎児の組織（E 1 2－E 1 6週）は以下を含む：胎盤、臍帯、肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、肺、心臓、大血管、食道、胃、小腸、脾臓、胸腺、膵臓、脳、眼、脊髄、体壁、骨盤及び下肢。

試験した成人組織は以下を含む：肝臓、腎臓、副腎、心筋、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺、皮膚、大脳皮質（r m）、海馬（r m）、小脳（r m）、陰茎、眼、膀胱、胃、胃癌、結腸、結腸癌、軟骨肉腫、アセトアミノフェン誘発性肝臓障害及び肝硬変。 10

（3）DNA 4 7 3 6 5－1 2 0 6（PRO 3 6 4）（TNFレセプター相同体）

胎児において、発現は脊椎体の腹側表面に並ぶ筋膜に存在する。また胎児網膜でも発現があった。しかしながら、胎児ニューロンでは低レベルの発現しかなかった。他の全ての組織では陰性であった。

（4）DNA 2 8 4 9 8（PRO 1 8 3）（FHF－2）

発現は胎児網膜の内面上に見られた。強い発現がヒト胎児の脊椎の腹側突起のニューロン及び脊髄神経節で見られた。ヒト胎児脳ではあまり発現は観察されなかったが、高い発現が海馬ニューロンを含む、アカゲザル脳のニューロンで観察された。

【0 2 3 2】

20

実施例 2 5

PRO 1 7 5、PRO 2 0 0、PRO 1 9 8、PRO 3 6 4、PRO 3 5 6、PRO 5 3 5、PRO 8 1 9、PRO 1 0 0 2、PRO 1 3 0 8、PRO 1 3 0 4、PRO 1 8 3、PRO 2 0 2、PRO 8 6 1、PRO 8 7 7、PRO 8 7 9、PRO 8 8 2又はPRO 1 7 1 0のハイブリッド形成プローブとしての使用

以下の方法は、PRO 1 7 5、PRO 2 0 0、PRO 1 9 8、PRO 3 6 4、PRO 3 5 6、PRO 5 3 5、PRO 8 1 9、PRO 1 0 0 2、PRO 1 3 0 8、PRO 1 3 0 4、PRO 1 8 3、PRO 2 0 2、PRO 8 6 1、PRO 8 7 7、PRO 8 7 9、PRO 8 8 2又はPRO 1 7 1 0をコードするヌクレオチド配列のハイブリッド形成プローブとしての使用を記述する。 30

（各々、Fig 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31及び33に示されたような）全長又は成熟PRO 1 7 5、PRO 2 0 0、PRO 1 9 8、PRO 3 6 4、PRO 3 5 6、PRO 5 3 5、PRO 8 1 9、PRO 1 0 0 2、PRO 1 3 0 8、PRO 1 3 0 4、PRO 1 8 3、PRO 2 0 2、PRO 8 6 1、PRO 8 7 7、PRO 8 7 9、PRO 8 8 2又はPRO 1 7 1 0又はその断片のコード化配列を含むDNAは、ヒト組織cDNAライブラリー又はヒト組織ゲノムライブラリーの同種DNA（例えば、PRO 1 7 5、PRO 2 0 0、PRO 1 9 8、PRO 3 6 4、PRO 3 5 6、PRO 5 3 5、PRO 8 1 9、PRO 1 0 0 2、PRO 1 3 0 8、PRO 1 3 0 4、PRO 1 8 3、PRO 2 0 2、PRO 8 6 1、PRO 8 7 7、PRO 8 7 9、PRO 8 8 2又はPRO 1 7 1 0の天然発生変異体をコードするもの等）のスクリーニングのためのプローブとして用いられ得る。 40

ハイブリッド形成及びいずれかのライブラリーDNAを含むフィルターの洗浄は、以下の高緊縮性条件下で実施される。PRO 1 7 5、PRO 2 0 0、PRO 1 9 8、PRO 3 6 4、PRO 3 5 6、PRO 5 3 5、PRO 8 1 9、PRO 1 0 0 2、PRO 1 3 0 8、PRO 1 3 0 4、PRO 1 8 3、PRO 2 0 2、PRO 8 6 1、PRO 8 7 7、PRO 8 7 9、PRO 8 8 2又はPRO 1 7 1 0ポリペプチドをコードしている遺伝子から誘導された放射標識プローブのフィルターへのハイブリッド形成は、5 0 %ホルムアミド、5 x SSC、0. 1 % SDS、0. 1 % ピロリン酸ナトリウム、5 0 mMリン酸ナトリウム、pH 6. 8、2 x デンハード液、及び1 0 % デキストラン硫酸の溶液中で4 2 °Cで2 0 時間実施した。フィルターの洗浄は、0. 1 x SSC及び0. 1 % SDS水溶液中で、4 2 50

℃で実施した。

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

【0233】

実施例26

大腸菌におけるPRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710をコードする核酸の発現

この実施例は、大腸菌での組換え発現による非グリコシル化形態のPRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710の調製を例示する。

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710（各々配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31又は33）をコードするDNA配列を、選択したPCRプライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位を持たなければならない。種々の発現ベクターが用いられる。好適なベクターの例は、pBR322（大腸菌から誘導されたもの；Bollivar等，Gene，2：95（1977）参照）であり、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性についての遺伝子を含む。ベクターは、制限酵素で消化され脱リン酸される。PCR増幅した配列は、次いでベクターに結合させる。ベクターは、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、trpプロモーター、ポリ-hisリーダー（最初の6つのSTIIコドン、ポリHis配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む）、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710のコード化領域、ラムダ転写終結区、及びargU遺伝子を含む。

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

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

更に数時間の培養の後、細胞を遠心分離により採集できる。遠心分離で得られた細胞ペレットは、この分野で知られた種々の試薬を用いて可溶化され、次いで可溶化PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドを金属キレート化カラムを用いてポリペプチドを緊密に結合させる条件下で精製できる。

PRO183、PRO200、PRO202、PRO364及びPRO1308が上述した手順による大腸菌ポリ-Hisタグ形態での発現に成功した。

【0234】

実施例27

哺乳動物細胞におけるPRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PR

PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710をコードする核酸の発現

この実施例は、哺乳動物細胞での組換え発現による潜在的にグリコシル化形態のPRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710の調製を例示する。

発現ベクターとしてベクターpRK5（1989年3月15日公開のEP 307, 247参照）を用いた。場合によっては、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710 DNAを選択した制限酵素でpRK5に結合させ、上掲のSambrook等に記載されたような結合方法を用いてPRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710コード化DNAへの挿入を行う。得られたベクターは、pRK5-（PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710コード化DNA）と呼ばれる。

一実施態様では、選択された宿主細胞は293細胞である。ヒト293細胞（ATCC CCL 1573）は、子ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び／又は抗生物質を添加したDMEMなどの媒質中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化した。約10 µgのpRK5-（PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710コード化DNA）を約1 µgのVA RNA遺伝子をコードするDNA（Thimmapaya等, Cell, 31:543（1982））と混合し、500 µlの1 mMトリス-HCl、0.1 mMのEDTA、0.227 MのCaCl₂に溶解させた。この混合物に、滴状の、500 µlの50 mMのHEPES（pH 7.35）、280 mMのNaCl、1.5 mMのNaPO₄を添加し、25℃で10分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、293細胞に加えて37℃で約4時間定着させた。培養培地を吸引し、2 mlのPBS中20%グリセロールを30秒間添加した。293細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートした。

形質移入の約24時間後、培養培地を除去し、培養培地（のみ）又は200 µCi/mlの³⁵S-システイン及び200 µCi/mlの³⁵S-メチオニンを含む培養培地で置換した。12時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15% SDSゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドの存在を現す選択された時間にわたってフィルムに暴露した。形質転換した細胞を含む培地は、更なるインキュベーションを施し（無血清培地で）、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

【0235】

これに換わる技術では、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1

304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710をコードする遺伝子を、Somparyac等、Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて293細胞に一過的に導入してもよい。293細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700 µgのpRK5-(PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710コード化DNA)を添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮してPBSで洗浄した。DNA-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートした。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、5 µg/mlウシインシュリン及び0.1 µg/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約4日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いでPRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドをコードする発現された遺伝子を含む試料を濃縮し、透析及び/又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製できる。

他の実施態様では、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710をコードする遺伝子をCHO細胞で発現させることができる。pRK5-(PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710コード化DNA)核酸は、CaPO₄又はDEAE-デキストランなどの公知の試薬を用いてCHO細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地(単独)又は³⁵S-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドの存在を同定した後、培養培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約6日間インキュベートし、次いで条件培地を収集する。次いで、発現されたPRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710を含む培地を濃縮して、選択した方法によって精製することができる。

また、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710ポリペプチドをコードしているエピトープタグ遺伝子を宿主CHO細胞において発現させてもよい。PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710をコードしている遺伝子はpRK5ベクターからサブクローニングしてもよい。サブクローン挿入物はPCR増幅を受けてバキュロウイルス発現ベクター中にポリ-Hisタグ等の選択されたエピトープタグとフレーム内で融合できる。ポリ-Hisタグ-[PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710)を含む培地を濃縮して、選択した方法によって精製することができる。

04、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710]をコードする遺伝子挿入物は、次いで、安定なクローンの選択のためのDHFR等の選択マーカーを含むSV40誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、CHO細胞をSV40誘導ベクターで（上記のように）形質移入することもできる。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。次いで、発現されたポリ-Hisタグー[PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710]をコードする発現遺伝子を含む培地を濃縮し、Ni²⁺-キレートアフィニティークロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる 10

PRO175、PRO198、PRO200、PRO202、PRO356、PRO364、PRO535、PRO861、PRO1304及びPRO1308は、上述の方法によりCHO細胞に置いて安定に発現された。さらに、PRO356、PRO364、PRO535及びPRO861は、CHO細胞において一過性の手法により発現された。

【0236】

実施例28

酵母菌でのPRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710をコードする核酸の発現 20

以下の方法は、酵母菌中でのPRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710をコードする遺伝子の組換え発現を記載する。

第1に、ADH2/GAPDHプロモーターからのPRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710の細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710をコードするDNA及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入して、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710をコードするDNA及びプロモーターを選択したプラスミドに、ADH2/GAPDHプロモーター、天然PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710シグナルペプチド又は他の哺乳類シグナルペプチドをコードするDNA、又は、例えば酵母菌アルファ因子又はインベルターゼ分泌シグナル/リーダー配列、及び（必要ならば）PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710をコードする遺伝子の発現のためのリンカ 50

一配列とともにクローニングすることができる。

酵母菌株 A B 1 1 0 等の酵母菌は、次いで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、10%トリクロロ酢酸での沈降及び SDS-PAGE による分離で分析し、次いでクマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。

続いて組換え PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882 又は PRO1710 は、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882 又は PRO1710 を含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。

【0237】

実施例 29

バキュロウイルス感染昆虫細胞での PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882 又は PRO1710 をコードする核酸の発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中における組換え発現を記載する。

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882 又は PRO1710 をコードする配列は、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。このようなエピトープタグは、ポリ-His タグ及び免疫グロブリンタグ (IgG の Fc 領域など) を含む。pVL1393 (Navogen) などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単には、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882 又は PRO1710 をコードする配列又は PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882 又は PRO1710 コード化配列の所望の部分 [膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列など] が、5' 及び 3' 領域に相補的なプライマーで PCR により増幅される。5' プライマーは、隣接する (選択された) 制限酵素部位を包含していてもよい。生成物は、次いで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

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

【0238】

次いで、発現されたポリ-His タグー [PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710] は、例えば、 Ni^{2+} -キレートアフィニティークロマトグラフィーにより以下のように精製される。抽出物は、Rupert等、Nature, 362:175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染した組み換えSf9細胞から調製した。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー (25mlのHepes、pH7.9; 12.5mMの MgCl_2 ; 0.1mMのEDTA; 10%のグリセロール; 0.1%のNP-40; 0.4MのKCl) 中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を負荷バッファー (50mMリン酸塩、300mM NaCl、10%のグリセロール、pH7.8) で50倍希釈し、0.45 μm フィルターで濾過した。 Ni^{2+} -NTAアガロースカラム (Qiagenから市販) を5mlの総容積で調製し、25mlの水で洗浄し、25mlの負荷バッファーで平衡させた。濾過した細胞抽出物は、毎分0.5mlでカラムに負荷した。カラムを、分画回収が始まる点である A_{280} のベースラインまで負荷バッファーで洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー (50mMのリン酸塩; 300mMのNaCl、10%のグリセロール、pH6.0) で洗浄した。 A_{280} のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で0から500mMのイミダゾール勾配で展開した。1mlの分画を回収し、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ (Qiagen) に複合した Ni^{2+} -NTAでのウェスタンブロットで分析した。溶離したHis₁₀-タグー [PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710] を含む分画をプールし、負荷バッファーで透析した。

【0239】

あるいは、IgGタグ (又はFcタグ) - [PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710] の精製は、例えば、プロテインA又はプロテインGカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

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

PCR増幅に続いて、対応するコード化配列をバキュロウイルス発現ベクター (IgG融合物に対するpb. PH. IgG及びポリ-His タグに対するpb. PH. His. c) にサブクローニングし、そのベクター及びBaculogold (登録商標) バキュロウイルスDNA (Pharmingen) を105スポドプテラグルヒペルダ (Spodoptera frugiperda) (「Sf9」) 細胞 (ATCC CRL 1711) にリポフェクチン (Gibco BRL) を用いて同時形質移入した。pb. PH. IgG及びPH. His. cは、市販のバキュロウイルス発現ベクターpVL1393 (Pharmingen) の修飾物であり、His又はFcタグ配列を含むように修飾されたポリリンカー領域を持つ。細胞を、10%のFBS (Hyclone) を添加したHinkのTNM-FM培地で成長させた。細胞は、28℃で5日間インキュベートした。上清を回収し、続いて10%FBSを添加したHinkのTNM-FH培地におけるSf9細胞感染による約10の感染効率 (MOI) での最初のウイルス増幅に用いた。細胞を28℃で3日間インキュベートした。上清を回収し、バキュロウイルス発現ベクターにおける

作成物の発現を、1 mlの上清の25 mLのヒスチジンタグタンパク質用のNi²⁺-NTAビーズ (Q I A G E N) 又はIgGタグタンパク質用のプロテインAセファロースCL-4Bビーズ (P h a r m a c i a) へのバッチ結合、次いでクマシーブルー染色により周知の濃度のタンパク質標準と比較するSDS-PAGE分析により測定した。

【0240】

第1のウイルス増幅上清をESF-921培地 (E x p r e s s i o n S y s t e m L L C) で成長させたSf9細胞のスピナー培地 (500 ml) の約0.1のMOIでの感染に使用した。細胞は28℃で3日間インキュベートした。上清を回収して濾過した。バッチ結合及びSDS-PAGEを、スピナー培地の発現が確認されるまで、必要に応じて繰り返した。

形質移入細胞からの条件培地 (0.5~3 L) を、遠心分離により細胞を除去し0.22ミクロンフィルターを通して濾過することにより回収した。ポリ-Hisタグ作成物については、タンパク質作製物をNi²⁺-NTAカラム (Q i a g e n) を用いて精製した。精製前に、イミダゾールを条件培地に5 mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3 MのNaCl及び5 mMイミダゾールを含む20 mMのHepes, pH 7.4バッファで平衡化した6 mlのNi²⁺-NTAカラムに4~5 ml/分の流速で4℃においてポンプ供給した。負荷後、カラムをさらに平衡バッファで洗浄し、タンパク質を0.25 Mイミダゾールを含む平衡バッファで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10 mMのHepes、0.14 MのNaCl及び4%のマニトールを含む貯蔵バッファ, pH 6.8中で25 mlのG25 Superfine (P h a r m a c i a) カラムを用いて脱塩し、-80℃で貯蔵した。

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

PRO175、PRO183及びP819は上述した手順によるバキュロウイルス感染昆虫Sf9細胞において発現していた。

【0241】

あるいは、修飾バキュロウイルス法をhigh-5細胞取り込みに使用してもよい。この方法では、所望の配列をコードするDNAは、Pfu (S t r a t a g e n e) 等の適当な系で増幅されても、又はバキュロウイルス発現ベクターの含まれるエピトープタグの上流 (5'-) に融合させてもよい。このようなエピトープタグは、ポリ-Hisタグ及び免疫グロブリンタグ (IgGのFc領域等) を含む。種々のプラスミドを用いることができ、pIE-1 (N o v a g e n) 等の市販のプラスミドから誘導されたプラスミドを含む。pIE-1及びpIE-2ベクターは、安定に形質転換された昆虫細胞におけるバキュロウイルスie1プロモーターからの組換えタンパク質の構成的発現のために設計される。このプラスミドは複数のクロニング部位の方向においてのみ相違し、未感染昆虫細胞におけるie1媒介遺伝子発現に重要であることが知られた全てのプロモーター配列並びにhr5エンハンサー成分を含む。pIE-1及びpIE-2は翻訳開始部位を含み、融合タンパク質の製造に使用できる。簡単には、所望の配列又は配列の所望の部分 (膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列など) を、5'及び3'領域に相補的なプライマーでのPCRにより増幅する。5'プライマーは隣接する (選択された) 制限酵素部位を導入してもよい。生成物は、次いで、選択された制限酵素で消化して発現ベクターにサブクロニングされる。例えば、pIE1-1の誘導体はヒトIgG (p b. P H. I g G) のFc領域又は8ヒスチジン (p b. P H. H i s) タグ下流 (3'-) を含

10

20

30

40

50

むことができる。好ましくは、ベクター作成物は確認のために配列決定される。

H i g h - 5細胞は、27℃、CO₂無し、pen/strep無しの条件下で50%の集密度まで成長させた。150mmプレート各々について、30μgの配列を含むp I E ベースベクターを1mlのEx-細胞培地（媒質：Ex-細胞401+1/100のL-Glu J R H B i o s c i e n c e s # 1 4 4 0 1 - 7 8 P（注：この媒質は光感受性））と混合し、別の管において、100μlのセルフェクチン（C e l l F E C T I N（G i b c o B R L # 1 0 3 6 2 - 0 1 0）（ボルテックスで混合））を1mlのEx-細胞培地と混合した。2つの溶液を混合し、室温で15分間インキュベーションした。8mlのEx-細胞培地を2mlのDNA/セルフェクチン混合物に添加し、Ex-細胞培地で1回洗浄したh i g h - 5細胞上に層形成させた。次いでプレートを暗中室温でインキュベートした。次いでDNA/セルフェクチン混合物を吸引し、細胞をEx-細胞で1回洗浄して過剰のセルフェクチンを除去し、30mlの新鮮なEx-細胞培地を添加し、細胞を28℃で3日間インキュベートした。上清を回収して、バキュロウイルス発現ベクターでの配列の発現を、1mlの上清の25mLのヒスチジンタグタンパク質用のNi²⁺-NTAビーズ（Q I A G E N）又はIgGタグタンパク質用のプロテインAセファロースCL-4Bビーズ（P h a r m a c i a）へのバッチ結合、次いでクマシーブルー染色により周知の濃度のタンパク質標準と比較するSDS-PAGE分析により測定した。

10

【0242】

形質移入細胞からの条件培地（0.5~3L）を、遠心分離により細胞を除去し0.22ミクロンフィルターを通して濾過することにより回収した。ポリ-H i s タグ作成物については、配列含有タンパク質をNi²⁺-NTAカラム（Q i a g e n）を用いて精製した。精製前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのNaCl及び5mMイミダゾールを含む20mMのH e p e s , p H 7 . 4 バッファーで平衡化した6mlのNi²⁺-NTAカラムに4-5ml/分の流速で48℃においてポンプ供給した。負荷後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのH e p e s , 0.14MのNaCl及び4%のマニトールを含む貯蔵バッファー、p H 6 . 8 中で25mlのG 2 5 S u p e r f i n e（P h a r m a c i a）を用いて脱塩し、-80℃で貯蔵した。

30

タンパク質のイムノアドヘシン（Fc含有）作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、20mMのリン酸ナトリウムバッファー、p H 6 . 8 で平衡化した5mlのプロテインAカラム（P h a r m a c i a）にポンプ供給した。負荷後、100mMのクエン酸、p H 3 . 5 で溶離する前にカラムを平衡バッファーで強く洗浄した。溶離したタンパク質は、1mlの画分を275mLの1Mトリスバッファー、p H 9 を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-H i s タグタンパク質について上述した貯蔵バッファー中で脱塩した。配列の均一性はSDSポリアクリルアミドゲル及びエドマン（E d m a n）分解によるN-末端アミノ酸配列決定及び所望又は必要に応じて他の分析手法により評価できる。

PRO175、PRO183、PRO198、PRO200、PRO356、PRO364、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710に結合する抗体の調製

40

【0243】

実施例30

PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710に結合する抗体の調製

この実施例は、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO35

50

6、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710に特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

モノクローナル抗体の生産のための技術は、この分野で知られており、例えば、上掲のGodingに記載されている。用いられ得る免疫原は、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710を含む精製PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710融合タンパク質、細胞表面にPRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710をコードする遺伝子を発現する細胞を含む。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなくすことができる。

Balb/c等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に1-100マイクログラムで注入したPRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をMP L-TDMアジュバント(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで10から12日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗-PRO175、抗-PRO200、抗-PRO198、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO535、抗-PRO819、抗-PRO1002、抗-PRO1308、抗-PRO1304、抗-PRO183、抗-PRO202、抗-PRO861、抗-PRO877、抗-PRO879、抗-PRO882又は抗-PRO1710抗体の検出のためのELISAアッセイで試験するために、レトロオービタル出血により血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「陽性」な動物に、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710の静脈内注射の最後の注入をすることができる。3から4日後、マウスを屠殺して脾臓細胞を取り出した。次いで脾臓細胞を(35%ポリエチレングリコールを用いて)、AC T Tから番号CRL1597で入手可能なP3X63AgU. 1等の選択されたマウス骨髓腫細胞系に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、HAT培地を含む96ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髓腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

ハイブリドーマ細胞は、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710に対する反応性についてのELISAでスクリーニングされる。PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「陽性」ハイブリドーマ細胞の決定は当業者の技量内のことである。

陽性ハイブリドーマ細胞を同系の B a l b / c マウスに腹腔内注入し、抗-PRO175、抗-PRO200、抗-PRO198、抗-PRO364、抗-PRO356、抗-PRO535、抗-PRO819、抗-PRO1002、抗-PRO1308、抗-PRO1304、抗-PRO183、抗-PRO202、抗-PRO861、抗-PRO877、抗-PRO879、抗-PRO882又は抗-PRO1710モノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインA又はプロテインGへの親和性に基づくアフィニティークロマトグラフィーを用いることもできる。

10

【0244】

材料の寄託

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

材料	ATCC寄託番号	寄託日
DNA19355-1150-1	209466	1997年11月18日
DNA29101-1122	209653	1998年 3月5日
DNA33457-1078	209283	1997年 9月18日
DNA47365-1206	209436	1997年 11月7日
DNA47470-1130-P1	209422	1997年10月28日
DNA49143-1429	203013	1998年 6月23日
DNA57695-1340	203006	1998年 6月23日
DNA59208-1373	209881	1998年 5月20日
DNA62306-1570	203254	1998年9月9日
DNA65406-1567	203219	1998年 9月15日

20

これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存培養物が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、何れが最初に来ようとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号886OG638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

30

本出願の譲受人は、寄託した材料の培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと速やかに取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると
考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの材料の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に変形することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

40

【図面の簡単な説明】

【Fig 1】天然配列PRO175cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:1)を示す

50

図であり、配列番号：1は、ここで「DNA19355-1150-1」と命名されるクローンである。

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

【Fig 3】天然配列PRO200cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：3）を示す図であり、配列番号：3は、ここで「DNA29101-1122」と命名されるクローンである。

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

【Fig 5】天然配列PRO198cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：5）を示す図であり、配列番号：5は、ここで「DNA33457-1078」と命名されるクローンである。 10

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

【Fig 7】天然配列PRO364cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：7）を示す図であり、配列番号：7は、ここで「DNA47365-1206」と命名されるクローンである。

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

【Fig 9】天然配列PRO356cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：9）を示す図であり、配列番号：9は、ここで「DNA47470-1130-P1」と命名されるクローンである。 20

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

【Fig 11】天然配列PRO535cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：11）を示す図であり、配列番号：11は、ここで「DNA49143-1429」と命名されるクローンである。

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

【Fig 13】天然配列PRO819cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：13）を示す図であり、配列番号：13は、ここで「DNA57695-1340」と命名されるクローンである。 30

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

【Fig 15】天然配列PRO1002cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：15）を示す図であり、配列番号：15は、ここで「DNA59208-1373」と命名されるクローンである。

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

【Fig 17】天然配列PRO1308cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：17）を示す図であり、配列番号：17は、ここで「DNA62306-1570」と命名されるクローンである。 40

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

【Fig 19】天然配列PRO1304cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：19）を示す図であり、配列番号：19は、ここで「DNA65406-1567」と命名されるクローンである。

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

【Fig 21】天然配列PRO183cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：21）を 50

示す図であり、配列番号：21は、ここで「DNA28498」と命名されるクローンである。

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

【Fig 23】天然配列PRO202cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：23）を示す図であり、配列番号：23は、ここで「DNA30869」と命名されるクローンである。

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

【Fig 25】天然配列PRO861cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：25）を示す図であり、配列番号：25は、ここで「DNA50798」と命名されるクローンである。 10

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

【Fig 27】天然配列PRO877cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：27）を示す図であり、配列番号：27は、ここで「DNA58120」と命名されるクローンである。

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

【Fig 29】天然配列PRO879cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：29）を示す図であり、配列番号：29は、ここで「DNA58122」と命名されるクローンである。 20

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

【Fig 31】天然配列PRO882cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：31）を示す図であり、配列番号：31は、ここで「DNA58125」と命名されるクローンである。

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

【Fig 33】天然配列PRO1710cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：33）を示す図であり、配列番号：33は、ここで「DNA82331」と命名されるクローンである。 30

【Fig 34】Fig 33に示した配列番号：33のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：34）を示す図である。

【図 2 1】

CCGACGGCTCCGGCGGACTCGCGAGTTCTGCCTCGCCGTCGACGCTCGCGCGCGGATCGCGGCGCGGGGCT
GTGGGCTGACTCCGACCCGAGCGAGCCAGTACGCGCGCGCGCGGAGCGCGCGCGGAGGAGGCTCGGAC
GGCTGCTGAGCGCCCTCTCTTGTGAGAGCCGAGTGGGAGAGCGCCGGCGAAAGCGAGGTAAAGGAGAC
CAAAAGCGGAGACTCGCGAGACACCGGACACCGGAGGAGAGGAGGAGGCGCAACCCAGAGAGGG
CGAGCAAAAGAACGGGTGGTGTGGGCGGTCTGGGCGAAGGCGGGGCTATCGCGACGCTGCTCATCCCTCA
GAAGAGGCAAGCGCGCGGAGCGGAGAAATCAACGCTCTGCAAGTGTGTACGACGCGCCAGCAAGGCAAGA
CCAGCTGCGGACAAAACAAGTTAAATGTCTTTCCCGGGTCAAACTCTTGCGCTCAAGAGAGAGCGCGAGA
AGAAGACAGAGCCTTCACTTTAAGGTATAGTTACCAAGCTATACAGCGGACAGAGCTACCACTTCGACGCT
CGAGCGGATGGAACTTATGATGGACCAAAATGAGGAGAGCACTTACACTCTTTTAACTCTATCCCTCG
TGGCTCTCGGCTGGTGGGTAATCGAGGATTAACCAAGCTCTTACTTTGGCAATGAACAGTAGAGGATAC
TTGTACACCTCGGAACCTTTACACCTGAAGTCAAAATCAAAAGATCAAGTCTTGAAGAAATATATATGTAC
ATATTATCAATGATATACCTCGACGAGCTCAGGCGAGGGTGTATCTGGGCTTGAACAAAGAGGAG
AGATCATGAAGGCAACCATCTCAAGAGAGCAAGCTCGACGCTCATTTCTGCCATAACCACTGAAAGTG
GCCATGTACAGGAGCCATCACTGCACGATCTCACGGAGTTTCTCCGATCTTGAAGCGGAGCCCAACCAAA
GAGCAGAGTGTCTCTGGCGTGTCAACGGAGGCAATTCATGAGCCAAATGAATCAAGTAAAGCGTGA
GGGCAAAAGAGGGGTCTGTAGACAACTTACCTCGAGGTCTGTGAATCTCTTAGCACTCTTCCG
CAAAAGTTCAAAATTTGCTAGTGAATTTACCAAAACAAAGGAGAGGATTCATATTTATCTTGCCATTAGA
CCTTCTTATCATCCATACTAAAC

【図 2 2】

MAAAIASLLIRKQAREERKSHACKCVSPSKGNTSCDKNNLVNFSHVKLFGSKRRRRRPEPQLKGIYT
KLVSRCYHLQLQAGDTTCTKDEISTYTLNPLIFVLNVAIQGVTKLILAHMSGLTITSELTFTPECK
FKESVFENITYTVSSMIYRQOQSGRWGLGNKEGETIMKXNVNFKNPAHFLEPKLVAMYTEPFLNDLT
EFSRSGSGTFTKSRSVSGVLNKGKSHMSHNEST

N-グリコシル化部位:	アミノ酸 242-246
グリコサミノグリカン付着部位:	アミノ酸 165-169, 218-222
チロシキナーゼリン酸化部位:	アミノ酸 93-100
N-ミリスチル化部位:	アミノ酸 87-93, 231-237
A T P / G T P 結合部位モチーフ A (α-ループ):	アミノ酸 231-239
H B G F / F G F ファミリータンパク質:	アミノ酸 78-94, 102-153

【図 2 5】

CGCGCGCGCGCGCTGCTGGGCGCGGCGGAGGATCGGCGCAGCGGCTCGGCGGCGAGGCTGCTGCCCT
CGGCGAGCGCTGCTAACTTCCCGCTCGGCTGCTGCTGCTGCGCGGCGCGCGGCTCTCCCGCGGCTCT
CGGCTCGGGTCTCTCAGAGGCGCGAGCGGCTGCGCGGCTGCTGCTGCGCGCTGCGCGCGCGCGCGG
CTCCCGCGCTGCGCGCGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCTGCGGCGGCTAAGCGCGCTCTGCTGCTGT
GGCGCGCTTGTGCTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
CGAGGAGAACTGCGCGCGCTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
TGTTCGCCCACTTGGCGCTGGGCTTGGGAGTGGCGTGGCGGCGGTACACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
CGGCTGCTACCGCGCGCGCGGCGGTGGAAGCGCGCGTGCACACACTGATGACAGGCGAGCGGTGACCCCAAC
AGCTGGCGGAGATCGAGGCGCTCAGGAGAGCGCGTGCAGCGCTCTGACAGGAGCAGCGGTGACCCCAAC
AACAGCTTCAAGCGCGCTGTAGCGCGCATGACCGCGAGTGGCTTGCAGAAGCACTTGCACAAATTCGAGACCG
GAGCAGCAGTGGGGGAGATGAGGTCAATGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
CTTGCAGAGCGAGGTCAAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
TACATCATCCCATCCCAACTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
T
GGGCGAGCGTGGCAAGTCTGTGTGTGTGACCGCGGAGACGGGGTGAAGCTTCCGCGGCGCGCTGGAGCCAAA
GGGGAGCGCTGGACTGCCACAGCTGGCTGACAGCTTTTCGAGAGCTAGAGCGCTGCCAGCGCGCGAGGACTCA
GGGCGCTCTGCTACTCTCTGTGCTTGTGAGCGCTGCGAGCGTGAAGTGGAGTTGAGTCTGAGTCTGTG
TCTGTGCTGTGCGCGCGAGAGCTTCTCCCAAAATGCGCTGTGTGAGTGTGCGGTGTGCGGTGTGCTGTG
GTTTGTGAGCATGGCTGCGCGCTTGGGATAGCGAGAGCGTGGGTGTTCTTCTTGTGCTTACACAGCCCA
AGAGGACTGAGACTGGCACTTAGCCCAAGAGGTGTGAGCGCTGTGTGTGTTCCAGATGCACTCTGGATTCA
CTACTCTACTCATTTCTTACTCATCCAGCGACTTAAACATTTTACTGACCATGTACTAGTGCCAGCTC
TAGTTTTAGCGCTTGGGAGGTTTTATTCTGACTTCTCTGATTTTGGCATGTGGAGACACTCTTATAAGGA
GAGTTCAAGCGCTTGGGAGTACAAAAATCTCATTTCCAGAGGTGAGGAGGAGAGAGACATTTACTTTGACCA
TCTGCTCTCTCTTCAAGCTTACCGAGGCTGGAGGCTTAAAGAGCGCTGGCTGAGTGAAGTGAATGTG
CAGAGCTCCAGACCGCACTCCCAAGCTTGAAGCTTGGCGAGCTTCCCTTCTCTCTTCTCCCGAGCGCTTCC
TTTGGGTCTGGTTGTGCAACCATCTGCTTGGTGTGCTGCGAGTGAAGCGCTGCTGTGGGAGGAGGAGG
GGGTCAAGAGGAGACTTGAAGCAGCAGAGGCTAGGAGGTGGGGTACATTTCTGAGCAGTCAAGGTGGG
AAGAGAGATGCAAGAGTGCAGCTGAATGTGCTCAATAGGAGAGAGCCAGCTGCTAGGAGGATGAGGGGCTTC
GTGCTGCTGTGCTTACCGCATTTGTGGTCAAGCCATGAGGAGTCAAGGAGGAGTGAATCTTCAAGTGT
GCTGCTGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CTCCCTGGGCGATCTTCTGCGCTGAGCTGGATGGAGAGAGCTTAGGAACTTACAGTGTGGCATGATGTCT
TTTCTCTTTTTCTTTTTTTTACAAAAACAGACAAAAACAAAAATGTCCAAA

【図 2 6】

AGCTCCAGCTGACCAACGGAATGCTGTTCTCTGACGAGGGCGTGAAGCTCCCAACAGGCGAGCTGCTCT
CCACAAACAGCTTCCACAGAGATGAGAGTCCCGGTGGTGGCAITTCCTTTCTCTCTCTCATCAGCTGCG
CCTAGGAGCAAGAGCTGAATCTCTCTACGCGGAGCTTACACACCTCGAGGTGCTGCTTACTTACATGAT
CCTACAGATCCCGCTTACGCGGATATGAGTATTAATGAGACCAAGCGAGTGTCTCCAAACCGGAAAT
GTCTTTCATCACAAAAGGGGCAATTCGCTGTGATCAACCCAGTGAAGTGGGTCCAGGAGCATATATCAA
G
GACATCAAGGAGAGACTGAGTGAACCGCAAGGGGTGGCGAAGGACAGCTTCAAGAGACATAAAGAGAGATGC
CAAGCGCCCTCTCTGACCGACCGCTAATCTTACGCGCGAGTCACTCTT

【図 2 7】

MKISVAAIPFFLLITIALCTKTESSRRGPHSPCCFTTYYTIPQRIMDYETNSQSKFQIVFTIKRG
HSVCTNPQDKMVQDIYDKMKN

シグナル配列:	アミノ酸 1-22

【図 2 3】

CACGCTGACTGCGCGCGGAGAAAGCCAGTGGGAACCCAGAGCCATAGAGAGACCGGCTCCCGGCTCGGG
CTGGCGAGCGCGCGGCTATGAGAGTTCTCTGGGCGCCTCTCTGGGCTGTGTGTGAGTCTGGCGCTGCG
TGATCGCCACACCGCTCTTCTGGAGAGTTCAAAATCCCAAGTCCGAATGAGGACTACACCATATGTGCG
AGCTGAATGACTACGTGGAGACTCATCTGTCGCGACTATGAAAGTCACTCTGCGGAGAGCTGCCATGGAG
CAGTACATCTGTACTGTTGGAGCATGAGGAGTACCACTGTCGACGCGCGCGATCCCAAGGACCAAGTCCG
CTGGCGTGCACCGCGCGCTGTCGAAGCATGCGCGCGGAGAGTCTGTGAGAAAGTTCGAGGCTTGTACAC
CTTACGCTGGGCGAGGAGTTCAAAAGGACAGCAGCTACTACTACTTCCAAACCATCTCCAGCGNT
GAAGACCGCTGCTTGAAGTTGAAGGTGACTCTCACTGCGCAAAATCACTACAGTCTCGAGCGCATGACAA
T
CCACAGGAGAGAAGAGACTTGCAGCAGATGACCCAGAGGTGCGGTTCTACATACCATCGGTACAGTGTGCG
CCGCGCTCTTCCCACTTGGCTGGAGCTGCTGCTGCTCTCCACTTCTGTGTGTGCAAAACCCGCTGAGGT
GTGTGCCACACCTGCGCTTAAAGAGGAGCAGGCTGAGAGAGGAGGACAGGCACTCCAAACCTGTCTTGGGG
CACTTTCAGAGCGCCGAGCGCTTGGGAACCACTCCCAACACAGGCAATAGGTATCACTTACAGCTCTAA
CGGTCATATTAAGTCTTTCACGCGGAGAGGCGCACAGCGCGCGAGCTGCCATCTCCACCTCCAGCTC
CGAGGAGTGCAGAAAGAAAGTGGAGACAGTCTTCTCCACCATCTTCCGCTTTAAGCGCAAGAAAGAGGTG
TGCAGCATGCTGCTTCTAAGGCGACAGTGGGAGCTGAGCTGGAAGGGGCGCACGTGGATGGGCAAGCTTCT
AAAGATGCGCGCTTCAAGGAGAGCGCAGGATGCGCAGATGAACAGTGAAGGAGAAAGCAAGAAACAGTCT
CTTGTCTGGAGCGCAGTGAAGGAGGCGAGCATGCTTGGGCTGACCCAGCATCTCCGAGCAAGCATCTAT
CTGTGAGCTGCGCACAGAGAGATTTGTAGCGAGGTACTGACTTCTGCTGCTGCGGCGAGCATCTCCCA
GAGCTGTGCGCGAGCGGCGCTGCGCAACCTGTTCTTAGAGTGTAGTGTAGGCGCACTGCCCATGTGTA
CATTTGCTGCTAGAGTGTAGCTTAAAGGCGAGGCGCGAGGTGTATAGTATCTATATAAGTTGCTGTGTGT
CTGCTCTGATTTCTACAACTGGAGTTTTTTTATACAAATGTTCTTGTCTCAAAATAAAGCAATGTGTGTTT
TCGG

【図 2 4】

MEPLMAPLLGLCCSLAAADRHITVFNSSNPFERNEDYTIHVQLNDYVDIICPHYEDRSVADAAEQYLILY
VEHBEYQLCQPSKQDQVRWQNRPSAXHGEPLSEKFRFTPTFLTGKREHSHYIYISKPINQHEDRCLR
LKVTVSGKITHSPPQAHNPFQEKRLAADPEVRLHSHIGHSAAPHLPLAWTVLLPLLLLTQT

シグナル配列:	アミノ酸 1-17
N-グリコシル化部位:	アミノ酸 26-30
チロシキナーゼリン酸化部位:	アミノ酸 118-127
N-ミリスチル化部位:	アミノ酸 10-16

【図 2 8】

CCACAGGAGGAAAGTGAAGGTCTCGGTGGCTGCCCTCTCTGCTCATGCTGTGTGCTGTCTTGGATCCCA
G
GCCAGGTTTACAAATGATGCGAGACAGAGGTTAATGATGTCAAAGCTTCCACTGGAAATCCAGTAGTCTT
GAACAGCTTTCACTTTGCTGCTGACTGCTGCGACCTCCCTACATCTCACAAGAGTATCCCGTGTCACTCATGA
AAATGATTTTGAACAGAGGAGCGAGTCTCAGAGCGAGGTGTCATCTTCCACAGAGAGGGGCGGCA
GTCTGTGCGCAACCAAGTGTCTCGAGGATTGAGATTAAGTGAATAAAGCTGAAGCGCTTACTCAATATATA
ATAAAGAGACAAAGAGGCGAGCGACCCACCTCCCAACACCTCTAGATCTGTATC

【図 2 9】

CCACAGGAGGAAAGTGAAGGTCTCGGTGGCTGCCCTCTCTGCTCATGCTGTGTGCTGTCTTGGATCCCA
G
GCCAGGTTTACAAATGATGCGAGACAGAGGTTAATGATGTCAAAGCTTCCACTGGAAATCCAGTAGTCTT
GAACAGCTTTCACTTTGCTGCTGACTGCTGCGACCTCCCTACATCTCACAAGAGTATCCCGTGTCACTCATGA
AAATGATTTTGAACAGAGGAGCGAGTCTCAGAGCGAGGTGTCACTTCTCCACAGAGAGGGGCGGCA
GTCTGTGCGCAACCAAGTGTCTCGAGGATTGAGATTAAGTGAATAAAGCTGAAGCGCTTACTCAATATATA
ATAAAGAGACAAAGAGGCGAGCGACCCACCTCCCAACACCTCTAGATCTGTATC

【図 3 0】

MKVSVAALSCLMLVAVLGSQAFTNDABETLMHMKLPLENPPVNLNPFADCCSTYSISQIPCLMKSYF
ETSESKPFGVILTKKRGVCAKPSGPGVQDMKMLKPYI

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

【図 3 1】

GTGAAGGAGCGGGATCAGCCAGGGCTCAGCAAGAGCGGAGGAGGAACTTGGAGAGACCCAGACT
GATTCCTCAGTCTCACTTCTTCCCACTTGAAGGCGCAAGATCGCTGAGACACAGAGCTTGGCGACTGCT
CATCAAAATCAGCTGAGCAGCTGCTGCTCAGGAATATGAGAGCTCTCAGGAGAGACCCCTTCCGGCTGCGCATCT
TCTCTGCGCGCGCTTGTGAGTGGTGGTGTGAGCGCGCGCGCTGAGCGACCGGGCTGCGACAGT
GAGCGCTGCGAGCTGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGCGCGCTGCGCGCGCTGCGCGCGCTGCGCGCG
GCGCGAGCTGAACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCTGCGCGCGCTGAGCGAGTGGCGCGCGCGCGCGCGCG
TGGCGCGCGCGCTGAGAGCTTGTGCGCGCGCTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
GCGCGCACCGCTCAGCGCGCTGCGCGCACCGGGGTCTTCCCGCGAGGTTCTGCGGTGCTGCGGTGCGG
CTCTTACCGCGAGTGGCTGAGCGCGACCGAGGCGAGCTTGGCGAGCTGCTGCGCGGGGCTCGCGCTGAG
GCGCGCGGAGAGCTGCGCGCGCGCTGCTGCGCGCGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
GCGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
GAGAGGAGGGGAGCGGCGAGGTTCTGCTGCGCGAGGCTGGGTTGAGTGGCGGATCCCAAGCACTGAGAG
CTTCAACCTCTGCGCTCAAGCATCTCTTCCGCTCAGCTTCCCAAGCACTGGGACTACAGGAGCAGCGCG
ACCCAGCGCGCTTAATTTTTTAAATTTTTTGTAGAGAGAGAGTGTGCGCATGTGCGCGAGGCTGGGT
TGAATCTCGGGCTCAAGCGCATCTTCCCGCTTACGCTTCCCAAGCGAGGAGTGAAGGCTGAGAGCT
TTCAGAGCTCTCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CGCTGAGTCTTACATTTTTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TTTACAGGCTTCTGCGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
ACATGTGTACATCTGAGCTTATCTCAAGGAGGTGACACCTCTCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TGT
GCTTCTCTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
GCTCTCTTCTGCTGAGCGCGCTGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT

【図 3 2】

MSRRREGSLEDPTDSSVSLPHLEAKIROTHSLAHLTKYAFQILLQEVVOLGGDPFGLPSFSPPRLPVAGL
SAPAPSHAGLPVHERLRLDAAALALPILLDAVCRRAEINFRAPRLRLLEDAARQARALGAVEALLAA
LGAANRGPRAEPPAATASAAATGVPFAKVLGLRVCCLYREWLSRTTEGDLGQLLPGGSA

N-ミリスチル化部位: アミノ酸 166-172; 174-180

ロシンジッパーパターン: アミノ酸 37-59

【図 3 3】

CCGAGCGCACCCGACCACTGGCCGGCCCCAGCCTCGCTTGCTGTCTGCTCGGCCCTCTGGCGCTGACCTCC
GCTTGCTACATCCAGAACTGCCCCCTGGGAGGCAAGAGGGCCGGCCGGACTCTGACGTGGCAAGTGCCCT
CCCTCGCGCCCCCGGGGCCAAGGGCCGCTGCTTCGGGCCCAATATCTGCTGCGCGGAAGAGCTGGGCTGCT
TCGTGGGACCCGDCGAAGCGCTGCGCTGCTCAGGAGGAGAACTACCTGGCGTCCCTTGCCAGTCCGGCCAG
AAGGCTGCGGGAGCGGGGGCGCTGCGCGTCTTGGGCTCTGCTGCAGCCCGACGGCTGCCAGCGCCAG
CCTGCTGCGGACGCGGAAGCCACTTCTCCAGCGCTGAACCTTGATGGCTCGGACACCCCTCGAAGCGC
GCCACTCGCTTCCCCATAGCCACCCAGAAATGGTGAAATAAAATAAAGCAGGTTTTTCTCCTCT

【図 3 4】

成熟オキシトシン:
CYIQNCPGGKRAAPDLDVAKCLPCGPGGKGRGFGPNICCAEELGCFVGTAEALPCQEENYLPSPCQSGQK
ACGSGGRCAVLGLCCSPDGHADPACDAEATFSQR

プロオキシトシン:
MAGPSLACCLLGLLALTSACYIQNCPGGKRAAPDLDVAKCLPCGPGGKGRGFGPNICCAEELGCFVGTAE
ALRCQEENYLPSPCQSGQKACGSGGRCAVLGLCCSPDGHADPACDAEATFSQR

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(10) International Publication Number

(43) International Publication Date
7 December 2000 (07.12.2000)

PCT

WO 00/73445 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C12N 15/12, C07K 14/47, 14/52, A61K 38/17, C07K 16/18, G01N 33/53, C12Q 1/68, C12N 15/11, 15/86
- (71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US00/13705
- (72) Inventors; and
(73) Inventors/Applicants (for US only): ASHIKENAZI, Avi, J. [US/US]; 1456 Tarrytown Street, San Mateo, CA 94402 (US); BAKER, Kevin, P. [GB/US]; 14006 Indian Run Drive, Darnestown, MD 20878 (US); FERRARA, Napoleone [US/US]; 2090 Pacific Avenue #704, San Francisco, CA 94109 (US); GERBER, Hanspeter [CH/US]; 1121 Tennessee Street #5, San Francisco, CA 94107 (US); GERRITSEN, Mary, E. [CA/US]; 541 Parrott Drive, San Mateo, CA 94402 (US); GODDARD, Audrey [CA/US]; 110 Congo Street, San Francisco, CA 94131 (US); GODOVSKI, Paul, J. [US/US]; 2627 Easton Drive, Burlingame, CA 94010 (US); GURNEY, Austin, L. [US/US]; 1 Debbie Lane, Belmont, CA 94002 (US); KUO, Sophia, S. [US/US]; 59 Surrey Street #3, San Francisco, CA 94131 (US); MARK, Melanie, R. [US/US]; 958 B Chula Vista Avenue, Burlingame, CA 94010 (US); MARSTERS, Scott, A. [US/US]; 990 Cherry Street, San Carlos, CA 94070 (US); PAONI, Nicholas, E. [US/US]; 1756 Terrace Drive, Belmont, CA 94002 (US); PITT, Robert, M. [US/US]; 1110 Liberty Street, El Cerrito, CA 94530 (US); WATANABE, Colin, K. [US/US]; 128 Corliss Drive, Moraga, CA 94556 (US); WILLIAMS, P. Mickey [US/US]; 509 Alto Avenue, Half Moon Bay, CA 94019 (US); WOOD, William, I. [US/US]; 55 Southdown Court, Hillsborough, CA 94010 (US).
- (74) Agents: BARNES, Elizabeth, M. et al.; Genentech, Inc., MS49, 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 17 May 2000 (17.05.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
- | | | |
|----------------|-------------------------------|----|
| PCT/US99/12252 | 2 June 1999 (02.06.1999) | US |
| 60/141,037 | 23 June 1999 (23.06.1999) | US |
| 60/144,758 | 20 July 1999 (20.07.1999) | US |
| 60/145,698 | 26 July 1999 (26.07.1999) | US |
| 60/146,222 | 28 July 1999 (28.07.1999) | US |
| PCT/US99/20111 | 1 September 1999 (01.09.1999) | US |
| PCT/US99/28313 | 30 November 1999 (30.11.1999) | US |
| PCT/US99/28409 | 30 November 1999 (30.11.1999) | US |
| PCT/US99/28565 | 2 December 1999 (02.12.1999) | US |
| PCT/US99/29095 | 16 December 1999 (16.12.1999) | US |
| PCT/US00/00219 | 5 January 2000 (05.01.2000) | US |
| PCT/US00/00376 | 6 January 2000 (06.01.2000) | US |
| PCT/US00/03565 | 11 February 2000 (11.02.2000) | US |
| PCT/US00/04341 | 18 February 2000 (18.02.2000) | US |
| PCT/US00/04342 | 18 February 2000 (18.02.2000) | US |
| PCT/US00/05004 | 24 February 2000 (24.02.2000) | US |
| PCT/US00/05841 | 2 March 2000 (02.03.2000) | US |
| PCT/US00/06319 | 10 March 2000 (10.03.2000) | US |
| PCT/US00/06884 | 15 March 2000 (15.03.2000) | US |
| PCT/US00/07532 | 21 March 2000 (21.03.2000) | US |
| PCT/US00/08439 | 30 March 2000 (30.03.2000) | US |

[Continued on next page]

WO 00/73445 A2

(54) Title: PROMOTION OR INHIBITION OF ANGIOGENESIS AND CARDIOVASCULARIZATION

(57) Abstract: Compositions and methods are disclosed for stimulating or inhibiting angiogenesis and/or cardiovascularization in mammals, including humans. Pharmaceutical compositions are based on polypeptides or antagonists thereto that have been identified for one or more of these uses. Disorders that can be diagnosed, prevented, or treated by the compositions herein include trauma such as wounds, various cancers, and disorders of the vessels including atherosclerosis and cardiac hypertrophy. In addition, the present invention is directed to novel polypeptides and to nucleic acid molecules encoding those polypeptides. Also provided herein are vectors and host cells comprising those nucleic acid sequences, chimeric polypeptide molecules comprising the polypeptides of the present invention fused to heterologous polypeptide sequences, antibodies which bind to the polypeptides of the present invention and to methods for producing the polypeptides of the present invention.

WO 00/73445 A2



(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— With (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description.

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

Without international search report and to be republished upon receipt of that report.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

PROMOTION OR INHIBITION OF ANGIOGENESIS AND CARDIOVASCULARIZATION

Background of the invention

5 Field of the Invention

The present invention relates to compositions and methods useful for promoting or inhibiting angiogenesis and/or cardiovascularization in mammals in need of such biological effect. This includes the diagnosis and treatment of cardiovascular disorders as well as oncological disorders.

10 Description of Background

A. Cardiac Disorders and Factors

Heart failure affects approximately five million Americans, and new cases of heart failure number about 400,000 each year. It is the single most frequent cause of hospitalization for people age 65 and older in the United States. Recent advances in the management of acute cardiac diseases, including acute myocardial infarction, are resulting in an expanding patient population that will eventually develop chronic heart failure. From 1979 to 1995, hospitalizations for congestive heart failure (CHF) rose from 377,000 to 872,000 (a 130 percent increase) and CHF deaths increased 116 percent.

CHF is a syndrome characterized by left ventricular dysfunction, reduced exercise tolerance, impaired quality of life, and markedly shortened life expectancy. The sine qua non of heart failure is an inability of the heart to pump blood at a rate sufficient to meet the metabolic needs of the body's tissues (in other words, there is insufficient cardiac output).

At least four major compensatory mechanisms are activated in the setting of heart failure to boost cardiac output, including peripheral vasoconstriction, increased heart rate, increased cardiac contractility, and increased plasma volume. These effects are mediated primarily by the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system. See, Eichhorn, *American Journal of Medicine*, 104: 163-169 (1998). Increased output from the sympathetic nervous system increases vascular tone, heart rate, and contractility. Angiotensin II elevates blood pressure by 1) directly stimulating vascular smooth muscle contraction, 2) promoting plasma volume expansion by stimulating aldosterone and antidiuretic hormone secretion, 3) stimulating sympathetic-mediated vascular tone, and 4) catalyzing the degradation of bradykinin, which has vasodilatory and natriuretic activity. See, review by Brown and Vaughan, *Circulation*, 97: 1411-1420 (1998). As noted below, angiotensin II may also have directly deleterious effects on the heart by promoting myocyte necrosis (impairing systolic function) and intracardiac fibrosis (impairing diastolic and in some cases systolic function). See, Weber, *Circulation*, 96: 4065-4082 (1998).

A consistent feature of congestive heart failure (CHF) is cardiac hypertrophy, an enlargement of the heart that is activated by both mechanical and hormonal stimuli and enables the heart to adapt to demands for increased cardiac output. Morgan and Baker, *Circulation*, 83: 13-25 (1991). This hypertrophic response is frequently

WO 00/73445

PCT/US00/13705

associated with a variety of distinct pathological conditions such as hypertension, aortic stenosis, myocardial infarction, cardiomyopathy, valvular regurgitation, and intracardiac shunt, all of which result in chronic hemodynamic overload.

Hypertrophy is generally defined as an increase in size of an organ or structure independent of natural growth that does not involve tumor formation. Hypertrophy of the heart is due either to an increase in the mass of the individual cells (myocytes), or to an increase in the number of cells making up the tissue (hyperplasia), or both. While the enlargement of an embryonic heart is largely dependent on an increase in myocyte number (which continues until shortly after birth), post-natal cardiac myocytes lose their proliferative capacity. Further growth occurs through hypertrophy of the individual cells.

Adult myocyte hypertrophy is initially beneficial as a short term response to impaired cardiac function by permitting a decrease in the load on individual muscle fibers. With severe, long standing overload, however, the hypertrophied cells begin to deteriorate and die. Katz, "Heart Failure", in: Katz A.M. ed., Physiology of the Heart (New York: Raven Press, 1992) pp. 638-668. Cardiac hypertrophy is a significant risk factor for both mortality and morbidity in the clinical course of heart failure. Katz, Trends Cardiovasc. Med., 5: 37-44 (1995). For further details of the causes and pathology of cardiac hypertrophy see, e.g., Heart Disease, A Textbook of Cardiovascular Medicine, Braunwald, E. ed. (W.B. Saunders Co., 1988), Chapter 14, "Pathophysiology of Heart Failure."

On a cellular level, the heart is composed of myocytes and surrounding support cells, generically called non-myocytes. While non-myocytes are primarily fibroblast/mesenchymal cells, they also include endothelial and smooth muscle cells. Indeed, although myocytes make up most of the adult myocardial mass, they represent only about 30% of the total cell numbers present in heart. In response to hormonal, physiological, hemodynamic, and pathological stimuli, adult ventricular muscle cells can adapt to increased workloads through the activation of a hypertrophic process. This response is characterized by an increase in myocyte cell size and contractile protein content of individual cardiac muscle cells, without concomitant cell division and activation of embryonic genes, including the gene for atrial natriuretic peptide (ANP). Chien *et al.*, FASEB J., 5: 3037-3046 (1991); Chien *et al.*, Annu. Rev. Physiol., 55: 77-95 (1993). An increment in myocardial mass as a result of an increase in myocyte size that is associated with an accumulation of interstitial collagen within the extracellular matrix and around intramyocardial coronary arteries has been described in left ventricular hypertrophy secondary to pressure overload in humans. Caspari *et al.*, Cardiovasc. Res., 11: 554-558 (1977); Schwarz *et al.*, Am. J. Cardiol., 42: 895-903 (1978); Hess *et al.*, Circulation, 63: 360-371 (1981); Pearlman *et al.*, Lab. Invest., 46: 158-164 (1982).

It has also been suggested that paracrine factors produced by non-myocyte supporting cells may additionally be involved in the development of cardiac hypertrophy, and various non-myocyte derived hypertrophic factors, such as, leukocyte inhibitory factor (LIF) and endothelin, have been identified. Metcalfe, Growth Factors, 2: 169-173 (1992); Kurzrock *et al.*, Endocrine Reviews, 12: 208-217 (1991); Inoue *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2863-2867 (1989); Yanagisawa and Masaki, Trends Pharm. Sci., 10: 374-378 (1989); U.S. Patent No. 5,573,762 (issued November 12, 1996). Further exemplary factors that have been identified as potential mediators of cardiac hypertrophy include cardiotropin-1 (CT-1) (Pennica *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 1142-1146 (1995)), catecholamines, adrenocorticosteroids, angiotensin, and prostaglandins.

At present, the treatment of cardiac hypertrophy varies depending on the underlying cardiac disease.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Catecholamines, adrenocorticosteroids, angiotensin, prostaglandins, IIF, endothelin (including endothelin-1, -2, and -3 and big endothelin), and CT-1 are among the factors identified as potential mediators of hypertrophy. For example, beta-adrenergic receptor blocking drugs (beta-blockers, e.g., propranolol, timolol, tertalolol, carvedilol, nadolol, betaxolol, penbutolol, acetabutolol, atenolol, metoprolol, carvedilol, etc.) and verapamil have been used extensively in the treatment of hypertrophic cardiomyopathy. The beneficial effects of beta-blockers on symptoms (e.g., chest pain) and exercise tolerance are largely due to a decrease in the heart rate with a consequent prolongation of diastole and increased passive ventricular filling. Thompson *et al.*, *Br. Heart J.*, 44: 488-98 (1980); Harrison *et al.*, *Circulation*, 29: 84-98 (1964). Verapamil has been described to improve ventricular filling and probably reducing myocardial ischemia. Bonow *et al.*, *Circulation*, 72: 853-64 (1985).

Nifedipine and diltiazem have also been used occasionally in the treatment of hypertrophic cardiomyopathy. Lottell *et al.*, *Circulation*, 65: 499-507 (1982); Betocchi *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 78: 451-457 (1996). However, because of its potent vasodilating properties, nifedipine may be harmful, especially in patients with outflow obstruction. Disopyramide has been used to relieve symptoms by virtue of its negative inotropic properties. Pollick, *N. Engl. J. Med.*, 307: 997-999 (1982). In many patients, however, the initial benefits decrease with time. Wigle *et al.*, *Circulation*, 92: 1680-1692 (1995). Antihypertensive drug therapy has been reported to have beneficial effects on cardiac hypertrophy associated with elevated blood pressure. Examples of drugs used in antihypertensive therapy, alone or in combination, are calcium antagonists, e.g., nitrendipine; adrenergic receptor blocking agents, e.g., those listed above; angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors such as quinapril, captopril, enalapril, ramipril, benazepril, fosinopril, and lisinopril; diuretics, e.g., chlorothiazide, hydrochlorothiazide, hydroflumethiazide, methychlorothiazide, benzthiazide, dichlorophenamide, acetazolamide, and indapamide; and calcium channel blockers, e.g., diltiazem, nifedipine, verapamil, and nicardipine.

For example, treatment of hypertension with diltiazem and captopril showed a decrease in left ventricular muscle mass, but the Doppler indices of diastolic function did not normalize. Szlachetka *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 63: 198-201 (1989); Shah *et al.*, *Lancet*, 336: 458-461 (1990). These findings were interpreted to indicate that excessive amounts of interstitial collagen may remain after regression of left ventricular hypertrophy. Rossi *et al.*, *Am. Heart J.*, 124: 700-709 (1992). Rossi *et al.*, *supra*, investigated the effect of captopril on the prevention and regression of myocardial cell hypertrophy and interstitial fibrosis in pressure overload cardiac hypertrophy, in experimental rats.

Agents that increase cardiac contractility directly (inotropic agents) were initially thought to benefit patients with heart failure because they improved cardiac output in the short term. However, all positive inotropic agents except digoxigenin have been found to result in increased long-term mortality, in spite of short-term improvements in cardiac performance. Massie, *Curr. Op. in Cardiology*, 12: 209-217 (1997); Reddy *et al.*, *Curr. Opin. Cardiol.*, 12: 233-241 (1997). Beta-adrenergic receptor blockers have recently been advocated for use in heart failure. Evidence from clinical trials suggests that improvements in cardiac function can be achieved without increased mortality, though documented improvements patient survival have not yet been demonstrated. See also, U.S. Pat. Nos. 5,935,924, 5,624,806; 5,661,122; and 5,610,134 and WO 95/28173 regarding the use of cardiotropin-I or antagonists thereof, or growth hormone and/or insulin-like growth factor-I in the treatment of CHF. Another treatment modality is heart transplantation, but this is limited by the availability of donor hearts.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Endothelin is a vasoconstricting peptide comprising 21 amino acids, isolated from swine arterial endothelial culture supernatant and structurally determined. Yanagisawa *et al.*, *Nature*, 332: 411-415 (1988). Endothelin was later found to exhibit various actions, and endothelin antibodies as endothelin antagonists have proven effective in the treatment of myocardial infarction, renal failure, and other diseases. Since endothelin is present in live bodies and exhibits vasoconstricting action, it is expected to be an endogenous factor involved in the regulation of the circulatory system, and may be associated with hypertension, cardiovascular diseases such as myocardial infarction, and renal diseases such as acute renal failure. Endothelin antagonists are described, for example, in U.S. Pat. No. 5,773,414; JP Pat. Publ. 3130299/1991, EP 457,195; EP 460,679; and EP 552,489. A new endothelin B receptor for identifying endothelin receptor antagonists is described in U.S. Pat. No. 5,773,223.

Current therapy for heart failure is primarily directed to using angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, such as captopril, and diuretics. These drugs improve hemodynamic profile and exercise tolerance and reduce the incidence of morbidity and mortality in patients with CHF. Kramer *et al.*, *Circulation*, 67(4): 807-816 (1983); Captopril Multicenter Research Group, *J.A.C.C.*, 2(4): 755-763 (1983); The CONSENSUS Trial Study Group, *N. Engl. J. Med.*, 316(23): 1429-1435 (1987); The SOLVD Investigators, *N. Engl. J. Med.*, 325(5): 293-302 (1991). Further, they are useful in treating hypertension, left ventricular dysfunction, atherosclerotic vascular disease, and diabetic nephropathy. Brown and Vaughan, *supra*. However, despite proven efficacy, response to ACE inhibitors has been limited. For example, while prolonging survival in the setting of heart failure, ACE inhibitors appear to slow the progression towards end-stage heart failure, and substantial numbers of patients on ACE inhibitors have functional class III heart failure.

Moreover, improvement of functional capacity and exercise time is only small and mortality, although reduced, continues to be high. The CONSENSUS Trial Study Group, *N. Engl. J. Med.*, 316(23): 1429-1435 (1987); The SOLVD Investigators, *N. Engl. J. Med.*, 325(5): 293-302 (1991); Cohn *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 323(5): 303-310 (1991); The Captopril-Digoxin Multicenter Research Group, *JAMA*, 259(4): 539-544 (1988). Hence, ACE inhibitors consistently appear unable to relieve symptoms in more than 60% of heart failure patients and reduce mortality of heart failure only by approximately 15-20%. For further adverse effects, see Brown and Vaughan, *supra*.

An alternative to ACE inhibitors is represented by specific AT₁ receptor antagonists. Clinical studies are planned to compare the efficacy of these two modalities in the treatment of cardiovascular and renal disease. However, animal model data suggests that the ACE/Ang II pathway, while clearly involved in cardiac hypertrophy, is not the only, or even the primary pathway active in this role. Mouse genetic "knockout" models have been made to test individual components of the pathway. In one such model, the primary cardiac receptor for Ang II, AT sub 1A, has been genetically deleted; these mice do not develop hypertrophy when Ang II is given experimentally (confirming the basic success of the model in eliminating hypertrophy secondary to Ang II). However, when the aorta is constricted in these animals (a model of hypertensive cardiac stress), the hearts still become hypertrophic. This suggests that alternative signaling pathways, not depending on this receptor (AT sub 1A), are activated in hypertension. ACE inhibitors would presumably not be able to inhibit these pathways. See, Harada *et al.*, *Circulation*, 92: 1952-1959 (1998). See also, Honey, *Circulation*, 97: 1890-1892 (1998) regarding the enigma associated with the process and mechanism of cardiac hypertrophy.

WO 00/73445

PCT/US00/13785

About 750,000 patients suffer from acute myocardial infarction (AMI) annually, and approximately one-fourth of all deaths in the United States are due to AMI. In recent years, thrombolytic agents, e.g., streptokinase, urokinase, and in particular tissue plasminogen activator (t-PA) have significantly increased the survival of patients who suffered myocardial infarction. When administered as a continuous intravenous infusion over 1.5 to 4 hours, t-PA produces coronary patency at 90 minutes in 69% to 90% of the treated patients. Topol *et al.*, Am. J. Cardiol., **61**: 723-728 (1988); Neuhaus *et al.*, J. Am. Coll. Cardiol., **12**: 581-587 (1988); Neuhaus *et al.*, J. Am. Coll. Cardiol., **14**: 1566-1569 (1989). The highest patency rates have been reported with high dose or accelerated dosing regimens. Topol, J. Am. Coll. Cardiol., **15**: 922-924 (1990). t-PA may also be administered as a single bolus, although due to its relatively short half-life, it is better suited for infusion therapy. Tebbe *et al.*, Am. J. Cardiol., **64**: 448-453 (1989). A t-PA variant, specifically designed to have longer half-life and very high fibrin specificity, TNK t-PA (a T103N, N117Q, K118R(296-299)AAAA t-PA variant; Keyt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**: 3670-3674 (1994)) is particularly suitable for bolus administration. However, despite all these advances, the long-term prognosis of patient survival depends greatly on the post-infarction monitoring and treatment of the patients, which should include monitoring and treatment of cardiac hypertrophy.

B. Growth Factors

Various naturally occurring polypeptides reportedly induce the proliferation of endothelial cells. Among those polypeptides are the basic and acidic fibroblast growth factors (FGF) (Burgess and Maciag, Annual Rev. Biochem., **58**: 575 (1989)), platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) (Ishikawa *et al.*, Nature, **338**: 557 (1989)), and vascular endothelial growth factor (VEGF). Leung *et al.*, Science, **246**: 1306 (1989); Ferrara and Henzel, Biochem. Biophys. Res. Commun., **161**: 851 (1989); Tischer *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **165**: 1198 (1989); EP 471,754B granted July 31, 1996.

Media conditioned by cells transfected with the human VEGF (hVEGF) cDNA promoted the proliferation of capillary endothelial cells, whereas control cells did not. Leung *et al.*, Science, **246**: 1306 (1989). Several additional cDNAs were identified in human cDNA libraries that encode 121-, 189-, and 206-amino acid isoforms of hVEGF (also collectively referred to as hVEGF-related proteins). The 121-amino acid protein differs from hVEGF by virtue of the deletion of the 44 amino acids between residues 116 and 159 in hVEGF. The 189-amino acid protein differs from hVEGF by virtue of the insertion of 24 amino acids at residue 116 in hVEGF, and apparently is identical to human vascular permeability factor (hVPF). The 206-amino acid protein differs from hVEGF by virtue of an insertion of 41 amino acids at residue 116 in hVEGF. Houck *et al.*, Mol. Endocrin., **5**: 1806 (1991); Ferrara *et al.*, J. Cell. Biochem., **47**: 211 (1991); Ferrara *et al.*, Endocrine Reviews, **13**: 18 (1992); Keck *et al.*, Science, **246**: 1309 (1989); Connolly *et al.*, J. Biol. Chem., **264**: 20017 (1989); EP 370,989 published May 30, 1990.

It is now well established that angiogenesis, which involves the formation of new blood vessels from preexisting endothelium, is implicated in the pathogenesis of a variety of disorders. These include solid tumors and metastasis, atherosclerosis, retrolental fibroplasia, hemangiomas, chronic inflammation, intraocular neovascular syndromes such as proliferative retinopathies, e.g., diabetic retinopathy, age-related macular degeneration (AMD), neovascular glaucoma, immune rejection of transplanted corneal tissue and other tissues, rheumatoid arthritis, and

WO 00/73445

PCT/US00/13705

psoriasis. Folkman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **267**: 10931-10934 (1992); Klagsbrun *et al.*, *Annu. Rev. Physiol.*, **53**: 217-239 (1991); and Garner A., "Vascular diseases". In: *Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach*. Garner A., Kliniworth CK, eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710.

In the case of tumor growth, angiogenesis appears to be crucial for the transition from hyperplasia to neoplasia, and for providing nourishment to the growing solid tumor. Folkman *et al.*, *Nature*, **339**: 58 (1989). The neovascularization allows the tumor cells to acquire a growth advantage and proliferative autonomy compared to the normal cells. Accordingly, a correlation has been observed between density of microvessels in tumor sections and patient survival in breast cancer as well as in several other tumors. Weidner *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **324**: 1-6 (1991); Horak *et al.*, *Lancet*, **340**: 1120-1124 (1992); Mauchiarini *et al.*, *Lancet*, **340**: 145-146 (1992).

The search for positive regulators of angiogenesis has yielded many candidates, including aFGF, bFGF, TGF- α , TGF- β , HGF, TNF- α , angiogenin, IL-8, etc. Folkman *et al.*, *J.B.C.*, *supra*, and Klagsbrun *et al.*, *supra*. The negative regulators so far identified include thrombospondin (Good *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 6624-6628 (1990)), the 16-kilodalton N-terminal fragment of prolactin (Clapp *et al.*, *Endocrinology*, **133**: 1292-1299 (1993)), angiotensin (O'Reilly *et al.*, *Cell*, **79**: 315-328 (1994)), and endostatin. O'Reilly *et al.*, *Cell*, **88**: 277-285 (1996).

Work done over the last several years has established the key role of VEGF, not only in stimulating vascular endothelial cell proliferation, but also in inducing vascular permeability and angiogenesis. Ferrara *et al.*, *Endocr. Rev.*, **18**: 4-25 (1997). The finding that the loss of even a single VEGF allele results in embryonic lethality points to an irreplaceable role played by this factor in the development and differentiation of the vascular system. Furthermore, VEGF has been shown to be a key mediator of neovascularization associated with tumors and intraocular disorders. Ferrara *et al.*, *Endocr. Rev.*, *supra*. The VEGF mRNA is overexpressed by the majority of human tumors examined. Berkman *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **91**: 153-159 (1993); Brown *et al.*, *Human Pathol.*, **26**: 86-91 (1995); Brown *et al.*, *Cancer Res.*, **53**: 4727-4735 (1993); Matsumi *et al.*, *Brit. J. Cancer*, **73**: 931-934 (1996); Dvorak *et al.*, *Am. J. Pathol.*, **146**: 1029-1039 (1995).

Also, the concentration levels of VEGF in eye fluids are highly correlated to the presence of active proliferation of blood vessels in patients with diabetic and other ischemia-related retinopathies. Aiello *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **331**: 1480-1487 (1994). Furthermore, recent studies have demonstrated the localization of VEGF in choroidal neovascular membranes in patients affected by AMD. Lopez *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **37**: 855-868 (1996).

Anti-VEGF neutralizing antibodies suppress the growth of a variety of human tumor cell lines in nude mice (Kim *et al.*, *Nature*, **362**: 841-844 (1993); Warren *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **95**: 1789-1797 (1995); Bergström *et al.*, *Cancer Res.*, **56**: 4032-4039 (1996); Melnyk *et al.*, *Cancer Res.*, **56**: 921-924 (1996)) and also inhibit intraocular angiogenesis in models of ischemic retinal disorders. Adamis *et al.*, *Arch. Ophthalmol.*, **114**: 66-71 (1996). Therefore, anti-VEGF monoclonal antibodies or other inhibitors of VEGF action are promising candidates for the treatment of solid tumors and various intraocular neovascular disorders. Such antibodies are described, for example, in EP 817,648 published January 14, 1998 and in WO98/45331 and WO98/45332 both published October 15, 1998.

There exist several other growth factors and mitogens, including transforming oncogenes, that are capable of

WO 00/73445

PCT/US00/13705

rapidly inducing a complex set of genes to be expressed by certain cells. Lau and Nathans, Molecular Aspects of Cellular Regulation, 6: 165-202 (1991). These genes, which have been named immediate-early- or early-response genes, are transcriptionally activated within minutes after contact with a growth factor or mitogen, independent of *de novo* protein synthesis. A group of these intermediate-early genes encodes secreted, extracellular proteins that are needed for coordination of complex biological processes such as differentiation and proliferation, regeneration, and wound healing. Ryseck *et al.*, Cell Growth Differ., 2: 235-253 (1991).

Highly-related proteins that belong to this group include *cef 10* (Simmons *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1178-1182 (1989)), *cyr 61*, which is rapidly activated by serum- or platelet-derived growth factor (PDGF) (O'Brien *et al.*, Mol. Cell Biol., 10: 3569-3577 (1990)), human connective tissue growth factor (CTGF) (Bradham *et al.*, J. Cell Biol., 114: 1285-1294 (1991)), which is secreted by human vascular endothelial cells in high levels after activation with transforming growth factor beta (TGF- β), exhibits PDGF-like biological and immunological activities, and competes with PDGF for a particular cell surface receptor, *fisp-12* (Ryseck *et al.*, Cell Growth Differ., 2: 235-233 (1991)), human vascular IBP-like growth factor (VIGF) (WO 96/17931), and *nov*, normally arrested in adult kidney cells, which was found to be overexpressed in myeloblastosis-associated-virus type-1-induced nephroblastomas. Joliet *et al.*, Mol. Cell Biol., 12: 10-21 (1992).

The expression of these immediate-early genes acts as "third messengers" in the cascade of events triggered by growth factors. It is also thought that they are needed to integrate and coordinate complex biological processes, such as differentiation and wound healing in which cell proliferation is a common event.

As additional mitogens, insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) have been shown, in complex with insulin-like growth factor (IGF), to stimulate increased binding of IGF to fibroblast and smooth muscle cell surface receptors. Clemmons *et al.*, J. Clin. Invest., 77: 1548 (1986). Inhibitory effects of IGFBP on various IGF actions *in vitro* include stimulation of glucose transport by adipocytes, sulfate incorporation by chondrocytes, and thymidine incorporation in fibroblast. Zapf *et al.*, J. Clin. Invest., 63: 1077 (1979). In addition, inhibitory effects of IGFBPs on growth factor-mediated mitogen activity in normal cells have been shown.

C. Need for Further Treatments

In view of the role of vascular endothelial cell growth and angiogenesis in many diseases and disorders, it is desirable to have a means of reducing or inhibiting one or more of the biological effects causing these processes. It is also desirable to have a means of assaying for the presence of pathogenic polypeptides in normal and diseased conditions, and especially cancer. Further, in a specific aspect, as there is no generally applicable therapy for the treatment of cardiac hypertrophy, the identification of factors that can prevent or reduce cardiac myocyte hypertrophy is of primary importance in the development of new therapeutic strategies to inhibit pathophysiological cardiac growth. While there are several treatment modalities for various cardiovascular and oncologic disorders, there is still a need for additional therapeutic approaches.

Summary of the Invention

A. Embodiments

Accordingly, the present invention concerns compositions and methods for promoting or inhibiting

WO 00/73445

PCT/US00/13705

angiogenesis and/or cardiovascularization in mammals. The present invention is based on the identification of proteins that test positive in various cardiovascular assays that test promotion or inhibition of certain biological activities. Accordingly, the proteins are believed to be useful drugs for the diagnosis and/or treatment (including prevention) of disorders where such effects are desired, such as the promotion or inhibition of angiogenesis, inhibition or stimulation of vascular endothelial cell growth, stimulation of growth or proliferation of vascular endothelial cells, inhibition of tumor growth, inhibition of angiogenesis-dependent tissue growth, stimulation of angiogenesis-dependent tissue growth, inhibition of cardiac hypertrophy and stimulation of cardiac hypertrophy, e.g., for the treatment of congestive heart failure.

In one embodiment, the present invention provides a composition comprising a PRO polypeptide in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier. In one aspect, the composition comprises a therapeutically effective amount of the polypeptide. In another aspect, the composition comprises a further active ingredient, namely, a cardiovascular, endothelial or angiogenic agent or an angiostatic agent, preferably an angiogenic or angiostatic agent. Preferably, the composition is sterile. The PRO polypeptide may be administered in the form of a liquid pharmaceutical formulation, which may be preserved to achieve extended storage stability. Preserved liquid pharmaceutical formulations might contain multiple doses of PRO polypeptide, and might, therefore, be suitable for repeated use.

In a further embodiment, the present invention provides a method for preparing such a composition useful for the treatment of a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder comprising admixing a therapeutically effective amount of a PRO polypeptide with a pharmaceutically acceptable carrier.

In another embodiment, the present invention provides a composition comprising an agonist or antagonist of a PRO polypeptide in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier. In one aspect, the composition comprises a therapeutically effective amount of the agonist or antagonist. In another aspect, the composition comprises a further active ingredient, namely, a cardiovascular, endothelial or angiogenic agent or an angiostatic agent, preferably an angiogenic or angiostatic agent. Preferably, the composition is sterile. The PRO polypeptide agonist or antagonist may be administered in the form of a liquid pharmaceutical formulation, which may be preserved to achieve extended storage stability. Preserved liquid pharmaceutical formulations might contain multiple doses of a PRO polypeptide agonist or antagonist, and might, therefore, be suitable for repeated use.

In a further embodiment, the present invention provides a method for preparing such a composition useful for the treatment of a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder comprising admixing a therapeutically effective amount of a PRO polypeptide or agonist or antagonist with a pharmaceutically acceptable carrier.

In yet another embodiment, the present invention concerns a composition comprising an anti-PRO antibody in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier. In one aspect, the composition comprises a therapeutically effective amount of the antibody. In another aspect, the composition comprises a further active ingredient, namely, a cardiovascular, endothelial or angiogenic agent or an angiostatic agent, preferably an angiogenic or angiostatic agent. Preferably, the composition is sterile. The composition may be administered in the form of a liquid pharmaceutical formulation, which may be preserved to achieve extended storage stability. Preserved liquid pharmaceutical formulations might contain multiple doses of the anti-PRO antibody, and might, therefore, be suitable for repeated use. In preferred embodiments, the antibody is a monoclonal antibody, an antibody fragment,

WO 00/73445

PCT/US00/13705

a humanized antibody, or a single-chain antibody.

In a further embodiment, the present invention provides a method for preparing such a composition useful for the treatment of a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder comprising admixing a therapeutically effective amount of an anti-PRO antibody with a pharmaceutically acceptable carrier.

- 5 In a still further aspect, the present invention provides an article of manufacture comprising:
- (a) a composition of matter comprising a PRO polypeptide or agonist or antagonist thereof;
 - (b) a container containing said composition; and
 - (c) a label affixed to said container, or a package insert included in said container referring to the use of said PRO polypeptide or agonist or antagonist thereof in the treatment of a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder, wherein the agonist or antagonist may be an antibody which binds to the PRO polypeptide. The composition may comprise a therapeutically effective amount of the PRO polypeptide or the agonist or antagonist thereof.

In another embodiment, the present invention provides a method for identifying an agonist of a PRO polypeptide comprising:

- 15 (a) contacting cells and a test compound to be screened under conditions suitable for the induction of a cellular response normally induced by a PRO polypeptide; and
- (b) determining the induction of said cellular response to determine if the test compound is an effective agonist, wherein the induction of said cellular response is indicative of said test compound being an effective agonist.

- 20 In another embodiment, the present invention provides a method for identifying an agonist of a PRO polypeptide comprising:

(a) contacting cells and a test compound to be screened under conditions suitable for the stimulation of cell proliferation by a PRO polypeptide; and

- (b) measuring the proliferation of said cells to determine if the test compound is an effective agonist, wherein the stimulation of cell proliferation is indicative of said test compound being an effective agonist.

In another embodiment, the invention provides a method for identifying a compound that inhibits the activity of a PRO polypeptide comprising contacting a test compound with a PRO polypeptide under conditions and for a time sufficient to allow the test compound and polypeptide to interact and determining whether the activity of the PRO polypeptide is inhibited. In a specific preferred aspect, either the test compound or the PRO polypeptide is immobilized on a solid support. In another preferred aspect, the non-immobilized component carries a detectable label. In a preferred aspect, this method comprises the steps of:

- (a) contacting cells and a test compound to be screened in the presence of a PRO polypeptide under conditions suitable for the induction of a cellular response normally induced by a PRO polypeptide; and
- (b) determining the induction of said cellular response to determine if the test compound is an effective antagonist.

In another preferred aspect, this process comprises the steps of:

(a) contacting cells and a test compound to be screened in the presence of a PRO polypeptide under conditions suitable for the stimulation of cell proliferation by a PRO polypeptide; and

WO 00/73445

PCT/US00/13705

(b) measuring the proliferation of the cells to determine if the test compound is an effective antagonist.

In another embodiment, the invention provides a method for identifying a compound that inhibits the expression of a PRO polypeptide in cells that normally expresses the polypeptide, wherein the method comprises contacting the cells with a test compound and determining whether the expression of the PRO polypeptide is inhibited. In a preferred aspect, this method comprises the steps of:

(a) contacting cells and a test compound to be screened under conditions suitable for allowing expression of the PRO polypeptide; and

(b) determining the inhibition of expression of said polypeptide.

In a still further embodiment, the invention provides a compound that inhibits the expression of a PRO polypeptide, such as a compound that is identified by the methods set forth above.

Another aspect of the present invention is directed to an agonist or an antagonist of a PRO polypeptide which may optionally be identified by the methods described above.

One type of antagonist of a PRO polypeptide that inhibits one or more of the functions or activities of the PRO polypeptide is an antibody. Hence, in another aspect, the invention provides an isolated antibody that binds a PRO polypeptide. In a preferred aspect, the antibody is a monoclonal antibody, which preferably has non-human complementarity-determining-region (CDR) residues and human framework-region (FR) residues. The antibody may be labeled and may be immobilized on a solid support. In a further aspect, the antibody is an antibody fragment, a single-chain antibody, or a humanized antibody. Preferably, the antibody specifically binds to the polypeptide.

In a still further aspect, the present invention provides a method for diagnosing a disease or susceptibility to a disease which is related to a mutation in a PRO polypeptide-encoding nucleic acid sequence comprising determining the presence or absence of said mutation in the PRO polypeptide nucleic acid sequence, wherein the presence or absence of said mutation is indicative of the presence of said disease or susceptibility to said disease.

In a still further aspect, the invention provides a method of diagnosing a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in a mammal which comprises analyzing the level of expression of a gene encoding a PRO polypeptide (a) in a test sample of tissue cells obtained from said mammal, and (b) in a control sample of known normal tissue cells of the same cell type, wherein a higher or lower expression level in the test sample as compared to the control sample is indicative of the presence of a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in said mammal. The expression of a gene encoding a PRO polypeptide may optionally be accomplished by measuring the level of mRNA or the polypeptide in the test sample as compared to the control sample.

In a still further aspect, the present invention provides a method of diagnosing a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in a mammal which comprises detecting the presence or absence of a PRO polypeptide in a test sample of tissue cells obtained from said mammal, wherein the presence or absence of said PRO polypeptide in said test sample is indicative of the presence of a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in said mammal.

In a still further embodiment, the invention provides a method of diagnosing a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in a mammal comprising (a) contacting an anti-PRO antibody with a test sample of tissue cells obtained from the mammal, and (b) detecting the formation of a complex between the antibody and the PRO

WO 00/73445

PCT/US00/13705

polypeptide in the test sample, wherein the formation of said complex is indicative of the presence of a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in the mammal. The detection may be qualitative or quantitative, and may be performed in comparison with monitoring the complex formation in a control sample of known normal tissue cells of the same cell type. A larger or smaller quantity of complexes formed in the test sample indicates the presence of a cardiovascular, endothelial or angiogenic dysfunction in the mammal from which the test tissue cells were obtained. The antibody preferably carries a detectable label. Complex formation can be monitored, for example, by light microscopy, flow cytometry, fluorimetry, or other techniques known in the art. The test sample is usually obtained from an individual suspected to have a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder.

In another embodiment, the invention provides a method for determining the presence of a PRO polypeptide in a sample comprising exposing a sample suspected of containing the PRO polypeptide to an anti-PRO antibody and determining binding of said antibody to a component of said sample. In a specific aspect, the sample comprises a cell suspected of containing the PRO polypeptide and the antibody binds to the cell. The antibody is preferably detectably labeled and/or bound to a solid support.

In further aspects, the invention provides a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder diagnostic kit comprising an anti-PRO antibody and a carrier in suitable packaging. Preferably, such kit further comprises instructions for using said antibody to detect the presence of the PRO polypeptide. Preferably, the carrier is a buffer, for example. Preferably, the cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder is cancer.

In yet another embodiment, the present invention provides a method for treating a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in a mammal comprising administering to the mammal an effective amount of a PRO polypeptide. Preferably, the disorder is cardiac hypertrophy, trauma such as wounds or burns, or a type of cancer. In a further aspect, the mammal is further exposed to angioplasty or a drug that treats cardiovascular, endothelial or angiogenic disorders such as ACE inhibitors or chemotherapeutic agents if the cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder is a type of cancer. Preferably, the mammal is human, preferably one who is at risk of developing cardiac hypertrophy and more preferably has suffered myocardial infarction.

In another preferred aspect, the cardiac hypertrophy is characterized by the presence of an elevated level of $\text{PGI}_{2\text{re}}$. Alternatively, the cardiac hypertrophy may be induced by myocardial infarction, wherein preferably the administration of the PRO polypeptide is initiated within 48 hours, more preferably within 24 hours, following myocardial infarction.

In another preferred embodiment, the cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder is cardiac hypertrophy and said PRO polypeptide is administered together with a cardiovascular, endothelial or angiogenic agent. The preferred cardiovascular, endothelial or angiogenic agent for this purpose is selected from the group consisting of an antihypertensive drug, an ACE inhibitor, an endothelin receptor antagonist and a thrombolytic agent. If a thrombolytic agent is administered, preferably the PRO polypeptide is administered following administration of such agent. More preferably, the thrombolytic agent is recombinant human tissue plasminogen activator.

In another preferred aspect, the cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder is cardiac hypertrophy and the PRO polypeptide is administered following primary angioplasty for the treatment of acute myocardial infarction, preferably wherein the mammal is further exposed to angioplasty or a cardiovascular, endothelial, or angiogenic agent.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

In another preferred embodiment, the cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder is a cancer and the PRO polypeptide is administered in combination with a chemotherapeutic agent, a growth inhibitory agent or a cytotoxic agent.

5 In a further embodiment, the invention concerns a method for treating a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in a mammal comprising administering to the mammal an effective amount of an agonist of a PRO polypeptide. Preferably, the cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder is cardiac hypertrophy, trauma, a cancer, or age-related macular degeneration. Also preferred is where the mammal is human, and where an effective amount of an angiogenic or angiostatic agent is administered in conjunction with the agonist.

10 In a further embodiment, the invention concerns a method for treating a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in a mammal comprising administering to the mammal an effective amount of an antagonist of a PRO polypeptide. Preferably, the cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder is cardiac hypertrophy, trauma, a cancer, or age-related macular degeneration. Also preferred is where the mammal is human, and where an effective amount of an angiogenic or angiostatic agent is administered in conjunction with the antagonist.

15 In a further embodiment, the invention concerns a method for treating a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in a mammal comprising administering to the mammal an effective amount of an anti-PRO antibody. Preferably, the cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder is cardiac hypertrophy, trauma, a cancer, or age-related macular degeneration. Also preferred is where the mammal is human, and where an effective amount of an angiogenic or angiostatic agent is administered in conjunction with the antibody.

20 In still further embodiments, the invention provides a method for treating a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in a mammal that suffers therefrom comprising administering to the mammal a nucleic acid molecule that codes for either (a) a PRO polypeptide, (b) an agonist of a PRO polypeptide or (c) an antagonist of a PRO polypeptide, wherein said agonist or antagonist may be an anti-PRO antibody. In a preferred embodiment, the mammal is human. In another preferred embodiment, the gene is administered via *ex vivo* gene therapy. In a further preferred embodiment, the gene is comprised within a vector, more preferably an adenoviral, adeno-associated viral, lentiviral, or retroviral vector.

25 In yet another aspect, the invention provides a recombinant retroviral particle comprising a retroviral vector consisting essentially of a promoter, nucleic acid encoding (a) a PRO polypeptide, (b) an agonist polypeptide of a PRO polypeptide, or (c) an antagonist polypeptide of a PRO polypeptide, and a signal sequence for cellular secretion of the polypeptide, wherein the retroviral vector is in association with retroviral structural proteins. Preferably, the signal sequence is from a mammal, such as from a native PRO polypeptide.

30 In a still further embodiment, the invention supplies an *ex vivo* producer cell comprising a nucleic acid construct that expresses retroviral structural proteins and also comprises a retroviral vector consisting essentially of a promoter, nucleic acid encoding (a) a PRO polypeptide, (b) an agonist polypeptide of a PRO polypeptide or (c) an antagonist polypeptide of a PRO polypeptide, and a signal sequence for cellular secretion of the polypeptide, wherein said producer cell packages the retroviral vector in association with the structural proteins to produce recombinant retroviral particles.

35 In yet another embodiment, the invention provides a method for inhibiting endothelial cell growth in a mammal comprising administering to the mammal (a) a PRO polypeptide, (b) an agonist of a PRO polypeptide, or (c) an

WO 00/73445

PCT/US00/13705

antagonist of a PRO polypeptide, wherein endothelial cell growth in said mammal is inhibited, and wherein said agonist or antagonist may be an anti-PRO antibody. Preferably, the mammal is human and the endothelial cell growth is associated with a tumor or a retinal disorder.

5 In yet another embodiment, the invention provides a method for stimulating endothelial cell growth in a mammal comprising administering to the mammal (a) a PRO polypeptide, (b) an agonist of a PRO polypeptide, or (c) an antagonist of a PRO polypeptide, wherein endothelial cell growth in said mammal is stimulated, and wherein said agonist or antagonist may be an anti-PRO antibody. Preferably, the mammal is human.

10 In yet another embodiment, the invention provides a method for inhibiting cardiac hypertrophy in a mammal comprising administering to the mammal (a) a PRO polypeptide, (b) an agonist of a PRO polypeptide, or (c) an antagonist of a PRO polypeptide, wherein cardiac hypertrophy in said mammal is inhibited, and wherein said agonist or antagonist may be an anti-PRO antibody. Preferably, the mammal is human and the cardiac hypertrophy has been induced by myocardial infarction.

15 In yet another embodiment, the invention provides a method for stimulating cardiac hypertrophy in a mammal comprising administering to the mammal (a) a PRO polypeptide, (b) an agonist of a PRO polypeptide, or (c) an antagonist of a PRO polypeptide, wherein cardiac hypertrophy in said mammal is stimulated, and wherein said agonist or antagonist may be an anti-PRO antibody. Preferably, the mammal is human who suffers from congestive heart failure.

20 In yet another embodiment, the invention provides a method for inhibiting angiogenesis induced by a PRO polypeptide in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of an anti-PRO antibody to the mammal. Preferably, the mammal is a human, and more preferably the mammal has a tumor or a retinal disorder.

25 In yet another embodiment, the invention provides a method for stimulating angiogenesis induced by a PRO polypeptide in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of a PRO polypeptide to the mammal. Preferably, the mammal is a human, and more preferably angiogenesis would promote tissue regeneration or wound healing.

30 In yet another embodiment, the invention provides a method for inhibiting endothelial cell growth in a mammal comprising administering to the mammal a PRO175, PRO183, PRO198, PRO202, PRO364, PRO535, PRO819, PRO877, PRO879, PRO1002 or PRO1304 polypeptide or agonist thereof, wherein endothelial cell growth in said mammal is inhibited.

35 In yet another embodiment, the invention provides a method for stimulating endothelial cell growth in a mammal comprising administering to the mammal a PRO356, PRO861, PRO1308 or PRO1710 polypeptide or agonist thereof, wherein endothelial cell growth in said mammal is stimulated.

In yet another embodiment, the invention provides a method for inhibiting endothelial cell growth in a mammal comprising administering to the mammal an antagonist of a PRO356, PRO861, PRO1308 or PRO1710 polypeptide, wherein endothelial cell growth in said mammal is inhibited.

In yet another embodiment, the invention provides a method for stimulating endothelial cell growth in a mammal comprising administering to the mammal an antagonist of a PRO175, PRO183, PRO198, PRO202, PRO364, PRO535, PRO819, PRO877, PRO879, PRO1002 or PRO1304 polypeptide, wherein endothelial cell

WO 00/73445

PCT/US00/13705

growth in said mammal is stimulated.

In yet another embodiment, the invention provides a method for inducing cardiac hypertrophy in a mammal comprising administering to the mammal a PRO183, PRO200, PRO202, or PRO882 polypeptide or agonist thereof, wherein cardiac hypertrophy in said mammal is induced.

5 In yet another embodiment, the invention provides a method for reducing cardiac hypertrophy in a mammal comprising administering to the mammal an antagonist of a PRO183, PRO200, PRO202, or PRO882 polypeptide, wherein cardiac hypertrophy in said mammal is reduced.

In yet another embodiment, the invention provides a method for inhibiting angiogenesis induced by a PRO861 polypeptide comprising administering a therapeutically effective amount of an anti-PRO861 antibody to the mammal, wherein said angiogenesis is inhibited.

10 In yet another embodiment, the invention provides a method for stimulating angiogenesis induced by a PRO861 polypeptide comprising administering a therapeutically effective amount of said polypeptide to the mammal, wherein said angiogenesis is stimulated.

15 In yet another embodiment, the invention provides a method for inhibiting angiogenesis in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of PRO198, PRO877, PRO1002 or PRO1304 polypeptide to the mammal, wherein said angiogenesis is inhibited.

In yet another embodiment, the invention provides a method for stimulating angiogenesis in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of an anti-PRO198, anti-PRO877, anti-PRO1002 or anti-PRO1304 polypeptide to the mammal, wherein said angiogenesis is stimulated.

20

B. Additional Embodiments

In other embodiments of the present invention, the invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that encodes a PRO polypeptide.

25 In one aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule encoding a PRO polypeptide having a full-length amino acid sequence as disclosed herein, an amino acid sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a transmembrane protein, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined

35

WO 00/73445

PCT/US00/13705

fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In other aspects, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule comprising the coding sequence of a full-length PRO polypeptide cDNA as disclosed herein, the coding sequence of a PRO polypeptide lacking the signal peptide as disclosed herein, the coding sequence of an extracellular domain of a transmembrane PRO polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or the coding sequence of any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In a further aspect, the invention concerns an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule that encodes the same mature polypeptide encoded by any of the human protein cDNAs deposited with the ATCC as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

Another aspect of the present invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding a PRO polypeptide which is either transmembrane domain-deleted or transmembrane domain-inactivated, or is complementary to such encoding nucleotide sequence, wherein the transmembrane domain(s) of such polypeptide are disclosed herein. Therefore, soluble extracellular domains of the herein

WO 00/73445

PCT/US00/13765

described PRO polypeptides are contemplated.

Another embodiment is directed to fragments of a PRO polypeptide coding sequence, or the complement thereof, that may find use as, for example, hybridization probes, for encoding fragments of a PRO polypeptide that may optionally encode a polypeptide comprising a binding site for an anti-PRO antibody or as antisense oligonucleotide probes. Such nucleic acid fragments are usually at least about 20 nucleotides in length, alternatively at least about 30 nucleotides in length, alternatively at least about 40 nucleotides in length, alternatively at least about 50 nucleotides in length, alternatively at least about 60 nucleotides in length, alternatively at least about 70 nucleotides in length, alternatively at least about 80 nucleotides in length, alternatively at least about 90 nucleotides in length, alternatively at least about 100 nucleotides in length, alternatively at least about 110 nucleotides in length, alternatively at least about 120 nucleotides in length, alternatively at least about 130 nucleotides in length, alternatively at least about 140 nucleotides in length, alternatively at least about 150 nucleotides in length, alternatively at least about 160 nucleotides in length, alternatively at least about 170 nucleotides in length, alternatively at least about 180 nucleotides in length, alternatively at least about 190 nucleotides in length, alternatively at least about 200 nucleotides in length, alternatively at least about 250 nucleotides in length, alternatively at least about 300 nucleotides in length, alternatively at least about 350 nucleotides in length, alternatively at least about 400 nucleotides in length, alternatively at least about 450 nucleotides in length, alternatively at least about 500 nucleotides in length, alternatively at least about 600 nucleotides in length, alternatively at least about 700 nucleotides in length, alternatively at least about 800 nucleotides in length, alternatively at least about 900 nucleotides in length and alternatively at least about 1000 nucleotides in length, wherein in this context the term "about" means the referenced nucleotide sequence length plus or minus 10% of that referenced length. It is noted that novel fragments of a PRO polypeptide-encoding nucleotide sequence may be determined in a routine manner by aligning the PRO polypeptide-encoding nucleotide sequence with other known nucleotide sequences using any of a number of well known sequence alignment programs and determining which PRO polypeptide-encoding nucleotide sequence fragment(s) are novel. All of such PRO polypeptide-encoding nucleotide sequences are contemplated herein. Also contemplated are the PRO polypeptide fragments encoded by these nucleotide molecule fragments, preferably those PRO polypeptide fragments that comprise a binding site for an anti-PRO antibody.

In another embodiment, the invention provides an isolated PRO polypeptide encoded by any of the isolated nucleic acid sequences hereinabove identified.

In a certain aspect, the invention concerns an isolated PRO polypeptide, comprising an amino acid sequence having at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81% amino acid sequence identity, alternatively at least about 82% amino acid sequence identity, alternatively at least about 83% amino acid sequence identity, alternatively at least about 84% amino acid sequence identity, alternatively at least about 85% amino acid sequence identity, alternatively at least about 86% amino acid sequence identity, alternatively at least about 87% amino acid sequence identity, alternatively at least about 88% amino acid sequence identity, alternatively at least about 89% amino acid sequence identity, alternatively at least about 90% amino acid sequence identity, alternatively at least about 91% amino acid sequence identity, alternatively at least about 92% amino acid sequence identity, alternatively at least about 93% amino acid sequence identity, alternatively at least about 94% amino acid

WO 00/73445

PCT/US00/13705

sequence identity, alternatively at least about 95% amino acid sequence identity, alternatively at least about 96% amino acid sequence identity, alternatively at least about 97% amino acid sequence identity, alternatively at least about 98% amino acid sequence identity and alternatively at least about 99% amino acid sequence identity to a PRO polypeptide having a full-length amino acid sequence as disclosed herein, an amino acid sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a transmembrane protein, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein.

In a further aspect, the invention concerns an isolated PRO polypeptide comprising an amino acid sequence having at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81% amino acid sequence identity, alternatively at least about 82% amino acid sequence identity, alternatively at least about 83% amino acid sequence identity, alternatively at least about 84% amino acid sequence identity, alternatively at least about 85% amino acid sequence identity, alternatively at least about 86% amino acid sequence identity, alternatively at least about 87% amino acid sequence identity, alternatively at least about 88% amino acid sequence identity, alternatively at least about 89% amino acid sequence identity, alternatively at least about 90% amino acid sequence identity, alternatively at least about 91% amino acid sequence identity, alternatively at least about 92% amino acid sequence identity, alternatively at least about 93% amino acid sequence identity, alternatively at least about 94% amino acid sequence identity, alternatively at least about 95% amino acid sequence identity, alternatively at least about 96% amino acid sequence identity, alternatively at least about 97% amino acid sequence identity, alternatively at least about 98% amino acid sequence identity and alternatively at least about 99% amino acid sequence identity to an amino acid sequence encoded by any of the human protein cDNAs deposited with the ATCC as disclosed herein.

In a further aspect, the invention concerns an isolated PRO polypeptide comprising an amino acid sequence scoring at least about 80% positives, alternatively at least about 81% positives, alternatively at least about 82% positives, alternatively at least about 83% positives, alternatively at least about 84% positives, alternatively at least about 85% positives, alternatively at least about 86% positives, alternatively at least about 87% positives, alternatively at least about 88% positives, alternatively at least about 89% positives, alternatively at least about 90% positives, alternatively at least about 91% positives, alternatively at least about 92% positives, alternatively at least about 93% positives, alternatively at least about 94% positives, alternatively at least about 95% positives, alternatively at least about 96% positives, alternatively at least about 97% positives, alternatively at least about 98% positives and alternatively at least about 99% positives when compared with the amino acid sequence of a PRO polypeptide having a full-length amino acid sequence as disclosed herein, an amino acid sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a transmembrane protein, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein.

In a specific aspect, the invention provides an isolated PRO polypeptide without the N-terminal signal sequence and/or the initiating methionine and is encoded by a nucleotide sequence that encodes such an amino acid sequence as hereinbefore described. Processes for producing the same are also herein described, wherein those processes comprise culturing a host cell comprising a vector which comprises the appropriate encoding nucleic acid molecule under conditions suitable for expression of the PRO polypeptide and recovering the PRO polypeptide from

WO 00/73445

PCT/US00/13705

the cell culture.

Another aspect of the invention provides an isolated PRO polypeptide which is either transmembrane domain-deleted or transmembrane domain-inactivated. Processes for producing the same are also herein described, wherein those processes comprise culturing a host cell comprising a vector which comprises the appropriate encoding nucleic acid molecule under conditions suitable for expression of the PRO polypeptide and recovering the PRO polypeptide from the cell culture.

In yet another embodiment, the invention concerns agonists and antagonists of a native PRO polypeptide as defined herein. In a particular embodiment, the agonist or antagonist is an anti PRO antibody or a small molecule.

In a further embodiment, the invention concerns a method of identifying agonists or antagonists to a PRO polypeptide which comprise contacting the PRO polypeptide with a candidate molecule and monitoring a biological activity mediated by said PRO polypeptide. Preferably, the PRO polypeptide is a native PRO polypeptide.

In a still further embodiment, the invention concerns a composition of matter comprising a PRO polypeptide, or an agonist or antagonist of a PRO polypeptide as herein described, or an anti-PRO antibody, in combination with a carrier. Optionally, the carrier is a pharmaceutically acceptable carrier.

Another embodiment of the present invention is directed to the use of a PRO polypeptide, or an agonist or antagonist thereof as hereinbefore described, or an anti-PRO antibody, for the preparation of a medicament useful in the treatment of a condition which is responsive to the PRO polypeptide, an agonist or antagonist thereof or an anti-PRO antibody.

In additional embodiments of the present invention, the invention provides vectors comprising DNA encoding any of the herein described polypeptides. Host cell comprising any such vector are also provided. By way of example, the host cells may be CHO cells, *E. coli*, yeast, or Baculovirus-infected insect cells. A process for producing any of the herein described polypeptides is further provided and comprises culturing host cells under conditions suitable for expression of the desired polypeptide and recovering the desired polypeptide from the cell culture.

In other embodiments, the invention provides chimeric molecules comprising any of the herein described polypeptides fused to a heterologous polypeptide or amino acid sequence. Example of such chimeric molecules comprise any of the herein described polypeptides fused to an epitope tag sequence or a Fc region of an immunoglobulin.

In yet another embodiment, the invention provides an antibody which specifically binds to any of the above or below described polypeptides. Optionally, the antibody is a monoclonal antibody, humanized antibody, antibody fragment or single-chain antibody.

In yet other embodiments, the invention provides oligonucleotide probes useful for isolating genomic and cDNA nucleotide sequences or as antisense probes, wherein those probes may be derived from any of the above or below described nucleotide sequences.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:1) of a native sequence PRO175 cDNA, wherein SEQ ID NO:1 is a clone designated herein as "DNA19355-1150-1".

WO 00/73445

PCT/US00/13785

Figure 2 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:2) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:1 shown in Figure 1.

Figure 3 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:3) of a native sequence PRO200 cDNA, wherein SEQ ID NO:3 is a clone designated herein as "DNA29101-1122".

5 Figure 4 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:4) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:3 shown in Figure 3.

Figure 5 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:5) of a native sequence PRO198 cDNA, wherein SEQ ID NO:5 is a clone designated herein as "DNA35157-1078".

10 Figure 6 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:6) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:5 shown in Figure 5.

Figure 7 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:7) of a native sequence PRO364 cDNA, wherein SEQ ID NO:7 is a clone designated herein as "DNA47365-1206".

Figure 8 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:8) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:7 shown in Figure 7.

15 Figure 9 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:9) of a native sequence PRO356 cDNA, wherein SEQ ID NO:9 is a clone designated herein as "DNA47470-1130-P1".

Figure 10 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:10) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:9 shown in Figure 9.

20 Figure 11 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:11) of a native sequence PRO535 cDNA, wherein SEQ ID NO:11 is a clone designated herein as "DNA49143-1429".

Figure 12 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:12) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:11 shown in Figure 11.

Figure 13 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:13) of a native sequence PRO819 cDNA, wherein SEQ ID NO:13 is a clone designated herein as "DNA57695-1340".

25 Figure 14 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:14) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:13 shown in Figure 13.

Figure 15 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:15) of a native sequence PRO1002 cDNA, wherein SEQ ID NO:15 is a clone designated herein as "DNA59208-1373".

30 Figure 16 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:16) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:15 shown in Figure 15.

Figure 17 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:17) of a native sequence PRO1308 cDNA, wherein SEQ ID NO:17 is a clone designated herein as "DNA62306-1570".

Figure 18 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:18) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:17 shown in Figure 17.

35 Figure 19 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:19) of a native sequence PRO1304 cDNA, wherein SEQ ID NO:19 is a clone designated herein as "DNA65406-1567".

Figure 20 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:20) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:19 shown in Figure 19.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Figure 21 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:21) of a native sequence PRO183 cDNA, wherein SEQ ID NO:21 is a clone designated herein as "DNA28498".

Figure 22 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:22) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:21 shown in Figure 21.

Figure 23 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:23) of a native sequence PRO302 cDNA, wherein SEQ ID NO:23 is a clone designated herein as "DNA30869".

Figure 24 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:24) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:23 shown in Figure 23.

Figure 25 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:25) of a native sequence PRO861 cDNA, wherein SEQ ID NO:25 is a clone designated herein as "DNA50798".

Figure 26 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:26) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:25 shown in Figure 25.

Figure 27 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:27) of a native sequence PRO877 cDNA, wherein SEQ ID NO:27 is a clone designated herein as "DNA58120".

Figure 28 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:28) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:27 shown in Figure 27.

Figure 29 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:29) of a native sequence PRO879 cDNA, wherein SEQ ID NO:29 is a clone designated herein as "DNA58122".

Figure 30 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:30) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:29 shown in Figure 29.

Figure 31 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:31) of a native sequence PRO882 cDNA, wherein SEQ ID NO:31 is a clone designated herein as "DNA58125".

Figure 32 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:32) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:31 shown in Figure 31.

Figure 33 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:33) of a native sequence PRO1710 cDNA, wherein SEQ ID NO:33 is a clone designated herein as "DNA82331".

Figure 34 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:34) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:33 shown in Figure 33.

Detailed Description of the Invention

I. Definitions

The phrases "cardiovascular, endothelial and angiogenic disorder", "cardiovascular, endothelial and angiogenic dysfunction", "cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder" and "cardiovascular, endothelial or angiogenic dysfunction" are used interchangeably and refer in part to systemic disorders that affect vessels, such as diabetes mellitus, as well as diseases of the vessels themselves, such as of the arteries, capillaries, veins, and/or lymphatics. This would include indications that stimulate angiogenesis and/or cardiovascularization, and those that inhibit angiogenesis and/or cardiovascularization. Such disorders include, for example, arterial disease, such as atherosclerosis, hypertension, inflammatory vasculitides, Reynaud's disease and Reynaud's phenomenon, aneurysms,

WO 00/73445

PCT/US00/13765

and arterial stenosis; venous and lymphatic disorders such as thrombophlebitis, lymphangitis, and lymphedema; and other vascular disorders such as peripheral vascular disease, cancer such as vascular tumors, e.g., hemangioma (capillary and cavernous), glomus tumors, telangiectasia, bacillary angiomatosis, hemangioendothelioma, angiosarcoma, haemangiopericytoma, Kaposi's sarcoma, lymphangioma, and lymphangiosarcoma, tumor angiogenesis, trauma such as wounds, burns, and other injured tissue, implant fixation, scarring, ischemia reperfusion injury, rheumatoid arthritis, cerebrovascular disease, renal diseases such as acute renal failure, and osteoporosis. This would also include angina, myocardial infarctions such as acute myocardial infarctions, cardiac hypertrophy, and heart failure such as CHF.

"Hypertrophy", as used herein, is defined as an increase in mass of an organ or structure independent of natural growth that does not involve tumor formation. Hypertrophy of an organ or tissue is due either to an increase in the mass of the individual cells (true hypertrophy), or to an increase in the number of cells making up the tissue (hyperplasia), or both. Certain organs, such as the heart, lose the ability to divide shortly after birth. Accordingly, "cardiac hypertrophy" is defined as an increase in mass of the heart, which, in adults, is characterized by an increase in myocyte cell size and contractile protein content without concomitant cell division. The character of the stress responsible for inciting the hypertrophy, (e.g., increased preload, increased afterload, loss of myocytes, as in myocardial infarction, or primary depression of contractility), appears to play a critical role in determining the nature of the response. The early stage of cardiac hypertrophy is usually characterized morphologically by increases in the size of myofibrils and mitochondria, as well as by enlargement of mitochondria and nuclei. At this stage, while muscle cells are larger than normal, cellular organization is largely preserved. At a more advanced stage of cardiac hypertrophy, there are preferential increases in the size or number of specific organelles, such as mitochondria, and new contractile elements are added in localized areas of the cells, in an irregular manner. Cells subjected to long-standing hypertrophy show more obvious disruptions in cellular organization, including markedly enlarged nuclei with highly lobulated membranes, which displace adjacent myofibrils and cause breakdown of normal Z-band registration. The phrase "cardiac hypertrophy" is used to include all stages of the progression of this condition, characterized by various degrees of structural damage of the heart muscle, regardless of the underlying cardiac disorder. Hence, the term also includes physiological conditions instrumental in the development of cardiac hypertrophy, such as elevated blood pressure, aortic stenosis, or myocardial infarction.

"Heart failure" refers to an abnormality of cardiac function where the heart does not pump blood at the rate needed for the requirements of metabolizing tissues. The heart failure can be caused by a number of factors, including ischemic, congenital, rheumatic, or idiopathic forms.

"Congestive heart failure" (CHF) is a progressive pathologic state where the heart is increasingly unable to supply adequate cardiac output (the volume of blood pumped by the heart over time) to deliver the oxygenated blood to peripheral tissues. As CHF progresses, structural and hemodynamic damages occur. While these damages have a variety of manifestations, one characteristic symptom is ventricular hypertrophy. CHF is a common end result of a number of various cardiac disorders.

"Myocardial infarction" generally results from atherosclerosis of the coronary arteries, often with superimposed coronary thrombosis. It may be divided into two major types: transmural infarcts, in which myocardial necrosis involves the full thickness of the ventricular wall, and subendocardial (nontransmural) infarcts,

WO 00/73445

PCT/US90/13705

in which the necrosis involves the subendocardium, the intramural myocardium, or both, without extending all the way through the ventricular wall to the epicardium. Myocardial infarction is known to cause both a change in hemodynamic effects and an alteration in structure in the damaged and healthy zones of the heart. Thus, for example, myocardial infarction reduces the maximum cardiac output and the stroke volume of the heart. Also associated with myocardial infarction is a stimulation of the DNA synthesis occurring in the interstice as well as an increase in the formation of collagen in the areas of the heart not affected.

As a result of the increased stress or strain placed on the heart in prolonged hypertension due, for example, to the increased total peripheral resistance, cardiac hypertrophy has long been associated with "hypertension". A characteristic of the ventricle that becomes hypertrophic as a result of chronic pressure overload is an impaired diastolic performance. Fouad *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **4**: 1500-1506 (1984); Smith *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **5**: 869-874 (1985). A prolonged left ventricular relaxation has been detected in early essential hypertension, in spite of normal or supranormal systolic function. Hartford *et al.*, *Hypertension*, **6**: 329-338 (1984). However, there is no close parallelism between blood pressure levels and cardiac hypertrophy. Although improvement in left ventricular function in response to antihypertensive therapy has been reported in humans, patients variously treated with a diuretic (hydrochlorothiazide), a β blocker (propranolol), or a calcium channel blocker (diltiazem), have shown reversal of left ventricular hypertrophy, without improvement in diastolic function. Inouye *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, **53**: 1583-7 (1984).

Another complex cardiac disease associated with cardiac hypertrophy is "hypertrophic cardiomyopathy". This condition is characterized by a great diversity of morphologic, functional, and clinical features (Maron *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **316**: 780-789 (1987); Spirito *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **320**: 749-755 (1989); Louie and Edwards, *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **36**: 275-308 (1994); Wigle *et al.*, *Circulation*, **92**: 1680-1692 (1995)), the heterogeneity of which is accentuated by the fact that it afflicts patients of all ages. Spirito *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **336**: 775-785 (1997). The causative factors of hypertrophic cardiomyopathy are also diverse and little understood. In general, mutations in genes encoding sarcomeric proteins are associated with hypertrophic cardiomyopathy. Recent data suggest that β -myosin heavy chain mutations may account for approximately 30 to 40 percent of cases of familial hypertrophic cardiomyopathy. Watkins *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **326**: 1108-1114 (1992); Schwartz *et al.*, *Circulation*, **91**: 532-540 (1995); Marian and Roberts, *Circulation*, **92**: 1336-1347 (1995); Thierfelder *et al.*, *Cell*, **77**: 701-712 (1994); Watkins *et al.*, *Nat. Gen.*, **11**: 434-437 (1995). Besides β -myosin heavy chain, other locations of genetic mutations include cardiac troponin T, α tropomyosin, cardiac myosin binding protein C, essential myosin light chain, and regulatory myosin light chain. See, Malik and Watkins, *Curr. Opin. Cardiol.*, **12**: 295-302 (1997).

Supravalvular "aortic stenosis" is an inherited vascular disorder characterized by narrowing of the ascending aorta, but other arteries, including the pulmonary arteries, may also be affected. Untreated aortic stenosis may lead to increased intracardiac pressure resulting in myocardial hypertrophy and eventually heart failure and death. The pathogenesis of this disorder is not fully understood, but hypertrophy and possibly hyperplasia of medial smooth muscle are prominent features of this disorder. It has been reported that molecular variants of the elastin gene are involved in the development and pathogenesis of aortic stenosis. U.S. Patent No. 5,650,282 issued July 22, 1997.

"Valvular regurgitation" occurs as a result of heart diseases resulting in disorders of the cardiac valves. Various diseases, like rheumatic fever, can cause the shrinking or pulling apart of the valve orifice, while other

WO 00/73445

PCT/US00/13705

diseases may result in endocarditis, an inflammation of the endocardium or lining membrane of the atrioventricular orifices and operation of the heart. Defects such as the narrowing of the valve stenosis or the defective closing of the valve result in an accumulation of blood in the heart cavity or regurgitation of blood past the valve. If uncorrected, prolonged valvular stenosis or insufficiency may result in cardiac hypertrophy and associated damage to the heart muscle, which may eventually necessitate valve replacement.

The treatment of all these, and other cardiovascular, endothelial and angiogenic disorders, which may or may not be accompanied by cardiac hypertrophy, is encompassed by the present invention.

The terms "cancer", "cancerous", and "malignant" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include but are not limited to, carcinoma including adenocarcinoma, lymphoma, blastoma, melanoma, sarcoma, and leukemia. More particular examples of such cancers include squamous cell cancer, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, gastrointestinal cancer, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer such as hepatic carcinoma and hepatoma, bladder cancer, breast cancer, colon cancer, colorectal cancer, endometrial carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney cancer such as renal cell carcinoma and Wilms' tumors, basal cell carcinoma, melanoma, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, testicular cancer, esophageal cancer, and various types of head and neck cancer. The preferred cancers for treatment herein are breast, colon, lung, melanoma, ovarian, and others involving vascular tumors as noted above.

The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes (e.g., ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , and ^{186}Re), chemotherapeutic agents, and toxins such as enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof.

A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer. Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents, folic acid antagonists, anti-metabolites of nucleic acid metabolism, antibiotics, pyrimidine analogs, 5-fluorouracil, cisplatin, purine nucleosides, amines, amino acids, triazol nucleosides, or corticosteroids. Specific examples include Adriamycin, Doxorubicin, 5-Fluorouracil, Cytosine arabinoside ("Ara-C"), Cyclophosphamide, Thiotepa, Busulfan, Cytosin, Taxol, Taxotere, Methotrexate, Cisplatin, Melphalan, Vinblastine, Bleomycin, Etoposide, Ifosfamide, Mitomycin C, Mitoxantrone, Vincristine, Vinorelbine, Carboplatin, Teniposide, Daunomycin, Carmustine, Aminopterin, Dactinomycin, Mitomycin, Flutamide, and other related nitrogen mustards. Also included in this definition are hormonal agents that act to regulate or inhibit hormone action on tumors, such as tamoxifen and onapristone.

A "growth-inhibitory agent" when used herein refers to a compound or composition that inhibits growth of a cell, such as an Wnt-overexpressing cancer cell, either *in vitro* or *in vivo*. Thus, the growth-inhibitory agent is one which significantly reduces the percentage of malignant cells in S phase. Examples of growth-inhibitory agents include agents that block cell cycle progression (at a place other than S phase), such as agents that induce G1 arrest and M-phase arrest. Classical M-phase blockers include the vinca (vincristine and vinblastine), taxol, and topo II inhibitors such as doxorubicin, daunorubicin, etoposide, and bleomycin. Those agents that arrest G1 also spill over into S-phase arrest, for example, DNA alkylating agents such as tamoxifen, prednisone, dacarbazine.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

mechlorethamine, cisplatin, methotrexate, 5-fluorouracil, and ara-C. Further information can be found in The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter I, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13. Additional examples include tumor necrosis factor (TNF), an antibody capable of inhibiting or neutralizing the angiogenic activity of acidic or basic IGF or hepatocyte growth factor (HGF), an antibody capable of inhibiting or neutralizing the coagulant activities of tissue factor, protein C, or protein S (see, WO 91/01753, published 21 February 1991), or an antibody capable of binding to HIR2 receptor (WO 89/06692), such as the 4D5 antibody (and functional equivalents thereof) (e.g., WO 92/26553).

"Treatment" is an intervention performed with the intention of preventing the development or altering the pathology of a cardiovascular, endothelial, and angiogenic disorder. The concept of treatment is used in the broadest sense, and specifically includes the prevention (prophylaxis), moderation, reduction, and curing of cardiovascular, endothelial, and angiogenic disorders of any stage. Accordingly, "treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures, wherein the object is to prevent or slow down (lessen) a cardiovascular, endothelial, and angiogenic disorder such as hypertrophy. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those prone to have the disorder or those in whom the disorder is to be prevented. The disorder may result from any cause, including idiopathic, cardiopathic, or myopathic causes, or ischemia or ischemic insults, such as myocardial infarction.

"Chronic" administration refers to administration of the agent(s) in a continuous mode as opposed to an acute mode, so as to maintain the initial effect, such as an anti-hypertrophic effect, for an extended period of time.

"Mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as dogs, horses, cats, cows, sheep, pigs, etc. Preferably, the mammal is human.

Administration "in combination with" one or more further therapeutic agents includes simultaneous (concurrent) and consecutive administration in any order.

The phrase "cardiovascular, endothelial or angiogenic agents" refers generically to any drug that acts in treating cardiovascular, endothelial, and angiogenic disorders. Examples of cardiovascular agents are those that promote vascular homeostasis by modulating blood pressure, heart rate, heart contractility, and endothelial and smooth muscle biology, all of which factors have a role in cardiovascular disease. Specific examples of these include angiotensin-II receptor antagonists; endothelin receptor antagonists such as, for example, BOSENTANTM and MOXONODINTM; interferon-gamma (IFN- γ); des-aspartate-angiotensin I; thrombolytic agents, e.g., streptokinase, urokinase, t-PA, and a t-PA variant specifically designed to have longer half-life and very high fibrin specificity, TNK t-PA (a T103N, N117Q, KHRR(296-299)AAAA t-PA variant, Key *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3670-3674 (1994)); inotropic or hypertensive agents such as digoxigenin and β -adrenergic receptor blocking agents, e.g., propranolol, timolol, terbutolol, carteolol, nadolol, betaxolol, penbutolol, acebutolol, atenolol, metoprolol, and carvedilol; angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, e.g., quinapril, captopril, enalapril, ramipril, benazepril, fosinopril, and lisinopril; diuretics, e.g., chlorothiazide, hydrochlorothiazide, hydroflumethiazide, methylchlorothiazide, benzthiazide, dichlorophenamide, acetazolamide, and indapamide; and calcium channel blockers, e.g., diltiazem, nifedipine, verapamil, nifedipine. One preferred category of this type

WO 00/73445

PCT/US00/13705

is a therapeutic agent used for the treatment of cardiac hypertrophy or of a physiological condition instrumental in the development of cardiac hypertrophy, such as elevated blood pressure, aortic stenosis, or myocardial infarction.

"Angiogenic agents" and "endothelial agents" are active agents that promote angiogenesis and/or endothelial cell growth, or, if applicable, vasculogenesis. This would include factors that accelerate wound healing, such as growth hormone, insulin-like growth factor-I (IGF-I), VEGF, VEGF, PDGF, epidermal growth factor (EGF), CTGF and members of its family, FGF, and TGF- α and TGF- β .

"Angiostatic agents" are active agents that inhibit angiogenesis or vasculogenesis or otherwise inhibit or prevent growth of cancer cells. Examples include antibodies or other antagonists to angiogenic agents as defined above, such as antibodies to VEGF. They additionally include cytotoxic agents, chemotherapeutic agents, growth-inhibitory agents, apoptotic agents, and other agents to treat cancer, such as anti-HER-2, anti-CD20, and other bioactive and organic chemical agents.

In a pharmacological sense, in the context of the present invention, a "therapeutically effective amount" of an active agent such as a PRO polypeptide or agonist or antagonist thereof or an anti-PRO antibody, refers to an amount effective in the treatment of a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in a mammal and can be determined empirically.

As used herein, an "effective amount" of an active agent such as a PRO polypeptide or agonist or antagonist thereof or an anti-PRO antibody, refers to an amount effective for carrying out a stated purpose, wherein such amounts may be determined empirically for the desired effect.

The terms "PRO polypeptide" and "PRO" as used herein and when immediately followed by a numerical designation refer to various polypeptides, wherein the complete designation (*i.e.*, PRO/number) refers to specific polypeptide sequences as described herein. The terms "PRO/number polypeptide" and "PRO/number" wherein the term "number" is provided as an actual numerical designation as used herein encompass native sequence polypeptides and polypeptide variants (which are further defined herein). The PRO polypeptides described herein may be isolated from a variety of sources, such as from human tissue types or from another source, or prepared by recombinant or synthetic methods.

A "native sequence PRO polypeptide" comprises a polypeptide having the same amino acid sequence as the corresponding PRO polypeptide derived from nature. Such native sequence PRO polypeptides can be isolated from nature or can be produced by recombinant or synthetic means. The term "native sequence PRO polypeptide" specifically encompasses naturally-occurring truncated or secreted forms of the specific PRO polypeptide (*e.g.*, an extracellular domain sequence), naturally-occurring variant forms (*e.g.*, alternatively spliced forms) and naturally-occurring allelic variants of the polypeptide. In various embodiments of the invention, the native sequence PRO polypeptides disclosed herein are mature or full-length native sequence polypeptides comprising the full-length amino acids sequences shown in the accompanying figures. Start and stop codons are shown in bold font and underlined in the figures. However, while the PRO polypeptide disclosed in the accompanying figures are shown to begin with methionine residues designated herein as amino acid position 1 in the figures, it is conceivable and possible that other methionine residues located either upstream or downstream from the amino acid position 1 in the figures may be employed as the starting amino acid residue for the PRO polypeptides.

The PRO polypeptide "extracellular domain" or "ECD" refers to a form of the PRO polypeptide which is

WO 00/73445

PCT/US00/13705

essentially free of the transmembrane and cytoplasmic domains. Ordinarily, a PRO polypeptide ECD will have less than 1% of such transmembrane and/or cytoplasmic domains and preferably, will have less than 0.5% of such domains. It will be understood that any transmembrane domains identified for the PRO polypeptides of the present invention are identified pursuant to criteria routinely employed in the art for identifying that type of hydrophobic domain. The exact boundaries of a transmembrane domain may vary but most likely by no more than about 5 amino acids at either end of the domain as initially identified herein. Optionally, therefore, an extracellular domain of a PRO polypeptide may contain from about 5 or fewer amino acids on either side of the transmembrane domain/extracellular domain boundary as identified in the Examples or specification and such polypeptides, with or without the associated signal peptide, and nucleic acid encoding them, are contemplated by the present invention.

The approximate location of the "signal peptides" of the various PRO polypeptides disclosed herein are shown in the present specification and/or the accompanying figures. It is noted, however, that the C-terminal boundary of a signal peptide may vary, but most likely by no more than about 5 amino acids on either side of the signal peptide C-terminal boundary as initially identified herein, wherein the C-terminal boundary of the signal peptide may be identified pursuant to criteria routinely employed in the art for identifying that type of amino acid sequence element (e.g., Nielsen *et al.*, *Prot. Eng.*, 10:1-6 (1997) and von Heijne *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 14:4683-4690 (1986)). Moreover, it is also recognized that, in some cases, cleavage of a signal sequence from a secreted polypeptide is not entirely uniform, resulting in more than one secreted species. These mature polypeptides, where the signal peptide is cleaved within no more than about 5 amino acids on either side of the C-terminal boundary of the signal peptide as identified herein, and the polynucleotides encoding them, are contemplated by the present invention.

"PRO polypeptide variant" means an active PRO polypeptide as defined above or below having at least about 80% amino acid sequence identity with a full-length native sequence PRO polypeptide sequence as disclosed herein, a PRO polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a PRO polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other fragment of a full-length PRO polypeptide sequence as disclosed herein. Such PRO polypeptide variants include, for instance, PRO polypeptides wherein one or more amino acid residues are added, or deleted, at the N- or C-terminus of the full-length native amino acid sequence. Ordinarily, a PRO polypeptide variant will have at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81% amino acid sequence identity, alternatively at least about 82% amino acid sequence identity, alternatively at least about 83% amino acid sequence identity, alternatively at least about 84% amino acid sequence identity, alternatively at least about 85% amino acid sequence identity, alternatively at least about 86% amino acid sequence identity, alternatively at least about 87% amino acid sequence identity, alternatively at least about 88% amino acid sequence identity, alternatively at least about 89% amino acid sequence identity, alternatively at least about 90% amino acid sequence identity, alternatively at least about 91% amino acid sequence identity, alternatively at least about 92% amino acid sequence identity, alternatively at least about 93% amino acid sequence identity, alternatively at least about 94% amino acid sequence identity, alternatively at least about 95% amino acid sequence identity, alternatively at least about 96% amino acid sequence identity, alternatively at least about 97% amino acid sequence identity, alternatively at least about 98% amino acid sequence identity and alternatively at least about 99% amino acid sequence identity in a full-length native sequence PRO polypeptide

WO 00/73445

PCT/US00/13705

sequence as disclosed herein, a PRO polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a PRO polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of a full-length PRO polypeptide sequence as disclosed herein. Ordinarily, PRO variant polypeptides are at least about 10 amino acids in length, alternatively at least about 20 amino acids in length, alternatively at least about 30 amino acids in length, alternatively at least about 40 amino acids in length, alternatively at least about 50 amino acids in length, alternatively at least about 60 amino acids in length, alternatively at least about 70 amino acids in length, alternatively at least about 80 amino acids in length, alternatively at least about 90 amino acids in length, alternatively at least about 100 amino acids in length, alternatively at least about 150 amino acids in length, alternatively at least about 200 amino acids in length, alternatively at least about 300 amino acids in length, or more.

"Percent (%) amino acid sequence identity" with respect to the PRO polypeptide sequences identified herein is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in a PRO sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full-length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % amino acid sequence identity values are obtained as described below by using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table 1. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc., and the source code shown in Table 1 has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXUS10087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in Table 1. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

For purposes herein, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B

WO 00/73445

PCT/US00/13705

to A. As examples of % amino acid sequence identity calculations, Tables 2A-2B demonstrate how to calculate the % amino acid sequence identity of the amino acid sequence designated "Comparison Protein" to the amino acid sequence designated "PRO".

Unless specifically stated otherwise, all % amino acid sequence identity values used herein are obtained as described above using the ALIGN-2 sequence comparison computer program. However, % amino acid sequence identity may also be determined using the sequence comparison program NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1997)). The NCBI-BLAST2 sequence comparison program may be downloaded from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, or otherwise obtained from the National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 uses several search parameters, wherein all of those search parameters are set to default values including, for example, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropout for final gapped alignment = 25 and scoring matrix = BLOSUM62.

In situations where NCBI-BLAST2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program NCBI-BLAST2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A.

In addition, % amino acid sequence identity may also be determined using the WU-BLAST-2 computer program (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)). Most of the WU-BLAST-2 search parameters are set to the default values. Those not set to default values, i.e., the adjustable parameters, are set with the following values: overlap span = 1, overlap fraction = 0.125, word threshold (T) = 1, and scoring matrix = BLOSUM62. For purposes herein, a % amino acid sequence identity value is determined by dividing (a) the number of matching identical amino acids residues between the amino acid sequence of the PRO polypeptide of interest having a sequence derived from the native PRO polypeptide and the comparison amino acid sequence of interest (i.e., the sequence against which the PRO polypeptide of interest is being compared which may be a PRO variant polypeptide) as determined by WU-BLAST-2 by (b) the total number of amino acid residues of the PRO polypeptide of interest. For example, in the statement "a polypeptide comprising an amino acid sequence A which has or having at least 80% amino acid sequence identity to the amino acid sequence B", the amino acid sequence A is the comparison amino acid sequence of interest and the amino acid sequence B is the amino acid sequence of the PRO polypeptide of interest.

"PRO variant polynucleotide" or "PRO variant nucleic acid sequence" means a nucleic acid molecule which

WO 00/73445

PCT/US00/13705

encodes an active PRO polypeptide as defined below and which has at least about 80% nucleic acid sequence identity with a nucleotide acid sequence encoding a full-length native sequence PRO polypeptide sequence as disclosed herein, a full-length native sequence PRO polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a PRO polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other fragment of a full-length PRO polypeptide sequence as disclosed herein. Ordinarily, a PRO variant polynucleotide will have at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity with a nucleotide acid sequence encoding a full-length native sequence PRO polypeptide sequence as disclosed herein, a full-length native sequence PRO polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a PRO polypeptide, with or without the signal sequence, as disclosed herein or any other fragment of a full-length PRO polypeptide sequence as disclosed herein. Variants do not encompass the native nucleotide sequence.

Ordinarily, PRO variant polynucleotides are at least about 30 nucleotides in length, alternatively at least about 60 nucleotides in length, alternatively at least about 90 nucleotides in length, alternatively at least about 120 nucleotides in length, alternatively at least about 150 nucleotides in length, alternatively at least about 180 nucleotides in length, alternatively at least about 210 nucleotides in length, alternatively at least about 240 nucleotides in length, alternatively at least about 270 nucleotides in length, alternatively at least about 300 nucleotides in length, alternatively at least about 450 nucleotides in length, alternatively at least about 600 nucleotides in length, alternatively at least about 900 nucleotides in length, or more.

"Percent (%) nucleic acid sequence identity" with respect to the PRO polypeptide-encoding nucleic acid sequences identified herein is defined as the percentage of nucleotides in a candidate sequence that are identical with the nucleotides in a PRO polypeptide-encoding nucleic acid sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. Alignment for purposes of determining percent nucleic acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full-length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % nucleic acid sequence identity values are obtained as described below by using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the

WO 00/73445

PCT/US00/13765

ALIGN-2 program is provided in Table 1. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc., and the source code shown in Table 1 has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXUS10007. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in Table 1. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

For purposes herein, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } W/Z$$

where W is the number of nucleotides scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of C and D, and where Z is the total number of nucleotides in D. It will be appreciated that where the length of nucleic acid sequence C is not equal to the length of nucleic acid sequence D, the % nucleic acid sequence identity of C to D will not equal the % nucleic acid sequence identity of D to C. As examples of % nucleic acid sequence identity calculations, Tables 2C-2D demonstrate how to calculate the % nucleic acid sequence identity of the nucleic acid sequence designated "Comparison DNA" to the nucleic acid sequence designated "PRO-DNA".

Unless specifically stated otherwise, all % nucleic acid sequence identity values used herein are obtained as described above using the ALIGN-2 sequence comparison computer program. However, % nucleic acid sequence identity may also be determined using the sequence comparison program NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1997)). The NCBI-BLAST2 sequence comparison program may be downloaded from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, or otherwise obtained from the National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 uses several search parameters, wherein all of those search parameters are set to default values including, for example, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 and scoring matrix = BLOSUM62.

In situations where NCBI-BLAST2 is employed for sequence comparisons, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } W/Z$$

where W is the number of nucleotides scored as identical matches by the sequence alignment program NCBI-

WO 00/73445

PCT/US00/43705

BLAST2 in that program's alignment of C and D, and where Z is the total number of nucleotides in D. It will be appreciated that where the length of nucleic acid sequence C is not equal to the length of nucleic acid sequence D, the % nucleic acid sequence identity of C to D will not equal the % nucleic acid sequence identity of D to C.

In addition, % nucleic acid sequence identity values may also be generated using the WU-BLAST-2 computer program (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)). Most of the WU-BLAST-2 search parameters are set to the default values. Those not set to default values, i.e., the adjustable parameters, are set with the following values: overlap span = 1, overlap fraction = 0.125, word threshold (T) = 11, and scoring matrix = BLOSUM62. For purposes herein, a % nucleic acid sequence identity value is determined by dividing (a) the number of matching identical nucleotides between the nucleic acid sequence of the PRO polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest having a sequence derived from the native sequence PRO polypeptide-encoding nucleic acid and the comparison nucleic acid molecule of interest (i.e., the sequence against which the PRO polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest is being compared which may be a variant PRO polynucleotide) as determined by WU-BLAST-2 by (b) the total number of nucleotides of the PRO polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest. For example, in the statement "an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence A which has or having at least 80% nucleic acid sequence identity to the nucleic acid sequence B", the nucleic acid sequence A is the comparison nucleic acid molecule of interest and the nucleic acid sequence B is the nucleic acid sequence of the PRO polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest.

In other embodiments, PRO variant polynucleotides are nucleic acid molecules that encode an active PRO polypeptide and which are capable of hybridizing, preferably under stringent hybridization and wash conditions, to nucleotide sequences encoding the full-length PRO polypeptide as shown in the specification herein and accompanying figures. PRO variant polypeptides may be those that are encoded by a PRO variant polynucleotide.

The term "positives", in the context of the amino acid sequence identity comparisons performed as described above, includes amino acid residues in the sequences compared that are not only identical, but also those that have similar properties. Amino acid residues that score a positive value to an amino acid residue of interest are those that are either identical to the amino acid residue of interest or are a preferred substitution (as defined in Table 3 below) of the amino acid residue of interest.

For purposes herein, the % value of positives of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % positives to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

where X is the number of amino acid residues scoring a positive value by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % positives of A to B will not equal the % positives of B to A.

"Isolated", when used to describe the various polypeptides disclosed herein, means a polypeptide that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Preferably, the isolated

WO 00/73445

PCT/US00/13705

polypeptide is free of association with all components with which it is naturally associated. Contaminant components of its natural environment are materials that would typically interfere with diagnostic or therapeutic uses for the polypeptide, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous solutes. In preferred embodiments, the polypeptide will be purified (1) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (2) to homogeneity by SDS-PAGE under non-reducing or reducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated polypeptide includes polypeptide *in situ* within recombinant cells, since at least one component of the PRO natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated polypeptide will be prepared by at least one purification step.

An "isolated" nucleic acid molecule encoding a PRO polypeptide or an "isolated" nucleic acid molecule encoding an anti-PRO antibody is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the PRO-encoding nucleic acid or the natural source of the anti-PRO-encoding nucleic acid. Preferably, the isolated nucleic acid is free of association with all components with which it is naturally associated. An isolated PRO-encoding nucleic acid molecule or an isolated anti-PRO-encoding nucleic acid molecule is other than in the form or setting in which it is found in nature. Isolated nucleic acid molecules therefore are distinguished from the PRO-encoding nucleic acid molecule or from the anti-PRO-encoding nucleic acid molecule as it exists in natural cells. However, an isolated nucleic acid molecule encoding a PRO polypeptide or an isolated nucleic acid molecule encoding an anti-PRO antibody includes PRO-nucleic acid molecules or anti-PRO-nucleic acid molecules contained in cells that ordinarily express PRO polypeptides or anti-PRO antibodies where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

The term "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a PRO polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

"Stringency" of hybridization reactions is readily determinable by one of ordinary skill in the art, and generally is an empirical calculation dependent upon probe length, washing temperature, and salt concentration. In general, longer probes require higher temperatures for proper annealing, while shorter probes need lower temperatures. Hybridization generally depends on the ability of denatured DNA to reanneal when complementary strands are

WO 00/73445

PCT/US00/13705

present in an environment below their melting temperature. The higher the degree of desired homology between the probe and hybridizable sequence, the higher the relative temperature that can be used. As a result, it follows that higher relative temperatures would tend to make the reaction conditions more stringent, while lower temperatures less so. For additional details and explanation of stringency of hybridization reactions, see, Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (Wiley Interscience Publishers, 1995).

"Stringent conditions" or "high-stringency conditions", as defined herein, may be identified by those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example, 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42°C; or (3) employ 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55°C, followed by a high-stringency wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55°C.

"Moderately-stringent conditions" may be identified as described by Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989), and include the use of washing solution and hybridization conditions (e.g., temperature, ionic strength, and % SDS) less stringent than those described above. An example of moderately stringent conditions is overnight incubation at 37°C in a solution comprising: 20% formamide, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5 x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 mg/ml denatured sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 1 x SSC at about 37-50°C. The skilled artisan will recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc., as necessary to accommodate factors such as probe length and the like.

The modifier "epitope-tagged" when used herein refers to a chimeric polypeptide comprising a PRO polypeptide fused to a "tag polypeptide". The tag polypeptide has enough residues to provide an epitope against which an antibody can be made, yet is short enough such that it does not interfere with activity of the polypeptide to which it is fused. The tag polypeptide preferably also is fairly unique so that the antibody does not substantially cross-react with other epitopes. Suitable tag polypeptides generally have at least six amino acid residues and usually between about 8 and 50 amino acid residues (preferably, between about 10 and 20 amino acid residues).

"Active" or "activity" in the context of PRO variants refers to form(s) of PRO proteins that retain the biologic and/or immunologic activities of a native or naturally-occurring PRO polypeptide.

"Biological activity" in the context of a molecule that antagonizes a PRO polypeptide that can be identified by the screening assays disclosed herein (e.g., an organic or inorganic small molecule, peptide, etc.) is used to refer to the ability of such molecules to bind or complex with the PRO polypeptide identified herein, or otherwise interfere with the interaction of the PRO polypeptides with other cellular proteins or otherwise inhibits the transcription or translation of the PRO polypeptide. Particularly preferred biological activity includes cardiac hypertrophy, activity that acts on systemic disorders that affect vessels, such as diabetes mellitus, as well as diseases of the arteries, capillaries, veins, and/or lymphatics, and cancer.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

The term "antagonist" is used in the broadest sense, and includes any molecule that partially or fully blocks, inhibits, or neutralizes one or more of the biological activities of a native PRO polypeptide disclosed herein, for example, if applicable, its mitogenic or angiogenic activity. Antagonists of a PRO polypeptide may act by interfering with the binding of a PRO polypeptide to a cellular receptor, by incapacitating or killing cells that have been activated by a PRO polypeptide, or by interfering with vascular endothelial cell activation after binding of a PRO polypeptide to a cellular receptor. All such points of intervention by a PRO polypeptide antagonist shall be considered equivalent for purposes of this invention. The antagonists inhibit the mitogenic, angiogenic, or other biological activity of PRO polypeptides, and thus are useful for the treatment of diseases or disorders characterized by undesirable excessive neovascularization, including by way of example tumors, and especially solid malignant tumors, rheumatoid arthritis, psoriasis, atherosclerosis, diabetic and other retinopathies, retrolental fibroplasia, age-related macular degeneration, neovascular glaucoma, hemangiomas, thyroid hyperplasias (including Grave's disease), corneal and other tissue transplantation, and chronic inflammation. The antagonists also are useful for the treatment of diseases or disorders characterized by undesirable excessive vascular permeability, such as edema associated with brain tumors, ascites associated with malignancies, Meigs' syndrome, lung inflammation, nephrotic syndrome, pericardial effusion (such as that associated with pericarditis), and pleural effusion. In a similar manner, the term "agonist" is used in the broadest sense and includes any molecule that mimics a biological activity of a native PRO polypeptide disclosed herein. Suitable agonist or antagonist molecules specifically include agonist or antagonist antibodies or antibody fragments, fragments, or amino acid sequence variants of native PRO polypeptides, peptides, small organic molecules, etc.

A "small molecule" is defined herein to have a molecular weight below about 500 daltons.

The term "PRO polypeptide receptor" as used herein refers to a cellular receptor for a PRO polypeptide, ordinarily a cell-surface receptor found on vascular endothelial cells, as well as variants thereof that retain the ability to bind a PRO polypeptide.

"Antibodies" (Abs) and "immunoglobulins" (Igs) are glycoproteins having the same structural characteristics. While antibodies exhibit binding specificity to a specific antigen, immunoglobulins include both antibodies and other antibody-like molecules that lack antigen specificity. Polypeptides of the latter kind are, for example, produced at low levels by the lymph system and at increased levels by myelomas. The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers, without limitation, intact monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies) formed from at least two intact antibodies, and antibody fragments, so long as they exhibit the desired biological activity.

"Native antibodies" and "native immunoglobulins" are usually heterotetrameric glycoproteins of about 150,000 daltons, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages varies among the heavy chains of different immunoglobulin isotypes. Each heavy and light chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain (V_H) followed by a number of constant domains. Each light chain has a variable domain at one end (V_L) and a constant domain at its other end; the constant domain of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light-chain variable domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form

WO 00/73445

PCT/US00/13705

an interface between the light- and heavy-chain variable domains.

The term "variable" refers to the fact that certain portions of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies and are used in the binding and specificity of each particular antibody to and for its particular antigen. However, the variability is not evenly distributed throughout the variable domains of antibodies. It is concentrated in three segments called complementarity-determining regions (CDRs) or hypervariable regions both in the light-chain and the heavy-chain variable domains. The more highly conserved portions of variable domains are called the framework regions (FR). The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FR regions, largely adopting a β -sheet configuration, connected by three CDRs, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β -sheet structure. The CDRs in each chain are held together in close proximity by the FR regions and, with the CDRs from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies. See, Kabat *et al.*, *NHL Publ. No. 91-3242, Vol. 1*, pages 647-669 (1991). The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody-dependent cellular toxicity.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably the antigen-binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies (Zapata *et al.*, *Protein Eng.*, 8(10): 1057-1062 (1995)); single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

Pepsin digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, whose name reflects its ability to crystallize readily. Pepsin treatment yields an F(ab')₂ fragment that has two antigen-combining sites and is still capable of cross-linking antigen.

"Fv" is the minimum antibody fragment that contains a complete antigen-recognition and -binding site. This region consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable domain in tight, non-covalent association. It is in this configuration that the three CDRs of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the V_H-V_L dimer. Collectively, the six CDRs confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH1) of the heavy chain. Fab' fragments differ from Fab fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group. F(ab')₂ antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments that have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

The "light chains" of antibodies (immunoglobulins) from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa (κ) and lambda (λ), based on the amino acid sequences of their constant domains.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM; and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgA2.

WO 01/73445

PCT/US00/13705

The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called α , δ , ϵ , γ , and μ , respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to conventional (polyclonal) antibody preparations that typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they are synthesized by the hybridoma culture, uncontaminated by other immunoglobulins. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler *et al.*, *Nature*, **256**: 495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (see, e.g., U.S. Patent No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson *et al.*, *Nature*, **352**: 624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **222**: 581-597 (1991), for example.

The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies (immunoglobulins) in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity. U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 6851-6855 (1984).

"Humanized" forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains, or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, or other antigen-binding subsequences of antibodies) that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a CDR of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, Fv FR residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. These modifications are made to further refine and maximize antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody preferably also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones *et al.*, *Nature*, **321**: 522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, **332**: 323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op.*

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Strick, Biol., 2, 593-596 (1992). The humanized antibody includes a PRIMATIZED™ antibody wherein the antigen-binding region of the antibody is derived from an antibody produced by immunizing macaque monkeys with the antigen of interest.

"Single-chain Fv" or "sFv" antibody fragments comprise the V_H and V_L domains of an antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Preferably, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V_H and V_L domains that enables the sFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of sFv see, Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore, eds. (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light chain variable domain (V_L) in the same polypeptide chain (V_H-V_L). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; and Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

An "isolated" antibody is one that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials that would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody *in situ* within recombinant cells, since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

The word "label" when used herein refers to a detectable compound or other composition that is conjugated directly or indirectly to the antibody so as to generate a "labeled" antibody. The label may be detectable by itself (*e.g.*, radioisotope labels or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration of a substrate compound or composition that is detectable. Radionuclides that can serve as detectable labels include, for example, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, At-211, Cu-67, Bi 212, and Pd-109. The label may also be a non-detectable entity such as a toxin.

By "solid phase" is meant a non-aqueous matrix to which an antibody of the present invention can adhere. Examples of solid phases encompassed herein include those formed partially or entirely of glass (*e.g.*, controlled pore glass), polysaccharides (*e.g.*, agarose), polyacrylamides, polystyrene, polyvinyl alcohol and silicones. In certain embodiments, depending on the context, the solid phase can comprise the well of an assay plate; in others it is a purification column (*e.g.*, an affinity chromatography column). This term also includes a discontinuous solid phase of discrete particles, such as those described in U.S. Patent No. 4,275,149.

A "liposome" is a small vesicle composed of various types of lipids, phospholipids and/or surfactant that is useful for delivery of a drug (such as the PRO polypeptide or antibodies thereto disclosed herein) to a mammal.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

The components of the liposome are commonly arranged in a bilayer formation, similar to the lipid arrangement of biological membranes.

As used herein, the term "immunoadhesin" designates antibody-like molecules that combine the binding specificity of a heterologous protein (an "adhesin") with the effector functions of immunoglobulin constant domains. Structurally, the immunoadhesins comprise a fusion of an amino acid sequence with the desired binding specificity that is other than the antigen recognition and binding site of an antibody (i.e., is "heterologous"), and an immunoglobulin constant domain sequence. The adhesin part of an immunoadhesin molecule typically is a contiguous amino acid sequence comprising at least the binding site of a receptor or a ligand. The immunoglobulin constant domain sequence in the immunoadhesin may be obtained from any immunoglobulin, such as IgG-1, IgG-2, IgG-3, or IgG-4 subtypes, IgA (including IgA-1 and IgA-2), IgE, IgD, or IgM.

As shown below, Table 1 provides the complete source code for the ALIGN-2 sequence comparison computer program. This source code may be routinely compiled for use on a UNIX operating system to provide the ALIGN-2 sequence comparison computer program.

In addition, Tables 2A-2D show hypothetical exemplifications for using the below described method to determine % amino acid sequence identity (Tables 2A-2B) and % nucleic acid sequence identity (Tables 2C-2D) using the ALIGN-2 sequence comparison computer program, wherein "PRO" represents the amino acid sequence of a hypothetical PRO polypeptide of interest, "Comparison Protein" represents the amino acid sequence of a polypeptide against which the "PRO" polypeptide of interest is being compared, "PRO-DNA" represents a hypothetical PRO-encoding nucleic acid sequence of interest, "Comparison DNA" represents the nucleotide sequence of a nucleic acid molecule against which the "PRO-DNA" nucleic acid molecule of interest is being compared, "X", "Y", and "Z" each represent different hypothetical amino acid residues and "N", "L" and "V" each represent different hypothetical nucleotides.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 1

```

/*
 *
 * C-U increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop stop = 0; I (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, -8, 0, 3, 1},
/* C */ { -2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ { -4, -5, -4, 6, -5, 9, -5, 2, 1, 0, -5, 2, 0, 4, _M, -5, -5, -4, 3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ { -1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ { -1, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, 5, 0, 1, 2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ { -1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ { -2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ { 1, 2, -5, -3, -2, 0, 3, 2, 2, 0, 0, 4, 6, 2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, 1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ { _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, 5, 0, -4, 3},
/* R */ { -2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, 3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, 2, 2, -4, -2, -1, -1, -2, 4, 0, 2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, 1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ { -6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ { -3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, 3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 1 (cont.)

```

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

#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max 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 DMS 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 del) */
    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 *names[2]; /* seq names: getseqs() */
char *prog; /* prog name for err msgs */
char *seqs[2]; /* seqs: getseqs() */
int dmax; /* best diag: nw() */
int dmax0; /* final diag */
int dms; /* set if dms: main() */
int endgaps; /* set if penalizing end gaps */
int gaps, gapy; /* total gaps in seqs */
int lcol, lrow; /* seq lens */
int ngaps, ngapy; /* total size of gaps */
int smax; /* max score: nw() */
int *xmat; /* 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();

```

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 1 (cont')

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: prog1 file1 file2
 * where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 * The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
 * Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 * Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 * A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 * Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

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

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

main(ac,av)
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)? _dval : _pbval;

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

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

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

```

main

WO 00/73445

PCT/US00/13785

Table 1 (cont.)

```

/* do the alignment, return best score; mainw
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* prv: 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 seqs
* to a gap in seq y.
*/
nw()
{
    char          *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int           ndely, *dely;      /* keep track of dely */
    int           ndels, *dels;      /* keep track of dels */
    int           *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int           ins;               /* score for each type */
    int           ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register      id;                /* diagonal index */
    register      ij;                /* tmp index */
    register      *col0, *cell;     /* score for curr, last row */
    register      xx, yy;            /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diag", 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));
    cell = (int *)g_calloc("to get cell", 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 = seqs[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col0[0] = dels = -(ins0+ins1);
            else
                col0[0] = dels = col0[0] - ins1;
            ndels = xx;
        }
        else {
            col0[0] = 0;
            dels = -ins0;
            ndels = 0;
        }
    }
}

```

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 1 (cont')

...BW

```

for (py = seqs[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dual)
        mis += (xham[px-'A']&&xham[py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _dai[px-'A']["py-'A'"];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongoing 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 ongoing 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
     */

```


WQ 00/73445

PCT/US00/13705

Table 1 (cont.)

...nw

```

id = xx + yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    coll[yy] = mis;
else if (delx > -dely[yy]) {
    coll[yy] = delx;
    ij = dx[id].jump;
    if (dx[id].jp.n[0] && (ldna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij] + MX) || mis > dx[id].score + DINSO)) {
        dx[id].jump++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejump(k0);
            ij = dx[id].jump = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jump) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
}
else {
    coll[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].jump;
    if (dx[id].jp.n[0] && (ldna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij] + MX) || mis > dx[id].score + DINSO)) {
        dx[id].jump++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejump(k0);
            ij = dx[id].jump = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jump) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
    }
}
if (ex == len1 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        coll[yy] -= ins0 + ins1 * (len1 - yy);
    if (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0 + ins1 * (len0 - xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
}
map = coll; col0 = coll; coll = map;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)xcol0);
(void) free((char *)coll);
}

```

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 1 (cont')

```

/*
 *
 * 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()
 * stripnum() -- strip any path and prefix from a sequence
 */

#include "na.h"

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

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

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

    if ((fx = fopen(outfile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup();
    }
    fprintf(fx, "< first sequence: %s (length = %d)\n", names[0], len0);
    fprintf(fx, "< second sequence: %s (length = %d)\n", names[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    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();
}

```

print

WO 00/73448

PCT/US99/13708

Table 1 (cont.)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
int lx, ly;          /* "core" (minus endgaps) */
int firstgap, lastgap; /* leading/trailing overlap */
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char      outx[32];
    double    pct;
    register  u0, n1;
    register char *p0, *p1;

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

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            u1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbn[*p0-'A'] & xbn[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].u[i0]++)
                siz0 = pp[0].u[i0]++;
            if (n1++ == pp[1].u[i1]++)
                siz1 = pp[1].u[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 = 0? lx < ly? lx : ly;
    pct = 100.0*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(lx, "< %d match %s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

getmat

WQ 00/73445

PCT/US00/13705

Table 1 (cont.)

```

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

    fprintf(fx, "< gaps in second sequence: %d", gaps);
    if (gaps) {
        (void) printf(outx, " (%d %s%s)",
            ngaps, (dna)? "base": "residue", (ngaps == 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, DNAT, DMIS, DBNS0, 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      noc;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;         /* lengths of stripped file names */
static      ii[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 *pe[2];       /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINF]; /* output line */
static char star[P_LINF]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path ppf
 */
static
pr_align()
{
    int      no;          /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        no = strlen(name[i]);
        if (no > lmax)
            lmax = no;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = j[i] = 0;
        ps[i] = scap[i];
        pe[i] = out[i];
    }

```

...getmat

pr_align

WQ 00/73445

PCT/US00/13705

Table 1 (cont')

```

for (nn = n0; nn <= 0; more = 1; more++) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *pc[i]++ = ' ';
            pp[i].spc = 1;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *pc[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *pc[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);

            pc[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (m[i] == pp[i].x[i][0]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[i] + 1;
                while (m[i] == pp[i].x[i][0])
                    siz[i] = pp[i].n[i] + 1;
            }
            m[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            pc[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

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

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

```

..pr_align

dumpblock

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 1 (cont')

```

(void) puts("\n", fs);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && *out[i] != ' ' || *out[i] != '\n') {
        if (i == 0)
            numst(i);
        if (i == 0 && *out[i])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[i])
            fprintf(fs, star);
        if (i == 1)
            numst(i);
    }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
numst(fs)
    int fs; /* index in out[] holding seq line */
{
    char        aline[P.LINE];
    register
    register char *px, *py;

    for (pn = aline, i = 0; i < tmax + P.SP; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nel[fs], py = out[fs]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '\n')
            *pn = ' ';
        else {
            if ((i % 10 == 0 || (i == 1 && nel[fs] != 1)) {
                j = i < 0 ? -i : i;
                for (px = pn; j >= 10; px--)
                    *px = j % 10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nel[fs] = i;
    for (pn = aline; *pn; pn++)
        (void) puts(*pn, fs);
    (void) puts("\n", fs);
}

/*
 * put out a line (name, {unit}, seq, {num}): dumpblock()
 */
static
putline(fs)
    int fs;
{

```

...dumpblock

numst

putline

WQ 00/73445

PCT/US00/13705

Table 1 (cont')

```

int          i;
register char *px;

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

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

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

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

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

```

...putline

stars

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 1 (cont⁴)

```
/*
 * 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

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 1 (cont')

```

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

char *jname; /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

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

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup()
{
    int i;
    {
        if (fj)
            (void) unlink(jname);
        exit(1);
    }
}

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

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

```

cleanup

getseq

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 1 (cont')

```

...getseq
py = pseq + 4;
*len = 0;
rewind(fp);

while (!feof(fp)) {
    if (*line == '\n') { *line = '\0'; continue; }
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("AUGC", *px) != -1)
            ntagc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = ntagc > (flen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_alloc(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_alloc() 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()
{
    int fd = -1;
    int sz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (!i) {
        (void) fclose(fp);
        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--)

```

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 1 (cont')

...readjumps

```

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

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0 = i < 0; 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 = i < 0; 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 (t) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 1 (cont³)

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

writejumps

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 2A

PRO	XXXXXXXXXXXXXXXX	(Length = 15 amino acids)
Comparison Protein	XXXXXXYYYYYYY	(Length = 12 amino acids)

% amino acid sequence identity =

(the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the PRO polypeptide) =

5 divided by 15 = 33.3%

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 2B

PRO	XXXXXXXXXX	(Length = 10 amino acids)
Comparison Protein	XXXXXXXXYYYZZZ	(Length = 15 amino acids)

% amino acid sequence identity =

(the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the PRO polypeptide) =

5 divided by 10 = 50%

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 2C

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(Length = 14 nucleotides)
Comparison DNA	NNNNNNLLLLLLLL	(Length = 16 nucleotides)

% nucleic acid sequence identity =

(the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by
ALIGN-2) divided by (the total number of nucleotides of the PRO-DNA nucleic acid sequence) =

6 divided by 14 = 42.9%

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 2D

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNN	(Length = 12 nucleotides)
Comparison DNA	NNNNLLLV	(Length = 9 nucleotides)

% nucleic acid sequence identity =

(the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by
ALIGN-2) divided by (the total number of nucleotides of the PRO-DNA nucleic acid sequence) =

4 divided by 12 = 33.3%

WO 00/73445

PCT/US00/13705

II. Compositions and Methods of the Invention

A. PRO Variants

In addition to the full-length native sequence PRO polypeptides described herein, it is contemplated that PRO variants can be prepared. PRO variants can be prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the PRO DNA, and/or by synthesis of the desired PRO polypeptide. Those skilled in the art will appreciate that amino acid changes may alter post-translational processes of the PRO polypeptide such as changing the number or position of glycosylation sites or altering the membrane anchoring characteristics.

Variations in the native full-length sequence PRO polypeptide or in various domains of the PRO polypeptide described herein, can be made, for example, using any of the techniques and guidelines for conservative and non-conservative mutations set forth, for instance, in U.S. Patent No. 5,364,934. Variations may be a substitution, deletion or insertion of one or more codons encoding the PRO polypeptide that results in a change in the amino acid sequence of the PRO polypeptide as compared with the native sequence PRO polypeptide. Optionally the variation is by substitution of at least one amino acid with any other amino acid in one or more of the domains of the PRO polypeptide. Guidance in determining which amino acid residue may be inserted, substituted or deleted without adversely affecting the desired activity may be found by comparing the sequence of the PRO polypeptide with that of homologous known protein molecules and minimizing the number of amino acid sequence changes made in regions of high homology. Amino acid substitutions can be the result of replacing one amino acid with another amino acid having similar structural and/or chemical properties, such as the replacement of a leucine with a serine, i.e., conservative amino acid replacements. Insertions or deletions may optionally be in the range of about 1 to 5 amino acids. The variation allowed may be determined by systematically making insertions, deletions or substitutions of amino acids in the sequence and testing the resulting variants for activity exhibited by the full-length or mature native sequence.

In particular embodiments, conservative substitutions of interest are shown in Table 3 under the heading of preferred substitutions. If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated exemplary substitutions in Table 3, or as further described below in reference to amino acid classes, are introduced and the products screened.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Table 3

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala (A)	val; leu; ile	val
5 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
10 Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; nucleucine	leu
15 Leu (L)	nucleucine; 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
20 Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Tyr (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
25 Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; nucleucine	leu

Substantial modifications in function or immunological identity of the PRO polypeptide are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

(1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;

(2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;

(3) acidic: asp, glu;

35 (4) basic: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and

(6) aromatic: trp, tyr, phe.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class. Such substituted residues also may be introduced into the conservative substitution sites or, more preferably, into the remaining (non-conserved) sites.

The variations can be made using methods known in the art such as oligonucleotide-mediated (site-directed) mutagenesis, alanine scanning, and PCR mutagenesis. Site-directed mutagenesis [Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)], cassette mutagenesis [Wells *et al.*, *Gene*, 34:315 (1985)], restriction selection mutagenesis [Wells *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A*, 317:415 (1986)] or other known techniques can be performed on the cloned DNA to produce the PRO variant DNA.

Scanning amino acid analysis can also be employed to identify one or more amino acids along a contiguous sequence. Among the preferred scanning amino acids are relatively small, neutral amino acids. Such amino acids include alanine, glycine, serine, and cysteine. Alanine is typically a preferred scanning amino acid among this group because it eliminates the side-chain beyond the beta-carbon and is less likely to alter the main-chain conformation of the variant [Cunningham and Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989)]. Alanine is also typically preferred because it is the most common amino acid. Further, it is frequently found in both buried and exposed positions [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Choibis, *L. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. If alanine substitution does not yield adequate amounts of variant, an isomeric amino acid can be used.

B. Modifications of PRO Polypeptides

Covalent modifications of PRO polypeptides are included within the scope of this invention. One type of covalent modification includes reacting targeted amino acid residues of a PRO polypeptide with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the N- or C-terminal residues of the PRO polypeptide. Derivatization with bifunctional agents is useful, for instance, for crosslinking the PRO polypeptide to a water-insoluble support matrix or surface for use in the method for purifying anti-PRO antibodies, and vice-versa. Commonly used crosslinking agents include, e.g., 1,1-bis(diazocetyl)-2-phenylethane, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimide esters, for example, esters with 4-azidosalicylic acid, homobifunctional imidoesters, including disuccinimidyl esters such as 3,3'-dithiobis(succinimidylpropionate), bifunctional maleimides such as bis-N-maleimido-1,8-octane and agents such as methyl-3-[(p-azidophenyl)idibio]propionimidate.

Other modifications include deamidation of glutamyl and asparaginyl residues to the corresponding glutamyl and aspartyl residues, respectively, hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl or thronyl residues, methylation of the α -amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], acetylation of the N-terminal amine, and amidation of any C-terminal carboxyl group.

Another type of covalent modification of the PRO polypeptide included within the scope of this invention comprises altering the native glycosylation pattern of the polypeptide. "Altering the native glycosylation pattern" is intended for purposes herein to mean deleting one or more carbohydrate moieties found in the native sequence PRO polypeptide (either by removing the underlying glycosylation site or by deleting the glycosylation by chemical and/or enzymatic means), and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the native sequence PRO polypeptide. In addition, the phrase includes qualitative changes in the glycosylation of the native proteins,

WO 00/73445

PCT/US00/13705

involving a change in the nature and proportions of the various carbohydrate moieties present.

Addition of glycosylation sites to the PRO polypeptide may be accomplished by altering the amino acid sequence. The alteration may be made, for example, by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the native sequence PRO polypeptide (for O-linked glycosylation sites). The PRO amino acid sequence may optionally be altered through changes at the DNA level, particularly by mutating the DNA encoding the PRO polypeptide at preselected bases such that codons are generated that will translate into the desired amino acids.

Another means of increasing the number of carbohydrate moieties on the PRO polypeptide is by chemical or enzymatic coupling of glycosides to the polypeptide. Such methods are described in the art, e.g., in WO 87/05330 published 11 September 1987, and in Aptin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

Removal of carbohydrate moieties present on the PRO polypeptide may be accomplished chemically or enzymatically or by mutational substitution of codons encoding for amino acid residues that serve as targets for glycosylation. Chemical deglycosylation techniques are known in the art and described, for instance, by Hakimoddin, *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) and by Edge *et al.*, *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). Enzymatic cleavage of carbohydrate moieties on polypeptides can be achieved by the use of a variety of endo- and exo-glycosidases as described by Thotakura *et al.*, *Methods Enzymol.*, 138:350 (1987).

Another type of covalent modification of the PRO polypeptide comprises linking the PRO polypeptide to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol, or polyoxyalkylenes, in the manner set forth in U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337.

The PRO polypeptide of the present invention may also be modified in a way to form a chimeric molecule comprising the PRO polypeptide fused to another, heterologous polypeptide or amino acid sequence.

In one embodiment, such a chimeric molecule comprises a fusion of the PRO polypeptide with a tag polypeptide which provides an epitope to which an anti-tag antibody can selectively bind. The epitope tag is generally placed at the amino- or carboxyl-terminus of the PRO polypeptide. The presence of such epitope-tagged forms of the PRO polypeptide can be detected using an antibody against the tag polypeptide. Also, provision of the epitope tag enables the PRO polypeptide to be readily purified by affinity purification using an anti-tag antibody or another type of affinity matrix that binds to the epitope tag. Various tag polypeptides and their respective antibodies are well known in the art. Examples include poly-histidine (poly-His) or poly-histidine-glycine (poly-His-gly) tags, the flu HA tag polypeptide and its antibody 12CA5 [Field *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]; the c-myc tag and the 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 and 9E10 antibodies thereto [Evan *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; and the Herpes Simplex virus glycoprotein D (gD) tag and its antibody [Paborsky *et al.*, *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]. Other tag polypeptides include the Flag-peptide [Hopp *et al.*, *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; the KT3 epitope peptide [Martin *et al.*, *Science*, 255:192-194 (1992)]; an α -tubulin epitope peptide [Skinner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]; and the T7 gene 10 protein peptide tag [Lutz-Freyermuth *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

In an alternative embodiment, the chimeric molecule may comprise a fusion of the PRO polypeptide with an immunoglobulin or a particular region of an immunoglobulin. For a bivalent form of the chimeric molecule (also

WO 00/73445

PCT/US00/13705

referred to as an "immunoadhesin"), such a fusion could be to the Fc region of an IgG molecule. The Ig fusions preferably include the substitution of a soluble (transmembrane domain deleted or inactivated) form of a PRO polypeptide in place of at least one variable region within an Ig molecule. In a particularly preferred embodiment, the immunoglobulin fusion includes the hinge, CH2 and CH3, or the hinge, CH1, CH2 and CH3 regions of an IgG1 molecule. For the production of immunoglobulin fusions see also: U.S. Patent No. 5,428,130 issued June 27, 1995.

C. Preparation of the PRO Polypeptide

The present invention provides newly identified and isolated nucleotide sequences encoding polypeptides referred to in the present application as PRO polypeptides. In particular, cDNAs encoding PRO polypeptides have been identified and isolated, as disclosed in further detail in the Examples below. It is noted that proteins produced in separate expression rounds may be given different PRO numbers but the UNQ number is unique for any given DNA and the encoded protein, and will not be changed. However, for sake of simplicity, in the present specification the protein encoded by the PRO DNA as well as all further native homologues and variants included in the foregoing definition of PRO polypeptides, will be referred to as "PRO" regardless of their origin or mode of preparation.

The description below relates primarily to production of PRO polypeptides by culturing cells transformed or transfected with a vector containing nucleic acid encoding PRO polypeptides. It is, of course, contemplated that alternative methods that are well known in the art may be employed to prepare the PRO polypeptide. For instance, the PRO polypeptide sequence, or portions thereof, may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques. See, e.g., Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis (W.H. Freeman Co.: San Francisco, CA, 1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., **85**: 2149-2154 (1963). *In vitro* protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be accomplished, for instance, with an Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) using manufacturer's instructions. Various portions of the PRO polypeptide may be chemically synthesized separately and combined using chemical or enzymatic methods to produce the full-length PRO polypeptide.

1. Isolation of DNA Encoding PRO Polypeptides

DNA encoding the PRO polypeptide may be obtained from a cDNA library prepared from tissue believed to possess the mRNA encoding the PRO polypeptide and to express it at a detectable level. Accordingly, DNAs encoding the human PRO polypeptide can be conveniently obtained from cDNA libraries prepared from human tissues, such as described in the Examples. The gene encoding the PRO polypeptide may also be obtained from a genomic library or by oligonucleotide synthesis.

Libraries can be screened with probes (such as antibodies to the PRO polypeptide or oligonucleotides of at least about 20-80 bases) designed to identify the gene of interest or the protein encoded by it. Screening the cDNA or genomic library with the selected probe may be conducted using standard procedures, such as described in Sambrook *et al.*, *supra*. An alternative means to isolate the gene encoding the PRO polypeptide is to use PCR methodology. Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995).

WO 00/73445

PCT/US00/13705

The Examples below describe techniques for screening a cDNA library. The oligonucleotide sequences selected as probes should be of sufficient length and sufficiently unambiguous that false positives are minimized. The oligonucleotide is preferably labeled such that it can be detected upon hybridization to DNA in the library being screened. Methods of labeling are well known in the art, and include the use of radiolabels like ^{32}P -labeled ATP, biotinylation, or enzyme labeling. Hybridization conditions, including moderate stringency and high stringency, are provided in Sambrook *et al.*, *supra*.

Sequences identified in such library screening methods can be compared and aligned to other known sequences deposited and available in public databases such as GenBank or other private sequence databases. Sequence identity (at either the amino acid or nucleotide level) within defined regions of the molecule or across the full-length sequence can be determined through sequence alignment using computer software programs such as ALIGN, DNAsar, and INHERIT, which employ various algorithms to measure homology.

Nucleic acid having protein coding sequence may be obtained by screening selected cDNA or genomic libraries using the deduced amino acid sequence disclosed herein for the first time, and, if necessary, using conventional primer extension procedures as described in Sambrook *et al.*, *supra*, to detect precursors and processing intermediates of mRNA that may not have been reverse-transcribed into cDNA.

ii. Selection and Transformation of Host Cells

Host cells are transfected or transformed with expression or cloning vectors described herein for PRO polypeptide production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences. The culture conditions, such as media, temperature, pH, and the like, can be selected by the skilled artisan without undue experimentation. In general, principles, protocols, and practical techniques for maximizing the productivity of cell cultures can be found in *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) and Sambrook *et al.*, *supra*.

Methods of transfection are known to the ordinarily skilled artisan, for example, CaPO_4 treatment and electroporation. Depending on the host cell used, transformation is performed using standard techniques appropriate to such cells. The calcium treatment employing calcium chloride, as described in Sambrook *et al.*, *supra*, or electroporation is generally used for prokaryotes or other cells that contain substantial cell-wall barriers. Infection with *Agrobacterium tumefaciens* is used for transformation of certain plant cells, as described by Shaw *et al.*, *Gene*, 23: 315 (1983) and WO 89/05859 published 29 June 1989. For mammalian cells without such cell walls, the calcium phosphate precipitation method of Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978) can be employed. General aspects of mammalian cell host system transformations have been described in U.S. Patent No. 4,399,216. Transformations into yeast are typically carried out according to the method of Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) and Hsian *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). However, other methods for introducing DNA into cells, such as by nuclear microinjection, electroporation, bacterial protoplast fusion with intact cells, or polycations, *e.g.*, polybrene or polyornithine, may also be used. For various techniques for transforming mammalian cells, see, Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) and Mansour *et al.*, *Nature*, 336: 348-352 (1988).

WO 00/73445

PCT/US00/L3705

Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein include prokaryote, yeast, or higher eukaryote cells. Suitable prokaryotes include, but are not limited to, eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms, for example, Enterobacteriaceae such as *E. coli*. Various *E. coli* strains are publicly available, such as *E. coli* K12 strain MM294 (ATCC 31.416); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); *E. coli* strain W3110 (ATCC 27,325); and KS 772 (ATCC 53.635). Other suitable prokaryotic host cells include Enterobacteriaceae such as *Escherichia*, e.g., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pracoccus*, *Salmonella*, e.g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e.g., *Serratia marcescens*, and *Shigella*, as well as *Bacilli* such as *B. subtilis* and *B. licheniformis* (e.g., *B. licheniformis* 41P disclosed in DD 266,710 published 12 April 1989). *Pseudomonas* such as *P. aeruginosa*, and *Streptomyces*. These examples are illustrative rather than limiting. Strain W3110 is one particularly preferred host or parent host because it is a common host strain for recombinant DNA product fermentations. Preferably, the host cell secretes minimal amounts of proteolytic enzymes. For example, strain W3110 may be modified to effect a genetic mutation in the genes encoding proteins endogenous to the host, with examples of such hosts including *E. coli* W3110 strain 1A2, which has the complete genotype *tonA*; *E. coli* W3110 strain 9F4, which has the complete genotype *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 strain 27C7 (ATCC 55,244), which has the complete genotype *tonA ptr3 phdA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan*; *E. coli* W3110 strain 37D6, which has the complete genotype *tonA ptr3 phdA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ltrG kan*; *E. coli* W3110 strain 40B4, which is strain 37D6 with a non-kanamycin resistant *degP* deletion mutation; and an *E. coli* strain having mutant periplasmic protease disclosed in U.S. Patent No. 4,946,783 issued 7 August 1990. Alternatively, *in vitro* methods of cloning, e.g., PCR or other nucleic acid polymerase reactions, are suitable.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning or expression hosts for vectors encoding the PRO polypeptide. *Saccharomyces cerevisiae* is a commonly used lower eukaryotic host microorganism. Others include *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; EP 139,383 published 2 May 1985); *Kluyveromyces* hosts (U.S. Patent No. 4,943,529; Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991)) such as, e.g., *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, *J. Bacteriol.*, 737 [1983]); *K. fragilis* (ATCC 12,424); *K. bulgaricus* (ATCC 16,045); *K. wickerhamii* (ATCC 24,178); *K. waltii* (ATCC 56,500); *K. drosophilatum* (ATCC 36,906; Van den Berg *et al.*, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990)); *K. thermotolerans*, and *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna *et al.*, *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Caso *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979]); *Schwannomyces* such as *Schwannomyces occidentalis* (EP 394,538 published 31 October 1990); and filamentous fungi such as, e.g., *Neurospora*, *Penicillium*, *Trichoplectidum* (WO 91/00357 published 10 January 1991), and *Aspergillus* hosts such as *A. nidulans* (Ballance *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tibbitt *et al.*, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) and *A. niger* (Kelly and Hynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985]). Methylophilic yeasts are suitable herein and include, but are not limited to, yeast capable of growth on methanol selected from the genera consisting of *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, and *Rhodotorula*. A list of specific species that are exemplary of this class of yeasts may be found in C. Anthony, *The Biochemistry of Methylophilic*, 269 (1982).

Suitable host cells for the expression of nucleic acid encoding glycosylated PRO polypeptides are derived from

WO 00/73445

PCT/US00/13785

multicellular organisms. Examples of invertebrate cells include insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9, as well as plant cells. Examples of useful mammalian host cell lines include Chinese hamster ovary (CHO) and COS cells. More specific examples include monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36: 59 (1977)); Chinese hamster ovary cells/DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); mouse sertoli cells (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); human lung cells (WI38, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); and mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL 51). The selection of the appropriate host cell is deemed to be within the skill in the art.

iii. Selection and Use of a Replicable Vector

10 The nucleic acid (e.g., cDNA or genomic DNA) encoding the PRO polypeptide may be inserted into a replicable vector for cloning (amplification of the DNA) or for expression. Various vectors are publicly available. The vector may, for example, be in the form of a plasmid, cosmid, viral particle, or phage. The appropriate nucleic acid sequence may be inserted into the vector by a variety of procedures. In general, DNA is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) using techniques known in the art. Vector components generally include, but are not limited to, one or more of a signal sequence if the sequence is to be secreted, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence. Construction of suitable vectors containing one or more of these components employs standard ligation techniques that are known to the skilled artisan.

20 The PRO polypeptide may be produced recombinantly not only directly, but also as a fusion polypeptide with a heterologous polypeptide, which may be a signal sequence or other polypeptide having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide. In general, the signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of the DNA encoding the PRO polypeptide that is inserted into the vector. The signal sequence may be a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, lpp, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion the signal sequence may be, e.g., the yeast invertase leader, alpha factor leader (including *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* α -factor leaders, the latter described in U.S. Patent No. 5,010,182), or acid phosphatase leader, the *C. albicans* glucanase leader (EP 362,179 published 4 April 1990), or the signal described in WO 90/13646 published 15 November 1990. In mammalian cell expression, mammalian signal sequences may be used to direct secretion of the protein, such as signal sequences from secreted polypeptides of the same or related species, as well as viral secretory leaders.

30 Both expression and cloning vectors contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. Such sequences are well known for a variety of bacteria, yeast, and viruses. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria, the 2 μ plasmid origin is suitable for yeast, and various viral origins (SV40, polyoma, adenovirus, VSV, or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells.

35 Expression and cloning vectors will typically contain a selection gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients

WO 00/73445

PCT/US00/13705

not available from complex media, e.g., the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*.

An example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the nucleic acid encoding the PRO polypeptide such as DHFR or thymidine kinase. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the CHO cell line deficient in DHFR activity, prepared and propagated as described by Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 4216 (1980). A suitable selection gene for use in yeast is the *trp1* gene present in the yeast plasmid YRp7. Stinchcomb *et al.*, *Nature*, **282**: 39 (1979); Kingston *et al.*, *Gene*, **7**: 141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene*, **10**: 157 (1980). The *trp1* gene provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example, ATCC No. 44076 or PEP4-1. Jones, *Genetics*, **85**: 12 (1977).

Expression and cloning vectors usually contain a promoter operably linked to the nucleic acid sequence encoding the PRO polypeptide to direct mRNA synthesis. Promoters recognized by a variety of potential host cells are well known. Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the β -lactamase and lactose promoter systems (Chang *et al.*, *Nature*, **275**: 615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature*, **281**: 544 (1979)), alkaline phosphatase, a tryptophan (*trp*) promoter system (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, **8**: 4057 (1980); EP 36,776), and hybrid promoters such as the *tac* promoter (deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 21-25 (1983)). Promoters for use in bacterial systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding the PRO polypeptide.

Examples of suitable promoting sequences for use with yeast hosts include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase (Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **255**: 2073 (1980)) or other glycolytic enzymes (Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Res.*, **7**: 149 (1968); Holland, *Biochemistry*, **17**: 4900 (1978)), such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase.

Other yeast promoters that are inducible promoters having the additional advantage of transcription controlled by growth conditions are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, metallothionein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in EP 73,657.

PRO nucleic acid transcription from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus (UK 2,211,504 published 5 July 1989), adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus, and Simian Virus 40 (SV40); by heterologous mammalian promoters, e.g., the actin promoter or an immunoglobulin promoter; and by heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.

Transcription of a DNA encoding the PRO polypeptide by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp, that act on a promoter to increase its transcription. Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase, albumin, α -fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from

WO 00/73445

PCT/US00/13705

a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the sequence coding for PRO polypeptides, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

5 Expression vectors used in eukaryotic host cells (yeast, fungi, insect, plant, animal, human, or nucleated cells from other multicellular organisms) will also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and, occasionally 3', untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding the PRO polypeptide.

10 Still other methods, vectors, and host cells suitable for adaptation to the synthesis of the PRO polypeptide in recombinant vertebrate cell culture are described in Gething *et al.*, *Nature*, **292**: 620-625 (1981); Mantel *et al.*, *Nature*, **281**: 40-46 (1979); EP 117,060; and EP 117,058.

iv. Detecting Gene Amplification/Expression

Gene amplification and/or expression may be measured in a sample directly, for example, by conventional
15 Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**:5201-5205 (1980)), dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequences provided herein. Alternatively, antibodies may be employed that can recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes. The antibodies in turn may be labeled and the assay may be carried out where the duplex is bound to a surface, so
20 that upon the formation of duplex on the surface, the presence of antibody bound to the duplex can be detected.

Gene expression, alternatively, may be measured by immunological methods, such as immunohistochemical staining of cells or tissue sections and assay of cell culture or body fluids, to quantitate directly the expression of gene product. Antibodies useful for immunohistochemical staining and/or assay of sample fluids may be either monoclonal or polyclonal, and may be prepared in any mammal. Conveniently, the antibodies may be prepared
25 against a native-sequence PRO polypeptide or against a synthetic peptide based on the DNA sequences provided herein or against exogenous sequence fused to DNA encoding the PRO polypeptide and encoding a specific antibody epitope.

v. Purification of PRO Polypeptides

Forms of PRO polypeptides may be recovered from culture medium or from host cell lysates. If membrane-bound, it can be released from the membrane using a suitable detergent solution (*e.g.*, TRITON-X™ 100) or by
30 enzymatic cleavage. Cells employed in expression of nucleic acid encoding the PRO polypeptide can be disrupted by various physical or chemical means, such as freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or cell-lysing agents. It may be desired to purify the PRO polypeptide from recombinant cell proteins or polypeptides. The following procedures are exemplary of suitable purification procedures: by fractionation on an ion-exchange
35 column; ethanol precipitation; reverse phase HPLC; chromatography on silica or on a cation-exchange resin such as DEAE; chromatofocusing; SDS-PAGE; ammonium sulfate precipitation; gel filtration using, for example,

WO 00/73445

PCT/US00/13705

- Sephadex G-75; protein A Sepharose columns to remove contaminants such as IgG; and metal chelating columns to bind epitope-tagged forms of the PRO polypeptide. Various methods of protein purification may be employed and such methods are known in the art and described, for example, in Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (Springer-Verlag: New York, 1982). The purification step(s) selected will depend, for example, on the nature of the production process used and the particular PRO polypeptide produced.

D. Uses of PRO Polypeptides

i. Assays for Cardiovascular, Endothelial, and Angiogenic Activity

- Various assays can be used to test the polypeptide herein for cardiovascular, endothelial, and angiogenic activity. Such assays include those provided in the Examples below.

- Assays for testing for endothelin antagonist activity, as disclosed in U.S. Pat. No. 5,773,414, include a rat heart ventricle binding assay where the polypeptide is tested for its ability to inhibit iodinated endothelin-1 binding in a receptor assay, an endothelin receptor binding assay testing for intact cell binding of radiolabeled endothelin-1 using rabbit renal artery vascular smooth muscle cells, an inositol phosphoric acid accumulation assay where functional activity is determined in Rat-1 cells by measuring intra-cellular levels of second messengers, an arachidonic acid release assay that measures the ability of added compounds to reduce endothelin-stimulated arachidonic acid release in cultured vascular smooth muscles, *in vitro* (isolated vessel) studies using endothelium from male New Zealand rabbits, and *in vivo* studies using male Sprague-Dawley rats.

- Assays for tissue generation activity include, without limitation, those described in WO 95/16035 (bone, cartilage, tendon); WO 95/05846 (nerve, neuronal), and WO 91/07491 (skin, endothelium).

Assays for wound-healing activity include, for example, those described in Winter, Epidermal Wound Healing, Malbach, HJ and Roove, DT, eds. (Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago), pp. 71-112, as modified by the article of Englestein and Mertz, J. Invest. Dermatol., 71: 382-384 (1978).

- An assay to screen for a test molecule relating to a PRO polypeptide that binds an endothelin B₁ (ETB₁) receptor polypeptide and modulates signal transduction activity involves providing a host cell transformed with a DNA encoding endothelin B₁ receptor polypeptide, exposing the cells to the test candidate, and measuring endothelin B₁ receptor signal transduction activity, as described, e.g., in U.S. Pat. No. 5,773,223.

- There are several cardiac hypertrophy assays. *In vitro* assays include induction of spreading of adult rat cardiac myocytes. In this assay, ventricular myocytes are isolated from a single (male Sprague-Dawley) rat, essentially following a modification of the procedure described in detail by Piper *et al.*, "Adult ventricular rat heart muscle cells" in Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research, H.M. Piper, ed. (Berlin: Springer-Verlag, 1990), pp. 36-60. This procedure permits the isolation of adult ventricular myocytes and the long-term culture of these cells in the rod-shaped phenotype. Phenylephrine and Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) have been shown to induce a spreading response in these adult cells. The inhibition of myocyte spreading induced by PGF_{2α} or PGF_{2α} analogs (e.g., fluprostenol) and phenylephrine by various potential inhibitors of cardiac hypertrophy is then tested.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

One example of an *in vivo* assay is a test for inhibiting cardiac hypertrophy induced by fluprostenol *in vivo*. This pharmacological model tests the ability of the PRO polypeptide to inhibit cardiac hypertrophy induced in rats (e.g., male Wistar or Sprague-Dawley) by subcutaneous injection of fluprostenol (an agonist analog of $\text{PGF}_{2\alpha}$). It is known that rats with pathologic cardiac hypertrophy induced by myocardial infarction have chronically elevated levels of extractable $\text{PGF}_{2\alpha}$ in their myocardium. Lai *et al.*, *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*, 271: H2197-H2208 (1996). Accordingly, factors that can inhibit the effects of fluprostenol on myocardial growth *in vivo* are potentially useful for treating cardiac hypertrophy. The effects of the PRO polypeptide on cardiac hypertrophy are determined by measuring the weight of heart, ventricles, and left ventricle (normalized by body weight) relative to fluprostenol-treated rats not receiving the PRO polypeptide.

Another example of an *in vivo* assay is the pressure-overload cardiac hypertrophy assay. For *in vivo* testing it is common to induce pressure-overload cardiac hypertrophy by constriction of the abdominal aorta of test animals. In a typical protocol, rats (e.g., male Wistar or Sprague-Dawley) are treated under anesthesia, and the abdominal aorta of each rat is narrowed down just below the diaphragm. Beznak M., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 33: 985-94 (1955). The aorta is exposed through a surgical incision, and a blunted needle is placed next to the vessel. The aorta is constricted with a ligature of silk thread around the needle, which is immediately removed and which reduces the lumen of the aorta to the diameter of the needle. This approach is described, for example, in Ross *et al.*, *Am. Heart J.*, 124: 700-709 (1992) and O'Rourke and Reibel, *P.S.E.M.B.*, 200: 95-100 (1992).

In yet another *in vivo* assay, the effect on cardiac hypertrophy following experimentally induced myocardial infarction (MI) is measured. Acute MI is induced in rats by left coronary artery ligation and confirmed by electrocardiographic examination. A sham-operated group of animals is also prepared as control animals. Earlier data have shown that cardiac hypertrophy is present in the group of animals with MI, as evidenced by an 18% increase in heart weight-to-body weight ratio. Lai *et al.*, *supra*. Treatment of these animals with candidate blockers of cardiac hypertrophy, e.g., the PRO polypeptide, provides valuable information about the therapeutic potential of the candidates tested. One further such assay test for induction of cardiac hypertrophy is disclosed in U.S. Pat. No. 5,773,415, using Sprague-Dawley rats.

For cancer, a variety of well-known animal models can be used to further understand the role of the genes identified herein in the development and pathogenesis of tumors, and to test the efficacy of candidate therapeutic agents, including antibodies and other antagonists of native PRO polypeptides, such as small-molecule antagonists. The *in vivo* nature of such models makes them particularly predictive of responses in human patients. Animal models of tumors and cancers (e.g., breast cancer, colon cancer, prostate cancer, lung cancer, etc.) include both non-recombinant and recombinant (transgenic) animals. Non-recombinant animal models include, for example, rodent, e.g., murine models. Such models can be generated by introducing tumor cells into syngeneic mice using standard techniques, e.g., subcutaneous injection, tail vein injection, spleen implantation, intraperitoneal implantation, implantation under the renal capsule, or orthotopic implantation, e.g., colon cancer cells implanted in colonic tissue. See, e.g., PCT publication No. WO 97/33551, published September 18, 1997. Probably the most often used animal species in oncological studies are immunodeficient mice and, in particular, nude mice. The observation that the nude mouse with thymic hypoplasia could successfully act as a host for human tumor xenografts has led to its widespread use for this purpose. The autosomal recessive *nu* gene has been introduced

WO 00/73445

PCT/US00/13705

into a very large number of distinct congenic strains of nude mouse, including, for example, ASW, A/Hc, AKR, BALB/c, B10.LP, C17, C3H, C57BL, C57, CBA, DBA, DDD, I/St, NC, NHR, NFS, NFS/N, NZB, NZC, NZW, P, RIII, and SJL. In addition, a wide variety of other animals with inherited immunological defects other than the nude mouse have been bred and used as recipients of tumor xenografts. For further details see, e.g., The Nude

5 Mouse in Oncology Research, E. Boven and B. Winograd, eds. (CRC Press, Inc., 1991).

The cells introduced into such animals can be derived from known tumor/cancer cell lines, such as any of the above-listed tumor cell lines, and, for example, the B104-1-1 cell line (stable NIH-3T3 cell line transfected with the *neu* protooncogene), *ras*-transfected NIH-3T3 cells; Caco-2 (ATCC HTB-37); or a moderately well

10 differentiated grade II human colon adenocarcinoma cell line, HT-29 (ATCC HTB-38); or from tumors and cancers. Samples of tumor or cancer cells can be obtained from patients undergoing surgery, using standard conditions involving freezing and storing in liquid nitrogen. Kannali *et al.*, Br. J. Cancer, 48: 689-696 (1983).

Tumor cells can be introduced into animals such as nude mice by a variety of procedures. The subcutaneous (s.c.) space in mice is very suitable for tumor implantation. Tumors can be transplanted s.c. as solid blocks, as needle biopsies by use of a trocar, or as cell suspensions. For solid-block or trocar implantation, tumor tissue

15 fragments of suitable size are introduced into the s.c. space. Cell suspensions are freshly prepared from primary tumors or stable tumor cell lines, and injected subcutaneously. Tumor cells can also be injected as subdermal implants. In this location, the inoculum is deposited between the lower part of the dermal connective tissue and the s.c. tissue.

Animal models of breast cancer can be generated, for example, by implanting rat neuroblastoma cells (from which the *neu* oncogene was initially isolated), or *neu*-transformed NIH-3T3 cells into nude mice, essentially as

20 described by Drebin *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 9129-9133 (1986).

Similarly, animal models of colon cancer can be generated by passaging colon cancer cells in animals, e.g., nude mice, leading to the appearance of tumors in these animals. An orthotopic transplant model of human colon cancer in nude mice has been described, for example, by Wang *et al.*, Cancer Research, 54: 4726-4728 (1994) and

25 Too *et al.*, Cancer Research, 55: 681-684 (1995). This model is based on the so-called "MCF/AMOUSE"TM sold by AmnCancer, Inc., (San Diego, California).

Tumors that arise in animals can be removed and cultured *in vitro*. Cells from the *in vitro* cultures can then be passaged to animals. Such tumors can serve as targets for further testing or drug screening. Alternatively, the tumors resulting from the passage can be isolated and RNA from pre-passage cells and cells isolated after one or

30 more rounds of passage analyzed for differential expression of genes of interest. Such passaging techniques can be performed with any known tumor or cancer cell lines.

For example, Meth A, CMS4, CMS5, CMS21, and WEHI-164 are chemically induced fibrosarcomas of BALB/c female mice (DeLeo *et al.*, J. Exp. Med., 146: 720 (1977)), which provide a highly controllable model

35 system for studying the anti-tumor activities of various agents. Palladino *et al.*, J. Immunol., 138: 4023-4032

(1987). Briefly, tumor cells are propagated *in vitro* in cell culture. Prior to injection into the animals, the cell lines are washed and suspended in buffer, at a cell density of about 10×10^6 to 10×10^7 cells/ml. The animals are then

inoculated subcutaneously with 10 to 100 μ l of the cell suspension, allowing one to three weeks for a tumor to appear.

In addition, the Lewis lung (3LL) carcinoma of mice, which is one of the most thoroughly studied

WO 00/73445

PCT/US00/13705

experimental tumors, can be used as an investigational tumor model. Efficacy in this tumor model has been correlated with beneficial effects in the treatment of human patients diagnosed with small-cell carcinoma of the lung (SCLC). This tumor can be introduced in normal mice upon injection of tumor fragments from an affected mouse or of cells maintained in culture. Zupi *et al.*, Br. J. Cancer, 41: suppl. 4, 30 (1980). Evidence indicates that tumors can be started from injection of even a single cell and that a very high proportion of injected tumor cells survive. For further information about this tumor model see, Zacharski, Haemostasis, 16: 300-320 (1986).

One way of evaluating the efficacy of a test compound in an animal model with an implanted tumor is to measure the size of the tumor before and after treatment. Traditionally, the size of implanted tumors has been measured with a slide caliper in two or three dimensions. The measure limited to two dimensions does not accurately reflect the size of the tumor; therefore, it is usually converted into the corresponding volume by using a mathematical formula. However, the measurement of tumor size is very inaccurate. The therapeutic effects of a drug candidate can be better described as treatment-induced growth delay and specific growth delay. Another important variable in the description of tumor growth is the tumor volume doubling time. Computer programs for the calculation and description of tumor growth are also available, such as the program reported by Rygaard and Spang-Thomsen, Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals, Wu and Sheng eds. (Basel, 1989), p. 30. It is noted, however, that necrosis and inflammatory responses following treatment may actually result in an increase in tumor size, at least initially. Therefore, these changes need to be carefully monitored, by a combination of a morphometric method and flow cytometric analysis.

Further, recombinant (transgenic) animal models can be engineered by introducing the coding portion of the PRO gene identified herein into the genome of animals of interest, using standard techniques for producing transgenic animals. Animals that can serve as a target for transgenic manipulation include, without limitation, mice, rats, rabbits, guinea pigs, sheep, goats, pigs, and non-human primates, e.g., baboons, chimpanzees and monkeys. Techniques known in the art to introduce a transgene into such animals include pronuclear microinjection (U.S. Patent No. 4,873,191); retrovirus-mediated gene transfer into germ lines (e.g., Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6148-615 (1985)); gene targeting in embryonic stem cells (Thompson *et al.*, Cell, 56: 313-321 (1989)); electroporation of embryos (Lu, Mol. Cell. Biol., 3: 1803-1814 (1983)); and sperm-mediated gene transfer. Lavitolo *et al.*, Cell, 57: 717-73 (1989). For a review, see for example, U.S. Patent No. 4,736,866.

For the purpose of the present invention, transgenic animals include those that carry the transgene only in part of their cells ("mosaic animals"). The transgene can be integrated either as a single transgene, or in concatamers, e.g., head-to-head or head-to-tail tandems. Selective introduction of a transgene into a particular cell type is also possible by following, for example, the technique of Lasko *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6232-6236 (1992).

The expression of the transgene in transgenic animals can be monitored by standard techniques. For example, Southern blot analysis or PCR amplification can be used to verify the integration of the transgene. The level of mRNA expression can then be analyzed using techniques such as *in situ* hybridization, Northern blot analysis, PCR, or immunocytochemistry. The animals are further examined for signs of tumor or cancer development.

Alternatively, "knock-out" animals can be constructed that have a defective or altered gene encoding a PRO polypeptide identified herein, as a result of homologous recombination between the endogenous gene encoding the PRO polypeptide and altered genomic DNA encoding the same polypeptide introduced into an embryonic cell of

WO 00/73445

PCT/US00/13705

the animal. For example, cDNA encoding a particular PRO polypeptide can be used to clone genomic DNA encoding that polypeptide in accordance with established techniques. A portion of the genomic DNA encoding a particular PRO polypeptide can be deleted or replaced with another gene, such as a gene encoding a selectable marker that can be used to monitor integration. Typically, several kilobases of unaltered flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the vector. See, e.g., Thomas and Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) for a description of homologous recombination vectors. The vector is introduced into an embryonic stem cell line (e.g., by electroporation) and cells in which the introduced DNA has homologously recombined with the endogenous DNA are selected. See, e.g., Li *et al.*, *Cell*, 69: 915 (1992). The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (e.g., a mouse or rat) to form aggregation chimeras. See, e.g., Bradley, in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL: Oxford, 1987), pp. 113-152. A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal and the embryo brought to term to create a "knock-out" animal. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be identified by standard techniques and used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously recombined DNA. Knockout animals can be characterized, for instance, by their ability to defend against certain pathological conditions and by their development of pathological conditions due to absence of the PRO polypeptide.

The efficacy of antibodies specifically binding the PRO polypeptides identified herein, and other drug candidates, can be tested also in the treatment of spontaneous animal tumors. A suitable target for such studies is the feline oral squamous cell carcinoma (SCC). Feline oral SCC is a highly invasive, malignant tumor that is the most common oral malignancy of cats, accounting for over 60% of the oral tumors reported in this species. It rarely metastasizes to distant sites, although this low incidence of metastasis may merely be a reflection of the short survival times for cats with this tumor. These tumors are usually not amenable to surgery, primarily because of the anatomy of the feline oral cavity. At present, there is no effective treatment for this tumor. Prior to entry into the study, each cat undergoes complete clinical examination and biopsy, and is scanned by computed tomography (CT). Cats diagnosed with sublingual oral squamous cell tumors are excluded from the study. The tongue can become paralyzed as a result of such tumor, and even if the treatment kills the tumor, the animals may not be able to feed themselves. Each cat is treated repeatedly, over a longer period of time. Photographs of the tumors will be taken daily during the treatment period, and at each subsequent recheck. After treatment, each cat undergoes another CT scan. CT scans and thoracic radiographs are evaluated every 8 weeks thereafter. The data are evaluated for differences in survival, response, and toxicity as compared to control groups. Positive response may require evidence of tumor regression, preferably with improvement of quality of life and/or increased life span.

In addition, other spontaneous animal tumors, such as fibrosarcoma, adenocarcinoma, lymphoma, chondroma, or leiomyosarcoma of dogs, cats, and baboons can also be tested. Of these, mammary adenocarcinoma in dogs and cats is a preferred model as its appearance and behavior are very similar to those in humans. However, the use of this model is limited by the rare occurrence of this type of tumor in animals.

Other *in vitro* and *in vivo* cardiovascular, endothelial, and angiogenic tests known in the art are also suitable herein.

ii. Tissue Distribution

WO 00/73445

PCT/US00/13705

The results of the cardiovascular, endothelial, and angiogenic assays herein can be verified by further studies, such as by determining mRNA expression in various human tissues.

- As noted before, gene amplification and/or gene expression in various tissues may be measured by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77:5201-5205 (1980)), dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequences provided herein. Alternatively, antibodies may be employed that can recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes.
- Gene expression in various tissues, alternatively, may be measured by immunological methods, such as immunohistochemical staining of tissue sections and assay of cell culture or body fluids, to quantitate directly the expression of gene product. Antibodies useful for immunohistochemical staining and/or assay of sample fluids may be either monoclonal or polyclonal, and may be prepared in any mammal. Conveniently, the antibodies may be prepared against a native-sequence PRO polypeptide or against a synthetic peptide based on the DNA sequences provided herein or against exogenous sequence fused to PRO DNA and encoding a specific antibody epitope.
- General techniques for generating antibodies, and special protocols for *in situ* hybridization are provided hereinbelow.

iii. Antibody Binding Studies

- The results of the cardiovascular, endothelial, and angiogenic study can be further verified by antibody binding studies, in which the ability of anti-PRO antibodies to inhibit the effect of the PRO polypeptides on endothelial cells or other cells used in the cardiovascular, endothelial, and angiogenic assays is tested. Exemplary antibodies include polyclonal, monoclonal, humanized, bispecific, and heteroconjugate antibodies, the preparation of which will be described hereinbelow.

- Antibody binding studies may be carried out in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (CRC Press, Inc., 1987), pp. 147-158.

- Competitive binding assays rely on the ability of a labeled standard to compete with the test sample analyte for binding with a limited amount of antibody. The amount of target protein in the test sample is inversely proportional to the amount of standard that becomes bound to the antibodies. To facilitate determining the amount of standard that becomes bound, the antibodies preferably are insolubilized before or after the competition, so that the standard and analyte that are bound to the antibodies may conveniently be separated from the standard and analyte that remain unbound.

- Sandwich assays involve the use of two antibodies, each capable of binding to a different immunogenic portion, or epitope, of the protein to be detected. In a sandwich assay, the test sample analyte is bound by a first antibody that is immobilized on a solid support, and thereafter a second antibody binds to the analyte, thus forming an insoluble three-part complex. See, e.g., U.S. Pat. No. 4,376,110. The second antibody may itself be labeled with a detectable moiety (direct sandwich assays) or may be measured using an anti-immunoglobulin antibody that is labeled with a detectable moiety (indirect sandwich assay). For example, one type of sandwich assay is an ELISA

WO 00/73445

PCT/US00/13705

assay, in which case the detectable moiety is an enzyme.

For immunohistochemistry, the tissue sample may be fresh or frozen or may be embedded in paraffin and fixed with a preservative such as formalin, for example.

iv. Cell-Based Tumor Assays

5 Cell-based assays and animal models for cardiovascular, endothelial, and angiogenic disorders, such as tumors, can be used to verify the findings of a cardiovascular, endothelial, and angiogenic assay herein, and further to understand the relationship between the genes identified herein and the development and pathogenesis of undesirable cardiovascular, endothelial, and angiogenic cell growth. The role of gene products identified herein in the development and pathology of undesirable cardiovascular, endothelial, and angiogenic cell growth, e.g., tumor
10 cells, can be tested by using cells or cell lines that have been identified as being stimulated or inhibited by the PRO polypeptide herein. Such cells include, for example, those set forth in the Examples below.

In a different approach, cells of a cell type known to be involved in a particular cardiovascular, endothelial, and angiogenic disorder are transfected with the cDNAs herein, and the ability of these cDNAs to induce excessive growth or inhibit growth is analyzed. If the cardiovascular, endothelial, and angiogenic disorder is cancer, suitable tumor cells include, for example, stable tumor cell lines such as the B104-1-1 cell line (stable NIH-3T3 cell line
15 transfected with the *neu* protooncogene) and *ras*-transfected NIH-3T3 cells, which can be transfected with the desired gene and monitored for tumorigenic growth. Such transfected cell lines can then be used to test the ability of poly- or monoclonal antibodies or antibody compositions to inhibit tumorigenic cell growth by exerting cytostatic or cytotoxic activity on the growth of the transformed cells, or by mediating antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Cells transfected with the coding sequences of the genes identified herein can further be used to identify
20 drug candidates for the treatment of cardiovascular, endothelial, and angiogenic disorders such as cancer.

In addition, primary cultures derived from tumors in transgenic animals (as described above) can be used in the cell-based assays herein, although stable cell lines are preferred. Techniques to derive continuous cell lines from transgenic animals are well known in the art. See, e.g., Small *et al.*, Mol. Cell. Biol., 5: 642-648 (1985).

25 v. Gene Therapy

The PRO polypeptides herein and polypeptidyl agonists and antagonists may be employed in accordance with the present invention by expression of such polypeptides *in vivo*, which is often referred to as gene therapy.

There are two major approaches to getting the nucleic acid (optionally contained in a vector) into the patient's cells: *in vivo* and *ex vivo*. For *in vivo* delivery the nucleic acid is injected directly into the patient, usually at the sites
30 where the PRO polypeptide is required, i.e., the site of synthesis of the PRO polypeptide, if known, and the site (e.g., wound) where biological activity of the PRO polypeptide is needed. For *ex vivo* treatment, the patient's cells are removed, the nucleic acid is introduced into these isolated cells, and the modified cells are administered to the patient either directly or, for example, encapsulated within porous membranes that are implanted into the patient (see, e.g., U.S. Pat. Nos. 4,892,538 and 5,263,187). There are a variety of techniques available for introducing
35 nucleic acids into viable cells. The techniques vary depending upon whether the nucleic acid is transferred into cultured cells *in vitro*, or transferred *in vivo* in the cells of the intended host. Techniques suitable for the transfer

WO 00/73445

PCT/US00/13705

of nucleic acid into mammalian cells *in vitro* include the use of liposomes, electroporation, microinjection, transduction, cell fusion, DEAE-dextran, the calcium phosphate precipitation method, etc. Transduction involves the association of a replication-defective, recombinant viral (preferably retroviral) particle with a cellular receptor, followed by introduction of the nucleic acids contained by the particle into the cell. A commonly used vector for *ex vivo* delivery of the gene is a retrovirus.

The currently preferred *in vivo* nucleic acid transfer techniques include transfection with viral or non-viral vectors (such as adenovirus, lentivirus, Herpes simplex I virus, or adeno-associated virus (AAV)) and lipid-based systems (useful lipids for lipid-mediated transfer of the gene are, for example, DOTMA, DOPE, and DC-Chol; see, e.g., Tonkinson *et al.*, *Cancer Investigation*, 14(1): 54-65 (1996)). The most preferred vectors for use in gene therapy are viruses, most preferably adenoviruses, AAV, lentiviruses, or retroviruses. A viral vector such as a retroviral vector includes at least one transcriptional promoter/enhancer or locus-defining element(s), or other elements that control gene expression by other means such as alternate splicing, nuclear RNA export, or post-translational modification of messenger. In addition, a viral vector such as a retroviral vector includes a nucleic acid molecule that, when transcribed in the presence of a gene encoding the PRO polypeptide, is operably linked thereto and acts as a translation initiation sequence. Such vector constructs also include a packaging signal, long terminal repeats (LTRs) or portions thereof, and positive and negative strand primer binding sites appropriate to the virus used (if these are not already present in the viral vector). In addition, such vector typically includes a signal sequence for secretion of the PRO polypeptide from a host cell in which it is placed. Preferably the signal sequence for this purpose is a mammalian signal sequence, most preferably the native signal sequence for the PRO polypeptide. Optionally, the vector construct may also include a signal that directs polyadenylation, as well as one or more restriction sites and a translation termination sequence. By way of example, such vectors will typically include a 5' LTR, a tRNA binding site, a packaging signal, an origin of second-strand DNA synthesis, and a 3' LTR or a portion thereof. Other vectors can be used that are non-viral, such as cationic lipids, polylysine, and dendrimers.

In some situations, it is desirable to provide the nucleic acid source with an agent that targets the target cells, such as an antibody specific for a cell-surface membrane protein or the target cell, a ligand for a receptor on the target cell, etc. Where liposomes are employed, proteins that bind to a cell-surface membrane protein associated with endocytosis may be used for targeting and/or to facilitate uptake, e.g., capsid proteins or fragments thereof tropic for a particular cell type, antibodies for proteins that undergo internalization in cycling, and proteins that target intracellular localization and enhance intracellular half-life. The technique of receptor-mediated endocytosis is described, for example, by Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432 (1987); and Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 3410-3414 (1990). For a review of the currently known gene marking and gene therapy protocols, see, Anderson *et al.*, *Science*, 256: 808-813 (1992). See also WO 93/25673 and the references cited therein.

Suitable gene therapy and methods for making retroviral particles and structural proteins can be found in, e.g., U.S. Pat. No. 5,681,746.

vi. Use of Gene as a Diagnostic

This invention is also related to the use of the gene encoding the PRO polypeptide as a diagnostic. Detection

WO 00/73445

PCT/US00/13705

of a mutated form of the PRO polypeptide will allow a diagnosis of a cardiovascular, endothelial, and angiogenic disease or a susceptibility to a cardiovascular, endothelial, and angiogenic disease, such as a tumor, since mutations in the PRO polypeptide may cause tumors.

- Individuals carrying mutations in the genes encoding a human PRO polypeptide may be detected at the DNA level by a variety of techniques. Nucleic acids for diagnosis may be obtained from a patient's cells, such as from blood, urine, saliva, tissue biopsy, and autopsy material. The genomic DNA may be used directly for detection or may be amplified enzymatically by using PCR (Saiki *et al.*, *Nature*, 324: 163-166 (1986)) prior to analysis. RNA or cDNA may also be used for the same purpose. As an example, PCR primers complementary to the nucleic acid encoding the PRO polypeptide can be used to identify and analyze the PRO polypeptide mutations. For example, deletions and insertions can be detected by a change in size of the amplified product in comparison to the normal genotype. Point mutations can be identified by hybridizing amplified DNA to radiolabeled RNA encoding the PRO polypeptide, or alternatively, radiolabeled antisense DNA sequences encoding the PRO polypeptide. Perfectly matched sequences can be distinguished from mismatched duplexes by RNase A digestion or by differences in melting temperatures.
- Genetic testing based on DNA sequence differences may be achieved by detection of alteration in electrophoretic mobility of DNA fragments in gels with or without denaturing agents. Small sequence deletions and insertions can be visualized by high resolution gel electrophoresis. DNA fragments of different sequences may be distinguished on denaturing formamide gradient gels in which the mobilities of different DNA fragments are retarded in the gel at different positions according to their specific melting or partial melting temperatures. See, e.g., Myers *et al.*, *Science*, 230: 1242 (1985).

Sequence changes at specific locations may also be revealed by nuclease protection assays, such as RNase and S1 protection or the chemical cleavage method, for example, Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4397-4401 (1988).

- Thus, the detection of a specific DNA sequence may be achieved by methods such as hybridization, RNase protection, chemical cleavage, direct DNA sequencing, or the use of restriction enzymes, e.g., restriction fragment length polymorphisms (RFLP), and Southern blotting of genomic DNA.

vii. Use to Detect PRO Polypeptide Levels

In addition to more conventional gel-electrophoresis and DNA sequencing, mutations can also be detected by *in situ* analysis.

- Expression of nucleic acid encoding the PRO polypeptide may be linked to vascular disease or neovascularization associated with tumor formation. If the PRO polypeptide has a signal sequence and the mRNA is highly expressed in endothelial cells and to a lesser extent in smooth muscle cells, this indicates that the PRO polypeptide is present in serum. Accordingly, an anti-PRO polypeptide antibody could be used to diagnose vascular disease or neovascularization associated with tumor formation, since an altered level of this PRO polypeptide may be indicative of such disorders.

A competition assay may be employed wherein antibodies specific to the PRO polypeptide are attached to a solid support and the labeled PRO polypeptide and a sample derived from the host are passed over the solid support

WO 00/73445

PCT/US00/13705

and the amount of label detected attached to the solid support can be correlated to a quantity of the PRO polypeptide in the sample.

viii. Chromosome Mapping

5 The sequences of the present invention are also valuable for chromosome identification. The sequence is specifically targeted to and can hybridize with a particular location on an individual human chromosome. Moreover, there is a current need for identifying particular sites on the chromosome. Few chromosome marking reagents based on actual sequence data (repeat polymorphisms) are presently available for marking chromosomal location. The mapping of DNAs to chromosomes according to the present invention is an important first step in correlating those sequences with genes associated with disease.

10 Briefly, sequences can be mapped to chromosomes by preparing PCR primers (preferably 15-25 bp) from the cDNA. Computer analysis for the 3'-untranslated region is used to rapidly select primers that do not span more than one exon in the genomic DNA, thus complicating the amplification process. These primers are then used for PCR screening of somatic cell hybrids containing individual human chromosomes. Only those hybrids containing the human gene corresponding to the primer will yield an amplified fragment.

15 PCR mapping of somatic cell hybrids is a rapid procedure for assigning a particular DNA to a particular chromosome. Using the present invention with the same oligonucleotide primers, sublocalization can be achieved with panels of fragments from specific chromosomes or pools of large genomic clones in an analogous manner. Other mapping strategies that can similarly be used to map to its chromosome include *in situ* hybridization, prescreening with labeled flow-sorted chromosomes, and preselection by hybridization to construct chromosome-specific cDNA libraries.

20 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of a cDNA clone to a metaphase chromosomal spread can be used to provide a precise chromosomal location in one step. This technique can be used with cDNA as short as 500 or 600 bases; however, clones larger than 2,000 bp have a higher likelihood of binding to a unique chromosomal location with sufficient signal intensity for simple detection. FISH requires use of the clones from which the gene encoding the PRO polypeptide was derived, and the longer the better. For example, 2,000 bp is good, 4,000 bp is better, and more than 4,000 is probably not necessary to get good results a reasonable percentage of the time. For a review of this technique, see, Verna *et al.*, Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques (Pergamon Press, New York, 1988).

30 Once a sequence has been mapped to a precise chromosomal location, the physical position of the sequence on the chromosome can be correlated with genetic map data. Such data are found, for example, in V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (available online through Johns Hopkins University Welch Medical Library). The relationship between genes and diseases that have been mapped to the same chromosomal region is then identified through linkage analysis (coinheritance of physically adjacent genes).

35 Next, it is necessary to determine the differences in the cDNA or genomic sequence between affected and unaffected individuals. If a mutation is observed in some or all of the affected individuals but not in any normal individuals, then the mutation is likely to be the causative agent of the disease.

With current resolution of physical mapping and genetic mapping techniques, a cDNA precisely localized to

WO 00/73445

PCT/US00/13705

a chromosomal region associated with the disease could be one of between 50 and 500 potential causative genes. (This assumes 1 megabase mapping resolution and one gene per 20 kb).

ix. Screening Assays for Drug Candidates

This invention encompasses methods of screening compounds to identify those that mimic the PRO polypeptide (agonists) or prevent the effect of the PRO polypeptide (antagonists). Screening assays for antagonist drug candidates are designed to identify compounds that bind or complex with the PRO polypeptide encoded by the genes identified herein, or otherwise interfere with the interaction of the encoded polypeptides with other cellular proteins. Such screening assays will include assays amenable to high-throughput screening of chemical libraries, making them particularly suitable for identifying small molecule drug candidates.

The assays can be performed in a variety of formats, including protein-protein binding assays, biochemical screening assays, immunoassays, and cell-based assays, which are well characterized in the art.

All assays for antagonists are common in that they call for contacting the drug candidate with a PRO polypeptide encoded by a nucleic acid identified herein under conditions and for a time sufficient to allow these two components to interact.

In binding assays, the interaction is binding and the complex formed can be isolated or detected in the reaction mixture. In a particular embodiment, the PRO polypeptide encoded by the gene identified herein or the drug candidate is immobilized on a solid phase, e.g., on a microtiter plate, by covalent or non-covalent attachments. Non-covalent attachment generally is accomplished by coating the solid surface with a solution of the PRO polypeptide and drying. Alternatively, an immobilized antibody, e.g., a monoclonal antibody, specific for the PRO polypeptide to be immobilized can be used to anchor it to a solid surface. The assay is performed by adding the non-immobilized component, which may be labeled by a detectable label, to the immobilized component, e.g., the coated surface containing the anchored component. When the reaction is complete, the non-reacted components are removed, e.g., by washing, and complexes anchored on the solid surface are detected. When the originally non-immobilized component carries a detectable label, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexing occurred. Where the originally non-immobilized component does not carry a label, complexing can be detected, for example, by using a labeled antibody specifically binding the immobilized complex.

If the candidate compound interacts with but does not bind to a particular PRO polypeptide encoded by a gene identified herein, its interaction with that polypeptide can be assayed by methods well known for detecting protein-protein interactions. Such assays include traditional approaches, such as, e.g., cross-linking, co-immunoprecipitation, and co-purification through gradients or chromatographic columns. In addition, protein-protein interactions can be monitored by using a yeast-based genetic system described by Fields and co-workers (Fields and Song, *Nature (London)*, 340: 245-246 (1989); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9578-9582 (1991)) as disclosed by Chevray and Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Many transcriptional activators, such as yeast GAL4, consist of two physically discrete modular domains, one acting as the DNA-binding domain, the other one functioning as the transcription-activation domain. The yeast expression system described in the foregoing publications (generally referred to as the "two-hybrid system") takes advantage of this property, and employs two hybrid proteins, one in which the target protein is fused to the DNA-binding

WO 00/73445

PCT/US00/13705

domain of GAL4, and another, in which candidate activating proteins are fused to the activation domain. The expression of a GAL1-lacZ reporter gene under control of a GAL4 activated promoter depends on reconstitution of GAL4 activity via protein-protein interaction. Colonies containing interacting polypeptides are detected with a chromogenic substrate for β -galactosidase. A complete kit (MATCHMAKER™) for identifying protein-protein interactions between two specific proteins using the two-hybrid technique is commercially available from Clontech. This system can also be extended to map protein domains involved in specific protein interactions as well as to pinpoint amino acid residues that are crucial for these interactions.

Compounds that interfere with the interaction of a gene encoding a PRO polypeptide identified herein and other intra- or extracellular components can be tested as follows: usually a reaction mixture is prepared containing the product of the gene and the intra- or extracellular component under conditions and for a time allowing for the interaction and binding of the two products. To test the ability of a candidate compound to inhibit binding, the reaction is run in the absence and in the presence of the test compound. In addition, a placebo may be added to a third reaction mixture, to serve as positive control. The binding (complex formation) between the test compound and the intra- or extracellular component present in the mixture is monitored as described hereinabove. The formation of a complex in the control reaction(s) but not in the reaction mixture containing the test compound indicates that the test compound interferes with the interaction of the test compound and its reaction partner.

If the PRO polypeptide has the ability to stimulate the proliferation of endothelial cells in the presence of the co-mitogen ConA, then one example of a screening method takes advantage of this ability. Specifically, in the proliferation assay, human umbilical vein endothelial cells are obtained and cultured in 96-well flat-bottomed culture plates (Costar, Cambridge, MA) and supplemented with a reaction mixture appropriate for facilitating proliferation of the cells, the mixture containing Con-A (Calbiochem, La Jolla, CA). Con-A and the compound to be screened are added and after incubation at 37°C, cultures are pulsed with ^3H -thymidine and harvested onto glass fiber filters (pH; Cambridge Technology, Watertown, MA). Mean ^3H -thymidine incorporation (cpm) of triplicate cultures is determined using a liquid scintillation counter (Beckman Instruments, Irvine, CA). Significant ^3H -thymidine incorporation indicates stimulation of endothelial cell proliferation.

To assay for antagonists, the assay described above is performed; however, in this assay the PRO polypeptide is added along with the compound to be screened and the ability of the compound to inhibit ^3H -thymidine incorporation in the presence of the PRO polypeptide indicates that the compound is an antagonist to the PRO polypeptide. Alternatively, antagonists may be detected by combining the PRO polypeptide and a potential antagonist with membrane-bound PRO polypeptide receptors or recombinant receptors under appropriate conditions for a competitive inhibition assay. The PRO polypeptide can be labeled, such as by radioactivity, such that the number of PRO polypeptide molecules bound to the receptor can be used to determine the effectiveness of the potential antagonist. The gene encoding the receptor can be identified by numerous methods known to those of skill in the art, for example, ligand panning and FACS sorting. Coligan *et al.*, Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991). Preferably, expression cloning is employed wherein polyadenylated RNA is prepared from a cell responsive to the PRO polypeptide and a cDNA library created from this RNA is divided into pools and used to transfect COS cells or other cells that are not responsive to the PRO polypeptide. Transfected cells that are grown on glass slides are exposed to the labeled PRO polypeptide. The PRO polypeptide can be labeled by a variety of

WO 00/73445

PCT/US00/3705

means including iodination or inclusion of a recognition site for a site-specific protein kinase. Following fixation and incubation, the slides are subjected to autoradiographic analysis. Positive pools are identified and sub-pools are prepared and re-transfected using an interactive sub-pooling and re-screening process, eventually yielding a single clone that encodes the putative receptor.

- 5 As an alternative approach for receptor identification, the labeled PRO polypeptide can be photoaffinity-linked with cell membrane or extract preparations that express the receptor molecule. Cross-linked material is resolved by PAGE and exposed to X-ray film. The labeled complex containing the receptor can be excised, resolved into peptide fragments, and subjected to protein micro-sequencing. The amino acid sequence obtained from micro-sequencing would be used to design a set of degenerate oligonucleotide probes to screen a cDNA library to identify
- 10 the gene encoding the putative receptor.

In another assay for antagonists, mammalian cells or a membrane preparation expressing the receptor would be incubated with the labeled PRO polypeptide in the presence of the candidate compound. The ability of the compound to enhance or block this interaction could then be measured.

- The compositions useful in the treatment of cardiovascular, endothelial, and angiogenic disorders include, without limitation, antibodies, small organic and inorganic molecules, peptides, phosphopeptides, antisense and
- 15 ribozyme molecules, triple-helix molecules, etc., that inhibit the expression and/or activity of the target gene product.

- More specific examples of potential antagonists include an oligonucleotide that binds to the fusions of immunoglobulin with a PRO polypeptide, and, in particular, antibodies including, without limitation, poly- and monoclonal antibodies and antibody fragments, single-chain antibodies, anti-idiotypic antibodies, and chimeric or
- 20 humanized versions of such antibodies or fragments, as well as human antibodies and antibody fragments. Alternatively, a potential antagonist may be a closely related protein, for example, a mutated form of the PRO polypeptide that recognizes the receptor but imparts no effect, thereby competitively inhibiting the action of the PRO polypeptide.

- Another potential PRO polypeptide antagonist or agonist is an antisense RNA or DNA construct prepared using antisense technology, where, e.g., an antisense RNA or DNA molecule acts to block directly the translation of mRNA by hybridizing to targeted mRNA and preventing protein translation. Antisense technology can be used to control gene expression through triple-helix formation or antisense DNA or RNA, both of which methods are based on binding of a polynucleotide to DNA or RNA. For example, the 5' coding portion of the polynucleotide
- 30 sequence, which encodes the mature PRO polypeptides herein, is used to design an antisense RNA oligonucleotide of from about 10 to 40 base pairs in length. A DNA oligonucleotide is designed to be complementary to a region of the gene involved in transcription (triple helix - see, Lee *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, *Science*, 241: 456 (1988); Dervan *et al.*, *Science*, 251:1369 (1991)), thereby preventing transcription and the production of the PRO polypeptide. The antisense RNA oligonucleotide hybridizes to the mRNA *in vivo* and blocks translation of the mRNA molecule into the PRO polypeptide (antisense - Okano, *Neurochem.*, 56:560 (1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression* (CRC Press: Boca Raton, FL, 1983). The oligonucleotides described above can also be delivered to cells such that the antisense RNA or DNA may be expressed *in vivo* to inhibit production of the PRO polypeptide. When antisense DNA is used,
- 35

WO 00/73445

PCT/US00/13705

oligonucleotides derived from the translation-initiation site, e.g., between about -10 and +10 positions of the target gene nucleotide sequence, are preferred.

Antisense RNA or DNA molecules are generally at least about 5 bases in length, about 10 bases in length, about 15 bases in length, about 20 bases in length, about 25 bases in length, about 30 bases in length, about 35 bases in length, about 40 bases in length, about 45 bases in length, about 50 bases in length, about 55 bases in length, about 60 bases in length, about 65 bases in length, about 70 bases in length, about 75 bases in length, about 80 bases in length, about 85 bases in length, about 90 bases in length, about 95 bases in length, about 100 bases in length, or more.

Potential antagonists include small molecules that bind to the active site, the receptor binding site, or growth factor or other relevant binding site of the PRO polypeptide, thereby blocking the normal biological activity of the PRO polypeptide. Examples of small molecules include, but are not limited to, small peptides or peptide-like molecules, preferably soluble peptides, and synthetic non-peptidyl organic or inorganic compounds.

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. Ribozymes act by sequence-specific hybridization to the complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Specific ribozyme cleavage sites within a potential RNA target can be identified by known techniques. For further details see, e.g., Ross, *Current Biology*, 4: 469-471 (1994), and PCT publication No. WO 97/33551 (published September 18, 1997).

Nucleic acid molecules in triple-helix formation used to inhibit transcription should be single-stranded and composed of deoxynucleotides. The base composition of these oligonucleotides is designed such that it promotes triple-helix formation via Hoogsteen base-pairing rules, which generally require sizeable stretches of purines or pyrimidines on one strand of a duplex. For further details see, e.g., PCT publication No. WO 97/33551, *supra*.

These small molecules can be identified by any one or more of the screening assays discussed hereinabove and/or by any other screening techniques well known for those skilled in the art.

x. Types of Cardiovascular, Endothelial, and Angiogenic Disorders to be Treated

The PRO polypeptides, or agonists or antagonists thereto, that have activity in the cardiovascular, angiogenic, and endothelial assays described herein, and/or whose gene product has been found to be localized to the cardiovascular system, are likely to have therapeutic uses in a variety of cardiovascular, endothelial, and angiogenic disorders, including systemic disorders that affect vessels, such as diabetes mellitus. Their therapeutic utility could include diseases of the arteries, capillaries, veins, and/or lymphatics. Examples of treatments hereunder include treating muscle wasting disease, treating osteoporosis, aiding in implant fixation to stimulate the growth of cells around the implant and therefore facilitate its attachment to its intended site, increasing IGF stability in tissues or in serum, if applicable, and increasing binding to the IGF receptor (since IGF has been shown *in vitro* to enhance human marrow erythroid and granulocytic progenitor cell growth).

The PRO polypeptides or agonists or antagonists thereto may also be employed to stimulate erythropoiesis or granulopoiesis, to stimulate wound healing or tissue regeneration and associated therapies concerned with re-growth of tissue, such as connective tissue, skin, bone, cartilage, muscle, lung, or kidney, to promote angiogenesis, to stimulate or inhibit migration of endothelial cells, and to proliferate the growth of vascular smooth muscle and

WO 00/73445

PCT/US00/13705

endothelial cell production. The increase in angiogenesis mediated by the PRO polypeptide or antagonist would be beneficial to ischemic tissues and to collateral coronary development in the heart subsequent to coronary stenosis. Antagonists are used to inhibit the action of such polypeptides, for example, to limit the production of excess connective tissue during wound healing or pulmonary fibrosis if the PRO polypeptide promotes such production.

5 This would include treatment of acute myocardial infarction and heart failure.

Moreover, the present invention concerns the treatment of cardiac hypertrophy, regardless of the underlying cause, by administering a therapeutically effective dose of the PRO polypeptide, or agonist or antagonist thereof. If the objective is the treatment of human patients, the PRO polypeptide preferably is recombinant human PRO polypeptide (rhPRO polypeptide). The treatment for cardiac hypertrophy can be performed at any of its various stages, which may result from a variety of diverse pathologic conditions, including myocardial infarction, hypertension, hypertrophic cardiomyopathy, and valvular regurgitation. The treatment extends to all stages of the progression of cardiac hypertrophy, with or without structural damage of the heart muscle, regardless of the underlying cardiac disorder.

The decision of whether to use the molecule itself or an agonist thereof for any particular indication, as opposed to an antagonist to the molecule, would depend mainly on whether the molecule herein promotes cardiovascularization, genesis of endothelial cells, or angiogenesis or inhibits these conditions. For example, if the molecule promotes angiogenesis, an antagonist thereof would be useful for treatment of disorders where it is desired to limit or prevent angiogenesis. Examples of such disorders include vascular tumors such as haemangioma, tumor angiogenesis, neovascularization in the retina, choroid, or cornea, associated with diabetic retinopathy or premature infant retinopathy or macular degeneration and proliferative vitreoretinopathy, rheumatoid arthritis, Crohn's disease, atherosclerosis, ovarian hyperstimulation, psoriasis, endometriosis associated with neovascularization, restenosis subsequent to balloon angioplasty, scar tissue overproduction, for example, that seen in a keloid that forms after surgery, fibrosis after myocardial infarction, or fibrotic lesions associated with pulmonary fibrosis.

If, however, the molecule inhibits angiogenesis, it would be expected to be used directly for treatment of the above conditions.

On the other hand, if the molecule stimulates angiogenesis it would be used itself (or an agonist thereof) for indications where angiogenesis is desired such as peripheral vascular disease, hypertension, inflammatory vasculitides, Reynaud's disease and Reynaud's phenomenon, aneurysms, arterial restenosis, thrombophlebitis, lymphangitis, lymphedema, wound healing and tissue repair, ischemia reperfusion injury, angina, myocardial infarctions such as acute myocardial infarctions, chronic heart conditions, heart failure such as congestive heart failure, and osteoporosis.

If, however, the molecule inhibits angiogenesis, an antagonist thereof would be used for treatment of those conditions where angiogenesis is desired.

Specific types of diseases are described below, where the PRO polypeptide herein or antagonists thereof may serve as useful for vascular-related drug targeting or as therapeutic targets for the treatment or prevention of the disorders. Atherosclerosis is a disease characterized by accumulation of plaques of intimal thickening in arteries, due to accumulation of lipids, proliferation of smooth muscle cells, and formation of fibrous tissue within the arterial wall. The disease can affect large, medium, and small arteries in any organ. Changes in endothelial and

WO 00/73445

PCT/US00/13765

vascular smooth muscle cell function are known to play an important role in modulating the accumulation and regression of these plaques.

Hypertension is characterized by raised vascular pressure in the systemic arterial, pulmonary arterial, or portal venous systems. Elevated pressure may result from or result in impaired endothelial function and/or vascular disease.

Inflammatory vasculitides include giant cell arteritis, Takayasu's arteritis, polyarteritis nodosa (including the microangiopathic form), Kawasaki's disease, microscopic polyangiitis, Wegener's granulomatosis, and a variety of infectious-related vascular disorders (including Henoch-Schönlein purpura). Altered endothelial cell function has been shown to be important in these diseases.

Reynaud's disease and Reynaud's phenomenon are characterized by intermittent abnormal impairment of the circulation through the extremities on exposure to cold. Altered endothelial cell function has been shown to be important in this disease.

Aneurysms are sacular or fusiform dilations of the arterial or venous tree that are associated with altered endothelial cell and/or vascular smooth muscle cells.

Arterial restenosis (restenosis of the arterial wall) may occur following angioplasty as a result of alteration in the function and proliferation of endothelial and vascular smooth muscle cells.

Thrombophlebitis and lymphangitis are inflammatory disorders of veins and lymphatics, respectively, that may result from, and/or in, altered endothelial cell function. Similarly, lymphedema is a condition involving impaired lymphatic vessels resulting from endothelial cell function.

The family of benign and malignant vascular tumors are characterized by abnormal proliferation and growth of cellular elements of the vascular system. For example, lymphangiomas are benign tumors of the lymphatic system that are congenital, often cystic, malformations of the lymphatics that usually occur in newborns. Cystic tumors tend to grow into the adjacent tissue. Cystic tumors usually occur in the cervical and axillary region. They can also occur in the soft tissue of the extremities. The main symptoms are dilated, sometimes reticular, structured lymphatics and lymphocysts surrounded by connective tissue. Lymphangiomas are assumed to be caused by improperly connected embryonic lymphatics or their deficiency. The result is impaired local lymph drainage. Griener *et al.*, *Lymphology*, 4: 140-144 (1971).

Another use for the PRO polypeptides herein or antagonists thereto is in the prevention of tumor angiogenesis, which involves vascularization of a tumor to enable it to grow and/or metastasize. This process is dependent on the growth of new blood vessels. Examples of neoplasms and related conditions that involve tumor angiogenesis include breast carcinomas, lung carcinomas, gastric carcinomas, esophageal carcinomas, colorectal carcinomas, liver carcinomas, ovarian carcinomas, thecomas, arrihenoblastomas, cervical carcinomas, endometrial carcinoma, endometrial hyperplasia, endometriosis, fibrosarcomas, choriocarcinoma, head and neck cancer, nasopharyngeal carcinoma, laryngeal carcinomas, hepatoblastoma, Kaposi's sarcoma, melanoma, skin carcinomas, hemangioma, cavernous hemangioma, hemangioblastoma, pancreatic carcinomas, retinoblastoma, astrocytoma, glioblastoma, Schwannoma, oligodendroglioma, medulloblastoma, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, osteogenic sarcoma, leiomyosarcomas, urinary tract carcinomas, thyroid carcinomas, Wilms' tumor, renal cell carcinoma, prostate carcinoma, abnormal vascular proliferation associated with phakomatosis, edema (such as that associated with brain

WO 00/73445

PCT/US00/13705

tumors), and Meigs' syndrome.

Age-related macular degeneration (AMD) is a leading cause of severe visual loss in the elderly population. The exudative form of AMD is characterized by choroidal neovascularization and retinal pigment epithelial cell detachment. Because choroidal neovascularization is associated with a dramatic worsening in prognosis, the PRO polypeptide or antagonist thereto is expected to be useful in reducing the severity of AMD.

Healing of trauma such as wound healing and tissue repair is also a targeted use for the PRO polypeptides herein or their antagonists. Formation and regression of new blood vessels is essential for tissue healing and repair. This category includes bone, cartilage, tendon, ligament, and/or nerve tissue growth or regeneration, as well as wound healing and tissue repair and replacement, and in the treatment of burns, incisions, and ulcers. A PRO polypeptide or antagonist thereof that induces cartilage and/or bone growth in circumstances where bone is not normally formed has application in the healing of bone fractures and cartilage damage or defects in humans and other animals. Such a preparation employing a PRO polypeptide or antagonist thereof may have prophylactic use in closed as well as open fracture reduction and also in the improved fixation of artificial joints. *De novo* bone formation induced by an osteogenic agent contributes to the repair of congenital, trauma-induced, or oncologic, resection-induced craniofacial defects, and also is useful in cosmetic plastic surgery.

PRO polypeptides or antagonists thereto may also be useful to promote better or faster closure of non-healing wounds, including without limitation pressure ulcers, ulcers associated with vascular insufficiency, surgical and traumatic wounds, and the like.

It is expected that a PRO polypeptide or antagonist thereto may also exhibit activity for generation or regeneration of other tissues, such as organs (including, for example, pancreas, liver, intestine, kidney, skin, or endothelium), muscle (smooth, skeletal, or cardiac), and vascular (including vascular endothelium) tissue, or for promoting the growth of cells comprising such tissues. Part of the desired effects may be by inhibition or modulation of fibrotic scarring to allow normal tissue to regenerate.

A PRO polypeptide herein or antagonist thereto may also be useful for gut protection or regeneration and treatment of lung or liver fibrosis, reperfusion injury in various tissues, and conditions resulting from systemic cytokine damage. Also, the PRO polypeptide or antagonist thereto may be useful for promoting or inhibiting differentiation of tissues described above from precursor tissues or cells, or for inhibiting the growth of tissues described above.

A PRO polypeptide or antagonist thereto may also be used in the treatment of periodontal diseases and in other tooth-repair processes. Such agents may provide an environment to attract bone-forming cells, stimulate growth of bone-forming cells, or induce differentiation of progenitors of bone-forming cells. A PRO polypeptide herein or an antagonist thereto may also be useful in the treatment of osteoporosis or osteoarthritis, such as through stimulation of bone and/or cartilage repair or by blocking inflammation or processes of tissue destruction (collagenase activity, osteoclast activity, etc.) mediated by inflammatory processes, since blood vessels play an important role in the regulation of bone turnover and growth.

Another category of tissue regeneration activity that may be attributable to the PRO polypeptide herein or antagonist thereto is tendon/ligament formation. A protein that induces tendon/ligament-like tissue or other tissue formation in circumstances where such tissue is not normally formed has application in the healing of tendon or

WO 00/73445

PCT/US00/13705

ligament tears, deformities, and other tendon or ligament defects in humans and other animals. Such a preparation may have prophylactic use in preventing damage to tendon or ligament tissue, as well as use in the improved fixation of tendon or ligament to bone or other tissues, and in repairing defects to tendon or ligament tissue. *De novo* tendon/ligament-like tissue formation induced by a composition of the PRO polypeptide herein or antagonist thereto contributes to the repair of congenital, trauma-induced, or other tendon or ligament defects of other origin, and is also useful in cosmetic plastic surgery for attachment or repair of tendons or ligaments. The compositions herein may provide an environment to attract tendon- or ligament-forming cells, stimulate growth of tendon- or ligament-forming cells, induce differentiation of progenitors of tendon- or ligament-forming cells, or induce growth of tendon/ligament cells or progenitors *ex vivo* for return *in vivo* to effect tissue repair. The compositions herein may also be useful in the treatment of tendinitis, carpal tunnel syndrome, and other tendon or ligament defects. The compositions may also include an appropriate matrix and/or sequestering agent as a carrier as is well known in the art.

The PRO polypeptide or its antagonist may also be useful for proliferation of neural cells and for regeneration of nerve and brain tissue, *i.e.* for the treatment of central and peripheral nervous system disease and neuropathies, as well as mechanical and traumatic disorders, that involve degeneration, death, or trauma to neural cells or nerve tissue. More specifically, a PRO polypeptide or its antagonist may be used in the treatment of diseases of the peripheral nervous system, such as peripheral nerve injuries, peripheral neuropathy and localized neuropathies, and central nervous system diseases, such as Alzheimer's, Parkinson's disease, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and Shy-Drager syndrome. Further conditions that may be treated in accordance with the present invention include mechanical and traumatic disorders, such as spinal cord disorders, head trauma, and cerebrovascular diseases such as stroke. Peripheral neuropathies resulting from chemotherapy or other medical therapies may also be treatable using a PRO polypeptide herein or antagonist thereto.

Ischemia-reperfusion injury is another indication. Endothelial cell dysfunction may be important in both the initiation of, and in regulation of the sequelae of events that occur following ischemia-reperfusion injury.

Rheumatoid arthritis is a further indication. Blood vessel growth and targeting of inflammatory cells through the vasculature is an important component in the pathogenesis of rheumatoid and sero-negative forms of arthritis.

A PRO polypeptide or its antagonist may also be administered prophylactically to patients with cardiac hypertrophy, to prevent the progression of the condition, and avoid sudden death, including death of asymptomatic patients. Such preventative therapy is particularly warranted in the case of patients diagnosed with massive left ventricular cardiac hypertrophy (a maximal wall thickness of 35 mm or more in adults, or a comparable value in children), or in instances when the hemodynamic burden on the heart is particularly strong.

A PRO polypeptide or its antagonist may also be useful in the management of atrial fibrillation, which develops in a substantial portion of patients diagnosed with hypertrophic cardiomyopathy.

Further indications include angina, myocardial infarctions such as acute myocardial infarctions, and heart failure such as congestive heart failure. Additional non-neoplastic conditions include psoriasis, diabetic and other proliferative retinopathies including retinopathy of prematurity, retrolental fibroplasia, neovascular glaucoma, thyroid hyperplasias (including Grave's disease), corneal and other tissue transplantation, chronic inflammation, lung inflammation, nephrotic syndrome, preeclampsia, ascites, pericardial effusion (such as that associated with

WO 00/73445

PCT/US00/13705

pericarditis), and pleural effusion.

In view of the above, the PRO polypeptides or agonists or antagonists thereof described herein, which are shown to alter or impact endothelial cell function, proliferation, and/or form, are likely to play an important role in the etiology and pathogenesis of many or all of the disorders noted above, and as such can serve as therapeutic targets to augment or inhibit these processes or for vascular-related drug targeting in these disorders.

xi. Administration Protocols, Schedules, Doses, and Formulations

The molecules herein and agonists and antagonists thereto are pharmaceutically useful as a prophylactic and therapeutic agent for various disorders and diseases as set forth above.

Therapeutic compositions of the PRO polypeptides or agonists or antagonists are prepared for storage by mixing the desired molecule having the appropriate degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. (1980)), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyltrimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol, resorcinol, cyclohexanol, 3-pentanol; and *m*-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g., Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEENTM, PLURONICSTM or polyethylene glycol (PEG).

Additional examples of such carriers include ion exchangers, alumina, aluminum stearate, lecithin, serum proteins, such as human serum albumin, buffer substances such as phosphates, glycine, sorbic acid, potassium sorbate, partial glyceride mixtures of saturated vegetable fatty acids, water, salts, or electrolytes such as protamine sulfate, disodium hydrogen phosphate, potassium hydrogen phosphate, sodium chloride, zinc salts, colloidal silica, magnesium trisilicate, polyvinyl pyrrolidone, cellulose-based substances, and polyethylene glycol. Carriers for topical or gel-based forms of antagonist include polysaccharides such as sodium carboxymethylcellulose or methylcellulose, polyvinylpyrrolidone, polyacrylates, polyoxyethylene-polyoxypropylene-block polymers, polyethylene glycol, and wood wax alcohols. For all administrations, conventional depot forms are suitably used. Such forms include, for example, microcapsules, nano-capsules, liposomes, plasters, inhalation forms, nose sprays, sublingual tablets, and sustained-release preparations. The PRO polypeptides or agonists or antagonists will typically be formulated in such vehicles at a concentration of about 0.1 mg/ml to 100 mg/ml.

Another formulation comprises incorporating a PRO polypeptide or antagonist thereof into formed articles. Such articles can be used in modulating endothelial cell growth and angiogenesis. In addition, tumor invasion and metastasis may be modulated with these articles.

PRO polypeptides or antagonists to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily

WO 00/73445

PCT/US00/13705

accomplished by filtration through sterile filtration membranes, prior to or following lyophilization and reconstitution. PRO polypeptides ordinarily will be stored in lyophilized form or in solution if administered systemically. If in lyophilized form, the PRO polypeptide or antagonist thereto is typically formulated in combination with other ingredients for reconstitution with an appropriate diluent at the time for use. An example of a liquid formulation of a PRO polypeptide or antagonist is a sterile, clear, colorless unpreserved solution filled in a single-dose vial for subcutaneous injection. Preserved pharmaceutical compositions suitable for repeated use may contain, for example, depending mainly on the indication and type of polypeptide:

- a) PRO polypeptide or agonist or antagonist thereto;
- b) a buffer capable of maintaining the pH in a range of maximum stability of the polypeptide or other molecule in solution, preferably about 4-8;
- c) a detergent/surfactant primarily to stabilize the polypeptide or molecule against agitation-induced aggregation;
- d) an isotonicifier;
- e) a preservative selected from the group of phenol, benzyl alcohol and a benzethonium halide, e.g., chloride;
- f) water.

If the detergent employed is non-ionic, it may, for example, be polysorbates (e.g., POLYSORBATE™ (TWEEN™) 20, 80, etc.) or polyoxamers (e.g., POLYOXAMER™ 188). The use of non-ionic surfactants permits the formulation to be exposed to shear surface stresses without causing denaturation of the polypeptide. Further, such surfactant-containing formulations may be employed in aerosol devices such as those used in a pulmonary dosing, and needleless jet injector guns (see, e.g., EP 257,956).

An isotonicifier may be present to ensure isotonicity of a liquid composition of the PRO polypeptide or antagonist thereto, and includes polyhydric sugar alcohols, preferably trihydric or higher sugar alcohols, such as glycerin, erythritol, arabitol, xylitol, sorbitol, and mannitol. These sugar alcohols can be used alone or in combination. Alternatively, sodium chloride or other appropriate inorganic salts may be used to render the solutions isotonic.

The buffer may, for example, be an acetate, citrate, succinate, or phosphate buffer depending on the pH desired. The pH of one type of liquid formulation of this invention is buffered in the range of about 4 to 8, preferably about physiological pH.

The preservatives phenol, benzyl alcohol and benzethonium halides, e.g., chloride, are known antimicrobial agents that may be employed.

Therapeutic PRO polypeptide compositions generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle. The formulations are preferably administered as repeated intravenous (i.v.), subcutaneous (s.c.), or intramuscular (i.m.) injections, or as aerosol formulations suitable for intranasal or intrapulmonary delivery (for intrapulmonary delivery see, e.g., EP 257,956).

PRO polypeptides can also be administered in the form of sustained-released preparations. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the

WO 00/73445

PCT/US00/13785

protein, which matrices are in the form of shaped articles, e.g., films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (e.g., poly(2-hydroxyethyl methacrylate) as described by Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **15**: 167-277 (1981) and Langer, *Chem. Tech.*, **12**: 98-105 (1982) or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Patent No. 3,773,919; EP 58,481), copolymers of L-glutamic acid and gamma-ethyl-L-glutamate (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, **22**: 547-556 (1983)), non-degradable ethylene-vinyl acetate (Langer *et al. supra*), degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the Lupron Depot™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid (EP 133,988).

While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. When encapsulated proteins remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37°C, resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies can be devised for protein stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying sulphydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

Sustained-release PRO polypeptide compositions also include liposomally entrapped PRO polypeptides. Liposomes containing the PRO polypeptide are prepared by methods known *per se*: DE 3,218,121; Hsstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; Japanese patent application 83 118008; U.S. Patent Nos. 4,485,045 and 4,544,545; and EP 102,324. Ordinarily the liposomes are of the small (about 200-800 Angstroms) unilamellar type in which the lipid content is greater than about 30 mol. % cholesterol, the selected proportion being adjusted for the optimal therapy.

The therapeutically effective dose of a PRO polypeptide or antagonist thereof will, of course, vary depending on such factors as the pathological condition to be treated (including prevention), the method of administration, the type of compound being used for treatment, any co-therapy involved, the patient's age, weight, general medical condition, medical history, etc., and its determination is well within the skill of a practicing physician. Accordingly, it will be necessary for the therapist to titer the dosage and modify the route of administration as required to obtain the maximal therapeutic effect. If the PRO polypeptide has a narrow host range, for the treatment of human patients formulations comprising human PRO polypeptide, more preferably native-sequence human PRO polypeptide, are preferred. The clinician will administer the PRO polypeptide until a dosage is reached that achieves the desired effect for treatment of the condition in question. For example, if the objective is the treatment of CHF, the amount would be one that inhibits the progressive cardiac hypertrophy associated with this condition. The progress of this therapy is easily monitored by echo cardiography. Similarly, in patients with hypertrophic cardiomyopathy, the PRO polypeptide can be administered on an empirical basis.

With the above guidelines, the effective dose generally is within the range of from about 0.001 to about 1.0 mg/kg, more preferably about 0.01-1.0 mg/kg, most preferably about 0.01-0.1 mg/kg.

For non-oral use in treating human adult hypertension, it is advantageous to administer the PRO polypeptide in the form of an injection at about 0.01 to 50 mg, preferably about 0.05 to 20 mg, most preferably 1 to 20 mg, per

WO 00/73445

PCT/US00/13705

kg body weight, 1 to 3 times daily by intravenous injection. For oral administration, a molecule based on the PRO polypeptide is preferably administered at about 5 mg to 1 g, preferably about 10 to 100 mg, per kg body weight, 1 to 3 times daily. It should be appreciated that endotoxin contamination should be kept minimally at a safe level, for example, less than 0.5 ng/mg protein. Moreover, for human administration, the formulations preferably meet

sterility, pyrogenicity, general safety, and purity as required by FDA Office and Biologics standards.

The dosage regimen of a pharmaceutical composition containing the PRO polypeptide to be used in tissue regeneration will be determined by the attending physician considering various factors that modify the action of the polypeptides, e.g., amount of tissue weight desired to be formed, the site of damage, the condition of the damaged tissue, the size of a wound, type of damaged tissue (e.g., bone), the patient's age, sex, and diet, the severity of any infection, time of administration, and other clinical factors. The dosage may vary with the type of matrix used in the reconstitution and with inclusion of other proteins in the pharmaceutical composition. For example, the addition of other known growth factors, such as IGF-I, to the final composition may also affect the dosage. Progress can be monitored by periodic assessment of tissue/bone growth and/or repair, for example, X rays, histomorphometric determinations, and tetracycline labeling.

The route of PRO polypeptide or antagonist or agonist administration is in accord with known methods, e.g., by injection or infusion by intravenous, intramuscular, intracerebral, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutaneous, introcular, intraarticular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation routes, or by sustained-release systems as noted below. The PRO polypeptide or antagonists thereof also are suitably administered by intratumoral, peritumoral, intralesional, or perilesional routes, to exert local as well as systemic therapeutic effects. The intraperitoneal route is expected to be particularly useful, for example, in the treatment of ovarian tumors.

If a peptide or small molecule is employed as an antagonist or agonist, it is preferably administered orally or non-orally in the form of a liquid or solid to mammals.

Examples of pharmacologically acceptable salts of molecules that form salts and are useful hereunder include alkali metal salts (e.g., sodium salt, potassium salt), alkaline earth metal salts (e.g., calcium salt, magnesium salt), ammonium salts, organic base salts (e.g., pyridine salt, triethylamine salt), inorganic acid salts (e.g., hydrochloride, sulfate, nitrate), and salts of organic acid (e.g., acetate, oxalate, p-toluenesulfonate).

For compositions herein that are useful for bone, cartilage, tendon, or ligament regeneration, the therapeutic method includes administering the composition topically, systemically, or locally as an implant or device. When administered, the therapeutic composition for use is in a pyrogen-free, physiologically acceptable form. Further, the composition may desirably be encapsulated or injected in a viscous form for delivery to the site of bone, cartilage, or tissue damage. Topical administration may be suitable for wound healing and tissue repair. Preferably, for bone and/or cartilage formation, the composition would include a matrix capable of delivering the protein-containing composition to the site of bone and/or cartilage damage, providing a structure for the developing bone and cartilage and preferably capable of being resorbed into the body. Such matrices may be formed of materials presently in use for other implanted medical applications.

The choice of matrix material is based on biocompatibility, biodegradability, mechanical properties, cosmetic appearance, and interface properties. The particular application of the compositions will define the appropriate

WO 00/73445

PCT/US00/13705

formulation. Potential matrices for the compositions may be biodegradable and chemically defined calcium sulfate, tricalcium phosphate, hydroxyapatite, polylactic acid, polyglycolic acid, and polyanhydrides. Other potential materials are biodegradable and biologically well-defined, such as bone or dermal collagen. Further matrices are comprised of pure proteins or extracellular matrix components. Other potential matrices are nonbiodegradable and chemically defined, such as sintered hydroxyapatite, bioglass, aluminates, or other ceramics. Matrices may be comprised of combinations of any of the above-mentioned types of material, such as polylactic acid and hydroxyapatite or collagen and tricalcium phosphate. The bioceramics may be altered in composition, such as in calcium-aluminate-phosphate and processing to alter pore size, particle size, particle shape, and biodegradability.

One specific embodiment is a 50:50 (mole weight) copolymer of lactic acid and glycolic acid in the form of porous particles having diameters ranging from 150 to 800 microns. In some applications, it will be useful to utilize a sequestering agent, such as carboxymethyl cellulose or autologous blood clot, to prevent the polypeptide compositions from disassociating from the matrix.

One suitable family of sequestering agents is cellulose materials such as alkylcelluloses (including hydroxyalkylcelluloses), including methylcellulose, ethylcellulose, hydroxyethylcellulose, hydroxypropylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, and carboxymethylcellulose, one preferred being cationic salts of carboxymethylcellulose (CMC). Other preferred sequestering agents include hyaluronic acid, sodium alginate, poly(ethylene glycol), polyoxyethylene oxide, carboxyvinyl polymer, and poly(vinyl alcohol). The amount of sequestering agent useful herein is 0.5-20 wt%, preferably 1-10 wt%, based on total formulation weight, which represents the amount necessary to prevent desorption of the polypeptide (or its antagonist) from the polymer matrix and to provide appropriate handling of the composition, yet not so much that the progenitor cells are prevented from infiltrating the matrix, thereby providing the polypeptide (or its antagonist) the opportunity to assist the osteogenic activity of the progenitor cells.

xii. Combination Therapies

The effectiveness of the PRO polypeptide or an agonist or antagonist thereof in preventing or treating the disorder in question may be improved by administering the active agent serially or in combination with another agent that is effective for those purposes, either in the same composition or as separate compositions.

For example, for treatment of cardiac hypertrophy, PRO polypeptide therapy can be combined with the administration of inhibitors of known cardiac myocyte hypertrophy factors, e.g., inhibitors of α -adrenergic agonists such as phenylephrine; endothelin-1 inhibitors such as BOSENTANTM and MOXONODINTM; inhibitors to CT-1 (U.S. Pat. No. 5,679,545); inhibitors to TGF- β ; ACE inhibitors; des-aspartate-angiotensin I inhibitors (U.S. Pat. No. 5,773,415); and angiotensin II inhibitors.

For treatment of cardiac hypertrophy associated with hypertension, the PRO polypeptide can be administered in combination with β -adrenergic receptor blocking agents, e.g., propranolol, timolol, terbutolol, carteolol, nadolol, betaxolol, penbutolol, acetobutolol, atenolol, metoprolol, or carvedilol; ACE inhibitors, e.g., quinapril, captopril, enalapril, ramipril, benazepril, fosinopril, or lisinopril; diuretics, e.g., chlorothiazide, hydrochlorothiazide, hydroflumethiazide, methylchlorothiazide, benzthiazide, dichlorophenamide, acetazolamide, or indapamide; and/or calcium channel blockers, e.g., diltiazem, nifedipine, verapamil, or nicardipine. Pharmaceutical compositions

WO 00/73445

PCT/US00/13705

comprising the therapeutic agents identified herein by their generic names are commercially available, and are to be administered following the manufacturers' instructions for dosage, administration, adverse effects, contraindications, etc. See, e.g., Physicians' Desk Reference (Medical Economics Data Production Co., Montvale, N.J., 1997), 51th Edition.

- 5 Preferred candidates for combination therapy in the treatment of hypertrophic cardiomyopathy are β -adrenergic-blocking drugs (e.g., propranolol, timolol, terbutolol, carteolol, nadolol, betaxolol, penbutolol, acetobutolol, atenolol, metoprolol, or carvedilol), verapamil, diltiazem, or diltiazem. Treatment of hypertrophy associated with high blood pressure may require the use of antihypertensive drug therapy, using calcium channel blockers, e.g., diltiazem, nifedipine, verapamil, or nicardipine; β -adrenergic blocking agents; diuretics, e.g.,
- 10 chlorthalidate, hydrochlorothiazide, hydroflumethiazide, methyldichlorothiazide, benzthiazide, dichlorophenamide, acetazolamide, or indapamide; and/or ACE-inhibitors, e.g., quinapril, captopril, enalapril, ramipril, benazepril, fosinopril, or lisinopril.

- For other indications, PRO polypeptides or their antagonists may be combined with other agents beneficial to the treatment of the bone and/or cartilage defect, wound, or tissue in question. These agents include various
- 15 growth factors such as EGF, PDGF, TGF- α or TGF- β , IGF, FGF, and CTGF.

- In addition, PRO polypeptides or their antagonists used to treat cancer may be combined with cytotoxic, chemotherapeutic, or growth-inhibitory agents as identified above. Also, for cancer treatment, the PRO polypeptide or antagonist thereof is suitably administered serially or in combination with radiological treatments, whether
- 20 involving irradiation or administration of radioactive substances.

- The effective amounts of the therapeutic agents administered in combination with the PRO polypeptide or antagonist thereof will be at the physician's or veterinarian's discretion. Dosage administration and adjustment is done to achieve maximal management of the conditions to be treated. For example, for treating hypertension, these amounts ideally take into account use of diuretics or digitalis, and conditions such as hyper- or hypotension, renal impairment, etc. The dose will additionally depend on such factors as the type of the therapeutic agent to be used
- 25 and the specific patient being treated. Typically, the amount employed will be the same dose as that used, if the given therapeutic agent is administered without the PRO polypeptide.

xiii. Articles of Manufacture

- An article of manufacture such as a kit containing the PRO polypeptide or agonists or antagonists thereof useful for the diagnosis or treatment of the disorders described above comprises at least a container and a label.
- 30 Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, and test tubes. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds a composition that is effective for diagnosing or treating the condition and may have a sterile access port (for example, the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). The active agent in the composition is the PRO polypeptide or an agonist or antagonist thereof. The label on, or associated with, the
- 35 container indicates that the composition is used for diagnosing or treating the condition of choice. The article of manufacture may further comprise a second container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as phosphate-buffered saline, Ringer's solution, and dextrose solution. It may further include other materials desirable

WO 00/73445

PCT/US00/13705

from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, syringes, and package inserts with instructions for use. The article of manufacture may also comprise a second or third container with another active agent as described above.

E. Antibodies

5 Some of the most promising drug candidates according to the present invention are antibodies and antibody fragments that may inhibit the production or the gene product of the genes identified herein and/or reduce the activity of the gene products.

i. Polyclonal Antibodies

10 Methods of preparing polyclonal antibodies are known to the skilled artisan. Polyclonal antibodies can be raised in a mammal, for example, by one or more injections of an immunizing agent and, if desired, an adjuvant. Typically, the immunizing agent and/or adjuvant will be injected in the mammal by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections. The immunizing agent may include the PRO polypeptide or a fusion protein thereof. It may be useful to conjugate the immunizing agent to a protein known to be immunogenic in the mammal being immunized. Examples of such immunogenic proteins include, but are not limited to, keyhole limpet hemocyanin, 15 serum albumin, bovine thyroglobulin, and soybean trypsin inhibitor. Examples of adjuvants that may be employed include Freund's complete adjuvant and MPL-TDM adjuvant (monophosphoryl Lipid A or synthetic trehalose dicorynomycolate). The immunization protocol may be selected by one skilled in the art without undue experimentation.

ii. Monoclonal Antibodies

20 The anti-PRO antibodies may, alternatively, be monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies may be prepared using hybridoma methods, such as those described by Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1973). In a hybridoma method, a mouse, hamster, or other appropriate host animal is typically immunized with an immunizing agent to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the immunizing agent. Alternatively, the lymphocytes may be immunized *in vitro*.

25 The immunizing agent will typically include the PRO polypeptide or a fusion protein thereof. Generally, either peripheral blood lymphocytes ("PBLs") are used if cells of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used if non-human mammalian sources are desired. The lymphocytes are then fused with an immortalized cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (New York: Academic Press, 1986), pp. 59-103. Immortalized cell lines are 30 usually transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine, and human origin. Usually, rat or mouse myeloma cell lines are employed. The hybridoma cells may be cultured in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, immortalized cells. For example, if the parental cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine 35 ("HAT medium"), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Preferred immortalized cell lines are those that fuse efficiently, support stable high-level expression of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive in a medium such as BAT medium. More preferred immortalized cell lines are murine myeloma lines, which can be obtained, for instance, from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies. Kozbor, *J. Immunol.*, **133**:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) pp. 51-63.

5 The culture medium in which the hybridoma cells are cultured can then be assayed for the presence of monoclonal antibodies directed against the PRO polypeptide. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Such techniques and assays are known in the art. The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the

10 Scatchard analysis of Munson and Pollard, Anal. Biochem., **107**:220 (1980). After the desired hybridoma cells are identified, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods. Goding, *supra*. Suitable culture media for this purpose include, for example, Dulbecco's Modified Eagle's Medium and RPMI 1640 medium. Alternatively, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites in a mammal.

15 The monoclonal antibodies secreted by the subclones may be isolated or purified from the culture medium or ascites fluid by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

20 The monoclonal antibodies may also be made by recombinant DNA methods, such as those described in U.S. Patent No. 4,816,567. DNA encoding the monoclonal antibodies of the invention can be readily isolated and sequenced using conventional procedures (*e.g.*, by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells of the

25 invention serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy- and light-chain constant domains in place of the homologous murine sequences (U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, *supra*) or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. Such a non-immunoglobulin polypeptide can be substituted for the constant domains of an antibody of the invention, or can be substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent antibody.

30 The antibodies may be monovalent antibodies. Methods for preparing monovalent antibodies are well known in the art. For example, one method involves recombinant expression of immunoglobulin light chain and modified heavy chain. The heavy chain is truncated generally at any point in the Fc region so as to prevent heavy-chain crosslinking. Alternatively, the relevant cysteine residues are substituted with another amino acid residue or are deleted so as to prevent crosslinking.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

In vitro methods are also suitable for preparing monovalent antibodies. Digestion of antibodies to produce fragments thereof, particularly Fab fragments, can be accomplished using routine techniques known in the art.

iii. Human and Humanized Antibodies

The anti-PRO antibodies may further comprise humanized antibodies or human antibodies. Humanized forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains, or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, or other antigen-binding subsequences of antibodies) that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. Humanized antibodies include human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a CDR of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, or rabbit having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, Fv framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Humanized antibodies may also comprise residues that are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin, and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody preferably also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. Jones *et al.*, Nature, **321**: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, **332**: 323-329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., **2**: 593-596 (1992).

Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source that is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers (Jones *et al.*, Nature, **321**: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, **332**: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, **239**: 1534-1536 (1988)), by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567), wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

Human antibodies can also be produced using various techniques known in the art, including phage display libraries. Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., **227**: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., **222**: 581 (1991). The techniques of Cole *et al.* and Boerner *et al.* are also available for the preparation of human monoclonal antibodies. Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) and Boerner *et al.*, J. Immunol., **147**(1): 86-95 (1991). Similarly, human antibodies can be made by introducing human immunoglobulin loci into transgenic animals, e.g., mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. Upon challenge, human antibody production is observed that closely resembles that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and antibody repertoire. This approach is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; and 5,661,016, and in the following scientific publications: Marks *et al.*, Bio/Technology, **10**: 779-783 (1992); Lonberg

WO 00/73445

PCT/US00/13705

et al., *Nature*, **368**: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, **368**: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology*, **14**: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, **14**: 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, **13**: 65-93 (1995).

iv. Bispecific Antibodies

5 Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present case, one of the binding specificities is for the PRO polypeptide, the other one is for any other antigen, and preferably for a cell-surface protein or receptor or receptor subunit.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of
10 bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chains have different specificities. Milstein and Cudde, *Nature*, **305**: 537-539 (1983). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule is usually accomplished by affinity chromatography steps. Similar procedures
15 are disclosed in WO 93/08829, published 13 May 1993, and in Trautnecker *et al.*, *EMBO J.*, **10**: 3655-3659 (1991).

Antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) can be fused to immunoglobulin constant-domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy-chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light-chain binding present in at least one of
20 the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy-chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. For further details of generating bispecific antibodies, see, for example, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, **121**: 210 (1986).

v. Heteroconjugate Antibodies

25 Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune-system cells to unwanted cells (U.S. Patent No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection. WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089. It is contemplated that the antibodies may be prepared *in vivo* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins may be constructed using a disulfide-exchange reaction or by forming a
30 thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminobiotin and methyl-4-mercaptopbutyrimidate and those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 4,676,980.

vi. Effector Function Engineering

It may be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, so as to enhance, e.g., the effectiveness of the antibody in treating cancer. For example, cysteine residue(s) may be introduced into
35 the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus

WO 00/73445

PCT/US00/13705

generated may have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See, Caron *et al.*, *J. Exp. Med.*, **176**: 1191-1195 (1992) and Shopes, *J. Immunol.*, **148**: 2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity may also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff *et al.*, *Cancer Research*, **53**: 2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered that has dual Fc regions and may thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. See, Stevenson *et al.*, *Anti Cancer Drug Design*, **3**: 219-230 (1989).

vii. Immunokonjugates

The invention also pertains to immunokonjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, toxin (e.g., an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (i.e., a radioconjugate).

Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunokonjugates have been described above. Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleuertes fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, saponaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{111}In , ^{90}Y , and ^{187}Re .

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridylthiol)propionate (SPDP), iminobiotinyl (IT), bifunctional derivatives of iminobiotins (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis-(p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniunbenzoyl) ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta *et al.*, *Science*, **238**: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triamino-pentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionuclide to the antibody. See, WO94/11026.

In another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such as streptavidin) for utilization in tumor pretargeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (e.g., avidin) that is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a radionuclide).

viii. Immunoliposomes

The antibodies disclosed herein may also be formulated as immunoliposomes. Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 7688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 4030 (1980); and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556.

Particularly useful liposomes can be generated by the reverse-phase evaporation method with a lipid

WO 00/73445

PCT/US00/13705

composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol, and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PF). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of the antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) via a disulfide-interchange reaction. A chemotherapeutic agent (such as Doxorubicin) is optionally contained within the liposome. See, Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.*, 81(19): 1484 (1989).

ix. Pharmaceutical Compositions of Antibodies

Antibodies specifically binding a PRO polypeptide identified herein, as well as other molecules identified by the screening assays disclosed hereinbefore, can be administered for the treatment of various disorders as noted above and below in the form of pharmaceutical compositions.

If the PRO polypeptide is intracellular and whole antibodies are used as inhibitors, internalizing antibodies are preferred. However, lipofections or liposomes can also be used to deliver the antibody, or an antibody fragment, into cells. Where antibody fragments are used, the smallest inhibitory fragment that specifically binds to the binding domain of the target protein is preferred. For example, based upon the variable-region sequences of an antibody, peptide molecules can be designed that retain the ability to bind the target protein sequence. Such peptides can be synthesized chemically and/or produced by recombinant DNA technology. See, e.g., Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993).

The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Alternatively, or in addition, the composition may comprise an agent that enhances its function, such as, for example, a cytotoxic agent, cytokine, chemotherapeutic agent, or growth-inhibitory agent. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxyethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles, and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington's *Pharmaceutical Sciences*, *supra*.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, e.g., films, or microcapsules. Examples of sustained release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and γ -ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOTTM (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(+)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels

WO 00/73445

PCT/U/S00/13705

release proteins for shorter time periods. When encapsulated antibodies remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37 °C, resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies can be devised for stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying sulphydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

x. Methods of Treatment using the Antibody

It is contemplated that the antibodies to a PRO polypeptide may be used to treat various cardiovascular, endothelial, and angiogenic conditions as noted above.

The antibodies are administered to a mammal, preferably a human, in accord with known methods, such as intravenous administration as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation routes. Intravenous administration of the antibody is preferred.

Other therapeutic regimens may be combined with the administration of the antibodies of the instant invention as noted above. For example, if the antibodies are to treat cancer, the patient to be treated with such antibodies may also receive radiation therapy. Alternatively, or in addition, a chemotherapeutic agent may be administered to the patient. Preparation and dosing schedules for such chemotherapeutic agents may be used according to manufacturers' instructions or as determined empirically by the skilled practitioner. Preparation and dosing schedules for such chemotherapy are also described in Chemotherapy Service, Ed. M.C. Perry (Williams & Wilkins: Baltimore, MD, 1992). The chemotherapeutic agent may precede, or follow administration of the antibody, or may be given simultaneously therewith. The antibody may be combined with an anti-estrogen compound such as tamoxifen or EVISTA™ or an anti-progesterone such as onapristone (see, EP 616812) in dosages known for such molecules.

If the antibodies are used for treating cancer, it may be desirable also to administer antibodies against other tumor-associated antigens, such as antibodies that bind to one or more of the ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, or VEGF receptor(s). These also include the agents set forth above. Also, the antibody is suitably administered serially or in combination with radiological treatments, whether involving irradiation or administration of radioactive substances. Alternatively, or in addition, two or more antibodies binding the same or two or more different antigens disclosed herein may be co-administered to the patient. Sometimes, it may be beneficial also to administer one or more cytokines to the patient. In a preferred embodiment, the antibodies herein are co-administered with a growth-inhibitory agent. For example, the growth-inhibitory agent may be administered first, followed by an antibody of the present invention. However, simultaneous administration or administration of the antibody of the present invention first is also contemplated. Suitable dosages for the growth-inhibitory agent are those presently used and may be lowered due to the combined action (synergy) of the growth-inhibitory agent and the antibody herein.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

In one embodiment, vascularization of tumors is attacked in combination therapy. The anti-PRO polypeptide antibody and another antibody (e.g., anti-VEGF) are administered to tumor-bearing patients at therapeutically effective doses as determined, for example, by observing necrosis of the tumor or its metastatic foci, if any. This therapy is continued until such time as no further beneficial effect is observed or clinical examination shows no trace of the tumor or any metastatic foci. Then TNF is administered, alone or in combination with an auxiliary agent such as alpha-, beta-, or gamma-interferon, anti-HER2 antibody, heregulin, anti-heregulin antibody, D-factor, interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), or agents that promote microvascular coagulation in tumors, such as anti-protein C antibody, anti-protein S antibody, or C4b binding protein (see, WO 91/01753, published 21 February 1991), or heat or radiation.

Since the auxiliary agents will vary in their effectiveness, it is desirable to compare their impact on the tumor by matrix screening in conventional fashion. The administration of anti-PRO polypeptide antibody and TNF is repeated until the desired clinical effect is achieved. Alternatively, the anti-PRO polypeptide antibody is administered together with TNF and, optionally, auxiliary agent(s). In instances where solid tumors are found in the limbs or in other locations susceptible to isolation from the general circulation, the therapeutic agents described herein are administered to the isolated tumor or organ. In other embodiments, a FGF or PDGF antagonist, such as an anti-FGF or an anti-PDGF neutralizing antibody, is administered to the patient in conjunction with the anti-PRO polypeptide antibody. Treatment with anti-PRO polypeptide antibodies preferably may be suspended during periods of wound healing or desirable neovascularization.

For the prevention or treatment of cardiovascular, endothelial, and angiogenic disorder, the appropriate dosage of an antibody herein will depend on the type of disorder to be treated, as defined above, the severity and course of the disease, whether the antibody is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the antibody, and the discretion of the attending physician. The antibody is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments.

For example, depending on the type and severity of the disorder, about 1 μ g/kg to 50 mg/kg (e.g., 0.1-20 mg/kg) of antibody is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. A typical daily or weekly dosage might range from about 1 μ g/kg to 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is repeated or sustained until a desired suppression of disorder symptoms occurs. However, other dosage regimens may be useful. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays, including, for example, radiographic tumor imaging.

xi. Articles of Manufacture with Antibodies

An article of manufacture containing a container with the antibody and a label is also provided. Such articles are described above, wherein the active agent is an anti-PRO antibody.

xii. Diagnosis and Prognosis of Tumors using Antibodies

If the indication for which the antibodies are used is cancer, while cell-surface proteins, such as growth receptors over expressed in certain tumors, are excellent targets for drug candidates or tumor (e.g., cancer)

WO 00/73445

PCT/US00/13705

treatment, the same proteins along with PRO polypeptides find additional use in the diagnosis and prognosis of tumors. For example, antibodies directed against the PRO polypeptides may be used as tumor diagnostics or prognostics.

For example, antibodies, including antibody fragments, can be used qualitatively or quantitatively to detect the expression of genes including the gene encoding the PRO polypeptide. The antibody preferably is equipped with a detectable, e.g., fluorescent label, and binding can be monitored by light microscopy, flow cytometry, fluorimetry, or other techniques known in the art. Such binding assays are performed essentially as described above.

In situ detection of antibody binding to the marker gene products can be performed, for example, by immunofluorescence or immunoelectron microscopy. For this purpose, a histological specimen is removed from the patient, and a labeled antibody is applied to it, preferably by overlaying the antibody on a biological sample. This procedure also allows for determining the distribution of the marker gene product in the tissue examined. It will be apparent to those skilled in the art that a wide variety of histological methods are readily available for *in situ* detection.

The following Examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

The disclosures of all patent and literature references cited in the present specification are hereby incorporated by reference in their entirety.

EXAMPLES

Commercially available reagents referred to in the Examples were used according to manufacturer's instructions unless otherwise indicated. The source of those cells identified in the following Examples, and throughout the specification, by ATCC accession numbers is the American Type Culture Collection, Manassas, VA. Unless otherwise noted, the present invention uses standard procedures of recombinant DNA technology, such as those described hereinabove and in the following textbooks: Sambrook *et al.*, *supra*; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989); Innis *et al.*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Inc., N.Y., 1990); Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988); Gait, *Oligonucleotide Synthesis* (IRL Press: Oxford, 1984); Freshney, *Animal Cell Culture*, 1987; Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, 1991.

EXAMPLE 1

Extracellular Domain Homology Screening to Identify Novel Polypeptides and cDNA Encoding Therefor

The extracellular domain (ECD) sequences (including the secretion signal sequence, if any) from about 950 known secreted proteins from the Swiss-Prot public database were used to search EST databases. The EST databases included public databases (e.g., GenBank), and proprietary databases (e.g., LIFESEQ[®], Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). The search was performed using the computer program BLAST or BLAST-2 [Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)] as a comparison of the ECD protein sequences to a 6 frame translation of the EST sequences. Those comparisons with a BLAST score of 70 (or in some cases, 90)

WO 00/73445

PCT/US00/13705

or greater that did not encode known proteins were clustered and assembled into consensus DNA sequences with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

Using this extracellular domain homology screen, consensus DNA sequences were assembled relative to other identified EST sequences using phrap. In addition, the consensus DNA sequences obtained were often (but not always) extended using repeated cycles of BLAST and phrap to extend the consensus sequence as far as possible using the sources of EST sequences discussed above.

Based upon the consensus sequences obtained as described above, oligonucleotides were then synthesized and used to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest and for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for a PRO polypeptide. Forward and reverse PCR primers generally range from 20 to 30 nucleotides and are often designed to give a PCR product of about 100-1000 bp in length. The probe sequences are typically 40-55 bp in length. In some cases, additional oligonucleotides are synthesized when the consensus sequence is greater than about 1-1.5 kbp. In order to screen several libraries for a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification, as per Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, *supra*, with the PCR primer pair. A positive library was then used to isolate clones encoding the gene of interest using the probe oligonucleotide and one of the primer pairs.

The cDNA libraries used to isolate the cDNA clones were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to Sall hemikinased adaptors, cleaved with NotI, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRKB or pRKD; pRKB is a precursor of pRK5D that does not contain the SfiI site; see Holmes *et al.*, Science, 253:1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NotI sites.

EXAMPLE 2

Isolation of cDNA Clones Using Signal Algorithm Analysis

Various polypeptide-encoding nucleic acid sequences were identified by applying a proprietary signal sequence finding algorithm developed by Genentech, Inc., (South San Francisco, CA) upon ESTs as well as clustered and assembled EST fragments from public (e.g., GenBank) and/or private (LITESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA) databases. The signal sequence algorithm computes a secretion signal score based on the character of the DNA nucleotides surrounding the first and optionally the second methionine codon(s) (ATG) at the 5'-end of the sequence or sequence fragment under consideration. The nucleotides following the first ATG must code for at least 35 unambiguous amino acids without any stop codons. If the first ATG has the required amino acids, the second is not examined. If neither meets the requirement, the candidate sequence is not scored. In order to determine whether the EST sequence contains an authentic signal sequence, the DNA and corresponding amino acid sequences surrounding the ATG codon are scored using a set of seven sensors (evaluation parameters) known to be associated with secretion signals. Use of this algorithm resulted in the identification of numerous polypeptide-encoding nucleic acid sequences.

EXAMPLE 3

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO175

A cDNA clone (DNA19355-1150-P1) encoding a native human PRO175 polypeptide was identified using a yeast screen, in a human umbilical vein endothelium cell cDNA library that preferentially represents the 5' ends of the primary cDNA clones.

- 5 A full length clone was identified that contained a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 21-23, and a stop signal at nucleotide positions 552-554 (Figure 1, SEQ ID NO:1). The predicted polypeptide precursor is 177 amino acids long, and has a calculated molecular weight of approximately 20,308 daltons.

- 10 Analysis of the full length PRO175 sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2) evidenced the presence of a variety of important polypeptide domains as shown in Figure 2, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO175 sequence (Figure 2; SEQ ID NO:2) evidences a type II transmembrane protein typology and the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 25; a transmembrane domain from about amino acid 26 to about amino acid 51; an extracellular domain from about amino acid 52 to about amino acid 177; potential N-linked glycosylation sites from about amino acid 129 to about amino acid 133 and from about amino acid 161 to about amino acid 165; and an N-myristoylation site from about amino acid 18 to about amino acid 24. Clone DNA19355-1150-P1 has been deposited with ATCC on November 18, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209466.

- 20 An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using the ALIGN-2 sequence alignment analysis of the full length sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), evidenced significant identity between the PRO175 amino acid sequence and several members of the TNF cytokine family, and particularly, to human Apo-2L (19.8%), Fas/Apo1-ligand (19.0%), TNF-alpha (20.6%) and Lymphotoxin-alpha (17.5%). Most of the amino acid sequence identity is found in the regions corresponding to the beta-strands in the crystal structure of TNF-alpha [Banner *et al.*, *Cell*, 73:431-435 (1993); Iick *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:17595-605 (1989); Lewit-Bentley *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 199:389-92 (1988)]. The sequence of strand C is especially conserved in all members of the family. The sequence between the putative transmembrane domain and the first beta-strand of the DNA19355-1150-P1 polypeptide is relatively short, including 5 residues, as compared to about 30 to about 80 residues in TNF-alpha, CD95L or Apo-2 ligand.

EXAMPLE 4Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO200

An expressed sequence tag (EST) DNA database (LIFESEQ[®], Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) was searched and Incyte EST clone "INC1302516" was identified that had homology to VEGF. Probes based on the Incyte EST clone "INC1302516" were used to screen a cDNA library derived from the human glioma cell line G61.

In particular, Incyte clone "INC1302516" was used to generate the following four probes:

- 35 5'-ACTTCTCAGTGTCCATAAGGG-3' (SEQ ID NO:35)
5'-GAACATAAAGAGAACCGATACCAATTTCTGGCCAGGTGTC-3' (SEQ ID NO:36)
5'-CACCAACAGCGTTTAACCAGG-3' (SEQ ID NO:37)

WO 00/73445

PCT/US00/13705

5'-ACAAACAGGCACAGTTCAC-3'

(SEQ ID NO:38)

The cDNA libraries used to isolate the cDNA clones encoding human PRO200 were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to SalI hemikinased adaptors, cleaved with NotI, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRKB or pRKD; pRK5B is a precursor of pRK5D that does not contain the SfiI site; see Holmes *et al.*, *Science*, 253:1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NotI.

A cDNA clone was identified and sequenced in entirety. The entire nucleotide sequence of DNA29101-1122 is shown in Figure 3 (SEQ ID NO:3). Clone DNA29101-1122 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 285-287, and a stop codon at nucleotide positions 1320-1322 (Figure 3; SEQ ID NO:3). The predicted polypeptide precursor is 345 amino acids long. The full-length PRO200 protein is shown in Figure 4 (SEQ ID NO:4).

Analysis of the full-length PRO200 sequence shown in Figure 4 (SEQ ID NO:4) evidences the presence of important polypeptide domains as shown in Figure 4, wherein the location given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO200 sequence (Figure 4; SEQ ID NO:4) evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 14; N-glycosylation sites from about amino acid 25 to about amino acid 29, from about amino acid 55 to about amino acid 59, and from about amino acid 254 to about amino acid 258; N-myristoylation sites from about amino acid 15 to about amino acid 21, from about amino acid 117 to about amino acid 123, from about amino acid 127 to about amino acid 133, from about amino acid 281 to about amino acid 287, from about amino acid 282 to about amino acid 288, and from about amino acid 319 to about amino acid 325; and an amidation site from about amino acid 229 to about amino acid 233.

Clone DNA29101-1122 has been deposited with ATCC on March 5, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 209653. It is understood that the deposited clone has the actual correct sequence rather than the representations provided herein.

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using the ALIGN-2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 4 (SEQ ID NO:4), evidenced some degrees of sequence identity between the PRO200 amino acid sequence and the vascular endothelial cell growth factor (VEGF) and the bone morphogenetic protein (VEGF-F polypeptide).

EXAMPLE 5

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO198

PRO198 was identified by screening the GenBank database using the computer program BLAST (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)). The PRO198 sequence was shown to have homology with known EST sequences T57280 and T50719. None of the known EST sequences have been identified as full-length sequences, or described as ligands associated with TIE receptors. Following identification, PRO198 was cloned from a human fetal lung library prepared from mRNA purchased from Clontech, Inc., (Palo Alto, CA), catalog # 6528-1, following the manufacturer's instructions. The library was screened by hybridization with synthetic

WO 00/73445

PCT/US00/13705

oligonucleotide probes.

The oligonucleotide sequences used were as follows:

- 5'-TGGTTGGCAAAGGCAAGGTGGCTGACGATCCGG-3' (SEQ ID NO:39)
 5'-GTGGGCCCTTATCTCTCTCTGTACAGCTCCGGATCGTCAGCCAC-3' (SEQ ID NO:40)
 5'-TCCATTCCCACTATGACGCTGACCCA-3' (SEQ ID NO:41)

A cDNA clone was identified and sequenced in entirety. The entire nucleotide sequence of DNA33457-1078 is shown in Figure 5 (SEQ ID NO:5). Clone DNA33457-1078 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 33-35, and a stop codon at nucleotide positions 897-899 (Figure 5; SEQ ID NO:5). The predicted polypeptide precursor is 288 amino acids long. The full-length PRO198 protein is shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6).

Analysis of the full-length PRO198 sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6) evidences the presence of important polypeptide domains as shown in Figure 6, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO198 sequence (Figure 6; SEQ ID NO:6) evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 16; an N-glycosylation site from about amino acid 178 to about amino acid 182; a glycosaminoglycan attachment site from about amino acid 272 to about amino acid 276; a tyrosine kinase phosphorylation site from about amino acid 188 to about amino acid 197; N-myristoylation sites from about amino acid 16 to about amino acid 22, from about amino acid 89 to about amino acid 95, from about amino acid 144 to about amino acid 150, and from about amino acid 267 to about amino acid 273; and a fibrinogen beta and gamma chains C-terminal domain signature from about amino acid 242 to about amino acid 255.

Clone DNA33457-1078 has been deposited with ATCC on September 18, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209283. It is understood that the deposited clone has the actual correct sequence rather than the representations provided herein.

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using the ALIGN-2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), evidenced homology between the PRO198 amino acid sequence and ligands associated with TIE receptors. The abbreviation "TIE" is an acronym which stands for "tyrosine kinase containing Ig and EGF homology domains" and was coined to designate a new family of receptor tyrosine kinases.

EXAMPLE 6

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO364

An expressed sequence tag (EST) DNA database (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) was searched and an Incyte EST sequence (Incyte EST No. 3003460) was identified that showed homology to members of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family of polypeptides.

A consensus DNA sequence was then assembled relative to the Incyte 3003460 EST and other EST sequences using repeated cycles of BLAST (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)) and "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle Washington). The consensus sequence is herein designated "consen01a" and is also herein designated as DNA44825.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Oligonucleotide probes based upon the DNA44825 and "consensus" consensus sequences were then synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for PRO364. Forward and reverse PCR primers generally range from 20-30 nucleotides and are often designed to give a PCR product of about 100-1000 bp in length. The probe sequences are typically 40-55 bp in length. In order to screen several libraries for a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification, as per Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, *supra*, with the PCR primer pair. A positive library was then used to isolate clones encoding the gene of interest using the probe oligonucleotide and one of the primer pairs.

Pairs of PCR primers (forward and reverse) were synthesized:

- 10 forward PCR primer (44825.f1):
5'-CACAGCACGGGGCGATGGG-3' (SEQ ID NO:42)
forward PCR primer (44825.f2):
5'-GCTCTGCGTTCTGCTCTG-3' (SEQ ID NO:43)
forward PCR primer (44825.G1TR.f):
15 5'-GGCACAGCACGGGGCGATGGGCGCGTTT-3' (SEQ ID NO:44)
reverse PCR primer (44825.r1):
5'-CTGGTCACTGCGACCTTCTCTGCA-3' (SEQ ID NO:45)
reverse PCR primer (44825.r2):
5'-CGCTGACCCAGGCTGAG-3' (SEQ ID NO:46)
20 reverse PCR primer (44825.G1TR.r):
5'-GAAGGTCCCGAGGCACAGTCGATACA-3' (SEQ ID NO:47)

Additionally, synthetic oligonucleotide hybridization probes were constructed from the consensus DNA44825 sequence which had the following nucleotide sequences:

- hybridization probe (44825.p1):
25 5'-GAGGAGTGCTGTTCCGAGTGGGACTGCACTGTGTGTCAGC-3' (SEQ ID NO:48)
hybridization probe (44825.G1TR.p):
5'-AGCCTGGGTGAGCGCCCAACCGGGGTCCCGGTGCGGCC-3' (SEQ ID NO:49)

In order to screen several libraries for a source of a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification with the PCR primer pairs identified above. A positive library was then used to isolate clones encoding the PRO364 gene using the probe oligonucleotides and one of the PCR primers.

30 RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from human small intestine tissue (L1B231). The cDNA libraries used to isolate the cDNA clones were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRKB or pRKD); pRK5R is a precursor of pRK5D that does not contain the SfiI site; see, Holmes *et al.*, Science, 253:1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NotI sites.

A cDNA clone was identified and sequenced in entirety. The entire nucleotide sequence of DNA47365-1206

WO 00/73445

PCT/US00/13785

is shown in Figure 7 (SEQ ID NO:7). Clone DNA47365-1206 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 121-123, and a stop codon at nucleotide positions 844-846 (Figure 7; SEQ ID NO:7). The predicted polypeptide precursor is 241 amino acids long and has a predicted molecular weight of approximately 26,000 daltons and an estimated pI of about 6.34. The full-length PRO364 protein is shown in Figure 8 (SEQ ID NO:8).

Analysis of the full-length PRO364 sequence shown in Figure 8 (SEQ ID NO:8) evidences the presence of important polypeptide domains as shown in Figure 8, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO364 sequence (Figure 8; SEQ ID NO:8) evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 25; a potential transmembrane domain from about amino acid 162 to about amino acid 180; an N-glycosylation site from about amino acid 146 to about amino acid 150; N-myristoylation sites from about amino acid 5 to about amino acid 11, from about amino acid 8 to about amino acid 14, from about amino acid 25 to about amino acid 31, from about amino acid 30 to about amino acid 36, from about amino acid 33 to about amino acid 39, from about amino acid 118 to about amino acid 124, from about amino acid 122 to about amino acid 128, and from about amino acid 156 to about amino acid 162; a prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site from about amino acid 166 to about amino acid 177; and a leucine zipper pattern from about amino acid 171 to about amino acid 193.

Clone DNA47365-1206 has been deposited with ATCC on November 7, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209436. It is understood that the deposited clone has the actual correct sequence rather than the representations provided herein.

Analysis of the amino acid sequence of the full-length PRO364 polypeptide suggests that portions of it possess homology to members of the tumor necrosis factor receptor family, thereby indicating that PRO364 may be a novel member of the tumor necrosis factor receptor family. The intracellular domain of PRO364 contains a motif (in the region of amino acids 207-214) similar to the minimal domain within CD30 receptor shown to be required for TRAF2 binding and which is also present within TNFR2. There are three apparent extracellular cysteine-rich domains characteristic of the TNFR family (see, Naismith and Sprang, *Trends Biochem. Sci.*, 23:74-79 (1998)), of which the third CRD has 3 rather than the more typical 4 or 6 cysteines of the TNFR family. As compared to the mouse GITR the PRO364 amino acid sequence has 8 cysteines in the CRD1 relative to 5 cysteines in CRD1 of mouse GITR, and the presence of one potential N-linked glycosylation site in the BCD as compared to 4 potential N-linked glycosylation sites in mouse GITR.

A detailed review of the putative amino acid sequence of the full-length native PRO364 polypeptide and the nucleotide sequence that encodes it evidences sequence homology with the mouse GITR (mGITR) protein reported by Nocentini *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:6216-6221 (1997). It is possible, therefore, that PRO364 represents the human counterpart or ortholog to the mouse GITR protein reported by Nocentini *et al.*

EXAMPLE 7

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO356

An expressed sequence tag (EST) DNA database (LIFESEQ[®], Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) was searched and an EST (#2939340) was identified that had homology to the TIE ligand family. To clone PRO356,

WO 00/73445

PCT/US90/13705

a human uterus mRNA was purchased from Clontech, Inc., (Palo Alto, CA), catalog # 6537-1 was used, following the manufacturer's instructions.

The cDNA libraries used to isolate the cDNA clones encoding human PRO356 were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NsiI site, linked with blunt to SalI hemikinased adaptors, cleaved with NsiI, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRKB or pRKD; pRKB is a precursor of pRKSD that does not contain the SfiI site; see Holmes *et al.*, Science, 253:1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NsiI.

Oligonucleotide probes based upon the above described EST sequence were then synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for PRO356. Forward and reverse PCR primers generally range from 20-30 nucleotides and are often designed to give a PCR product of about 100-1000 bp in length. The probe sequences are typically 40-55 bp in length. In order to screen several libraries for a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification, as per Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, *supra*, with the PCR primer pair. A positive library was then used to isolate clones encoding the gene of interest using the probe oligonucleotide and one of the primer pairs.

The oligonucleotide sequences used were as follows:

5'-TTCAGCACCAAGGACAAGGACAATGACAACT-3' (SEQ ID NO:50)
5'-TGTGCACACTGTGTCACAGCAGTTGTCAATTGTC-3' (SEQ ID NO:51)
5'-GTAGTACACTCCATTGAGGTTGG-3' (SEQ ID NO:52)

A cDNA clone was identified and sequenced in entirety. The entire nucleotide sequence of DNA47470-1130-P1 is shown in Figure 9 (SEQ ID NO:9). Clone DNA47470-1130-P1 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 215-217, and a stop codon at nucleotide positions 1253-1255 (Figure 9; SEQ ID NO:9). The predicted polypeptide precursor is 346 amino acids long. The full-length PRO356 protein is shown in Figure 10 (SEQ ID NO:10).

Analysis of the full-length PRO356 sequence shown in Figure 10 (SEQ ID NO:10) evidences the presence of important polypeptide domains as shown in Figure 10, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO356 sequence (Figure 10; SEQ ID NO:10) evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 26; N-glycosylation sites from about amino acid 58 to about amino acid 62, from about amino acid 253 to about amino acid 257, and from about amino acid 267 to about amino acid 271; a glycosaminoglycan attachment site from about amino acid 167 to about amino acid 171; a cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site from about amino acid 176 to about amino acid 180; N-myristoylation sites from about amino acid 168 to about amino acid 174, from about amino acid 196 to about amino acid 202, from about amino acid 241 to about amino acid 247, from about amino acid 252 to about amino acid 258, from about amino acid 256 to about amino acid 262, and from about amino acid 327 to about amino acid 333; and a cell attachment sequence from about amino acid 199 to about amino acid 202.

Clone DNA47470-1130-P1 has been deposited with ATCC on October 28, 1997 and is assigned ATCC

WO 00/73445

PCT/US00/13705

deposit no. 209422. It is understood that the deposited clone has the actual correct sequence rather than the representations provided herein.

- An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using the ALIGN-2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 10 (SEQ ID NO:10), shows amino acid sequence identity between the PRO535 amino acid sequence and both TIE-2L1 (32%) and TIE-2L2 (34%). The abbreviation "TIE" is an acronym which stands for "tyrosine kinase containing Ig and IGF homology domains" and was coined to designate a new family of receptor tyrosine kinases.

EXAMPLE 8

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO535

- Use of the signal sequence algorithm described in Example 2 above allowed identification of an EST cluster sequence from the Incyte database, designated herein as ss.clu12694.init. This ss.clu12694.init. EST cluster sequence was then compared to a variety of expressed sequence tag (EST) databases which included public EST databases (e.g., GenBank) and a proprietary EST DNA database (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) to identify existing homologies. The homology search was performed using the computer program BLAST or BLAST2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology, 265:460-480 (1996)). Those comparisons resulting in a BLAST score of 70 (or in some cases, 90) or greater that did not encode known proteins were clustered and assembled into a consensus DNA sequence with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington). The consensus sequence obtained therefrom is herein designated DNA48352.

- In light of an observed sequence homology between the DNA48352 consensus sequence and an EST sequence encompassed within clone no. H86994, from the Merck database, clone H86994 was purchased and the cDNA insert was obtained and sequenced. It was found herein that that insert encoded a full-length protein. The sequence of this cDNA insert is shown in Figure 11 (SEQ ID NO:11) and is herein designated DNA49143-1429.

- Clone DNA49143-1429 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 78-80 and ending at the stop codon at nucleotide positions 681-683 (Figure 11). The predicted polypeptide precursor is 201 amino acids long (Figure 12, SEQ ID NO:12). The full-length PRO535 protein shown in Figure 12 has an estimated molecular weight of about 22,180 daltons and a pI of about 9.68.

- Analysis of the full-length PRO535 sequence shown in Figure 12 (SEQ ID NO:12) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains as shown in Figure 12, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO535 sequence evidences the presence of the following features: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 25; a transmembrane domain from about amino acid 155 to about amino acid 174; a potential N-glycosylation site from about amino acid 196 to about amino acid 200; an N-myristoylation site from about amino acid 95 to about amino acid 101; an amidation site from about amino acid 119 to about amino acid 123; and FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomer signature 1 sequences from about amino acid 62 to about amino acid 78, from about amino acid 87 to about amino acid 124 and from about amino acid 128 to about amino acid 142. Clone DNA49143-1429 has been deposited with ATCC on June 23, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203013.

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using the ALIGN-2 sequence alignment

WO 00/73445

PCT/U500/13705

analysis of the full-length sequence shown in Figure 12 (SEQ ID NO: 12), evidenced sequence identity between the PRO535 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: ST1237, P_R93551, P_R28980, S71238, PKB2_HUMAN, CFI_C05C8_1, S55383, S72485, CELC30F2_6 and S75144.

EXAMPLE 95 Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO819

Use of the signal sequence algorithm described in Example 2 above allowed identification of an EST cluster sequence from the Incyte database, designated herein as 49605. This EST 49605 cluster sequence was then compared to a variety of expressed sequence tag (EST) databases which included public EST databases (e.g., GenBank) and a proprietary EST DNA database (JITSEQ[®], Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) to identify
10 existing homologies. The homology search was performed using the computer program BLAST or BLAST2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)). Those comparisons resulting in a BLAST score of 70 (or in some cases, 90) or greater that did not encode known proteins were clustered and assembled into a consensus DNA sequence with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington). The consensus sequence obtained therefrom is herein designated DNAS6015.

15 In light of an observed sequence homology between the DNAS6015 consensus sequence and an EST sequence encompassed within clone no. 1165785 from the Merck database, clone 1165785 was purchased and the cDNA insert was obtained and sequenced. It was found herein that that insert encoded a full-length protein. The sequence of this cDNA insert is shown in Figure 13 (SEQ ID NO: 13) and is herein designated DNAS7695-1340.

20 Clone DNAS7695-1340 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 46-48 and ending at the stop codon at nucleotide positions 202-204 (Figure 13). The predicted polypeptide precursor is 52 amino acids long (Figure 14; SEQ ID NO: 14). The full-length PRO819 protein shown in Figure 14 has an estimated molecular weight of about 5.216 daltons and a pI of about 4.67.

Analysis of the full-length PRO819 sequence shown in Figure 14 (SEQ ID NO: 14) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains as shown in Figure 14, wherein the locations given for those
25 important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO819 sequence evidences the presence of the following features: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 24, a potential N-myristoylation site from about amino acid 2 to about amino acid 8; and a region having homology to immunoglobulin light chain from about amino acid 5 to about amino acid 33. Clone DNAS7695-1340 has been deposited with ATCC on June 23, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203006.

30 An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using the ALIGN-2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 14 (SEQ ID NO: 14), evidenced sequence identity between the PRO819 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: HST103899_1, HUMIGLITEB_1, VG28_HSVSA, AF031522_1, PAD1_YEAST and AF045484_1.

EXAMPLE 1035 Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO1002

A consensus DNA sequence was assembled relative to other EST sequences using phrap as described in

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Example 1 above. This consensus sequence is herein designated <Consen0257>.

Lycyte clone 197165 was identified and the clone was further sequenced based on the results discovered herein. The 197165 clone originated from a breast tumor tissue library, BRSTTUT13.

DNA sequencing of the clone described above gave the full-length DNA sequence for PRO1002 (herein designated as UNQ486 (DNA59208-1373)) (SEQ ID NO:15) and the derived protein sequence for PRO1002.

The entire nucleotide sequence of UNQ486 (DNA59208-1373) is shown in Figure 15 (SEQ ID NO:15). Clone UNQ486 (DNA59208-1373) contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 91-93 and ending at the stop codon at nucleotide positions 766-768 (Figure 15). The predicted polypeptide precursor is 225 amino acids long (Figure 16; SEQ ID NO:16). The full-length PRO1002 protein shown in Figure 16 has an estimated molecular weight of about 25,447 daltons and a pI of about 4.79. Clone UNQ486 (DNA59208-1373) has been deposited with the ATCC on May 20, 1998 and is assigned an ATCC deposit no. 209881. Regarding the sequence, it is understood that the deposited clone contains the correct sequence, and the sequences provided herein are based on known sequencing techniques.

Analysis of the amino acid sequence of the full length PRO1002 polypeptide suggests that portions of it possess significant homology to MBP, thereby indicating that PRO1002 may be a novel cytoxic stimulant and/or toxin.

Still analyzing the amino acid sequence of SEQ ID NO:16, the putative signal peptide is at about amino acids 1-17 of SEQ ID NO:16. N-myristoylation sites are about amino acids 13-19, 103-109, 134-140, 164-170, 180-186, 191-197, 194-200, 196-202, and 198-204. The C-type lectin domain is at about amino acids 200-224 of SEQ ID NO:16. The corresponding nucleotides can be routinely determined given the sequences provided herein.

EXAMPLE 11

Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO1308

A consensus DNA sequence was assembled relative to other EST sequences using phrap as described in Example 1 above. This consensus sequence is herein designated <Consen0616>. In addition, the Consen0616 consensus sequence was extended using repeated cycles of BLAST and phrap to extend the consensus sequence as far as possible using the sources of EST sequences discussed above. The extended consensus sequence is designated herein as "DNA35726".

Based on the DNA35726 consensus sequence, oligonucleotides were synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for PRO1308. Forward and reverse PCR primers generally range from 20 to 30 nucleotides and are often designed to give a PCR product of about 100-1000 bp in length. The probe sequences are typically 40-55 bp in length. In some cases, additional oligonucleotides are synthesized when the consensus sequence is greater than about 1-1.5kbp. In order to screen several libraries for a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification, as per Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, *supra*, with the PCR primer pair. A positive library was then used to isolate clones encoding the gene of interest using the probe oligonucleotide and one of the primer pairs.

The following PCR primers (forward and reverse) were synthesized:
forward PCR primers:

WO 00/73445

PCT/US00/13785

5'-TCCTGTGAGCAGCTGGTGTU-3' (35726.f1; SEQ ID NO:53)
 5'-GGGTGGGATAGACCTGCG-3' (35726.f2; SEQ ID NO:54)
 5'-AAGGCCAAGAAGGCTGCC-3' (35726.f3; SEQ ID NO:55)
 5'-CCAGGCTGCAGACCCAG-3' (35726.f4; SEQ ID NO:56)

5 reverse PCR primers:

5'-CTTCTCAGTCCTTCCAGGATATC-3' (35726.r1; SEQ ID NO:57)
 5'-AAGCTGGATATCCTCCGTGTTGTC-3' (35726.r2; SEQ ID NO:58)
 5'-CTGAAGAGGCATGACTGCTTTTCTCA-3' (35726.r16.mm; SEQ ID NO:59)
 5'-GGGGATAAACCTATTAAATTATGCTAC-3' (35726.r15.mm; SEQ ID NO:60).

- 10 Additionally, a synthetic oligonucleotide hybridization probe was constructed from the consensus DNA35726 sequence which had the following nucleotide sequence:

hybridization probe:

5'-AACGTCACCTACATCTCTCTGTCACATGCGCCAGGTCACCTG-3' (35726.p1; (SEQ ID NO:61).

- 15 In order to screen several libraries for a source of a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification with the PCR primer pair identified above. A positive library was then used to isolate clones encoding the PRO1308 gene using the probe oligonucleotide and one of the PCR primers.

- RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from a human SK-Lu-1 adenocarcinoma cell line. The cDNA libraries used to isolate the cDNA clones were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to SalI hemiknased adaptors, cleaved with NotI, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRKB or pRK7; pRK5B is a precursor of pRK5D that does not contain the SfiI site; *see*, Holmes *et al.*, *Science*, 253:1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NotI sites.

- 25 DNA sequencing of the clones isolated as described above gave the full-length DNA sequence for PRO1308 (designated herein as DNA62306-1570 [Figure 17, SEQ ID NO:17]), and the derived protein sequence for PRO1308.

- The entire coding sequence of PRO1308 is shown in Figure 17 (SEQ ID NO:17). Clone DNA62306 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 17-19, and an apparent stop codon at nucleotide positions 806-808. The predicted polypeptide precursor is 263 amino acids long. The full-length PRO1308 protein shown in Figure 18 has an estimated molecular weight of about 27.663 daltons and a pI of about 6.77. Additional features include a signal peptide at about amino acids 1-20, potential N-glycosylation sites at about amino acids 73-77 and 215-219, and regions of homology with osteonectin domains at about amino acids 97-130 and 169-202.

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using a WU-BLAST2 sequence alignment

WO 00/73445

PCT/US00/13705

analysis of the full length sequence shown in Figure 18 (SEQ ID NO:18), revealed significant homology between the PRO1308 amino acid sequence and Dayhoff sequence S55369. Homology was also revealed between the PRO1308 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: FSA_HUMAN, P_R20063, CELTI3C2_1, AGR1_RAT, p_W09406, G01639, SC1_RAT, S60062, S51362, and IOV7_CHICK.

- 5 Clone DNA62306 (UNQ674), designated as DNA62306-1570 has been deposited with ATCC on September 9, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203354.

EXAMPLE 12

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO1304

- A consensus DNA sequence was assembled relative to other EST sequences using phrap as described in Example 1 above. This consensus sequence is designated herein as DNA35745. Based on the DNA35745 consensus sequence, oligonucleotides were synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for PRO1304.

PCR primers (forward and reverse) were synthesized:

- forward PCR primer (35745.f1):
 15 5'-GTGTTCTGCTGAGCGGATGCC-3' (SEQ ID NO:62)
 forward PCR primer (35745.f2):
 5'-GACATGGACAATCACAGG-3' (SEQ ID NO:63)
 forward PCR primer (35745.f3):
 5'-CCTTTCAGGATGTAGGAG-3' (SEQ ID NO:64)
 20 forward PCR primer (35745.f4):
 5'-GATGTCTGCCACCCCAAG-3' (SEQ ID NO:65)
 reverse PCR primer (35745.r1):
 5'-GCATCCGATATGACTTGTACGTGGC-3' (SEQ ID NO:66)
 reverse PCR primer (35745.r2):
 25 5'-TACAAGAGGGAAGAGGAGTTGCAC-3' (SEQ ID NO:67)

Additionally, a synthetic oligonucleotide hybridization probe was constructed from the consensus DNA35745 sequence which had the following nucleotide sequence:

hybridization probe (35745.p1):
 5'-GCCCATTTATGACGGCTACCTGGCTAAAGACGGCTCGAAATTCTACTGCAGCC-3' (SEQ ID NO:68)

- 30 In order to screen several libraries for a source of a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification with the PCR primer pairs identified above. A positive library was then used to isolate clones encoding the PRO1304 gene using the probe oligonucleotide and one of the PCR primers. RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from human ovary tissue.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

DNA sequencing of the isolated clones isolated as described above gave the full-length DNA sequence for DNA65406-1567 (Figure 19, SEQ ID NO:19); and the derived protein sequence for PRO1304.

The entire coding sequence of DNA65406-1567 is included in Figure 19 (SEQ ID NO:19). Clone DNA65406-1567 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 23-25, and an apparent stop codon at nucleotide positions 689-691. The predicted polypeptide precursor is 222 amino acids long, and has an estimated molecular weight of about 25,794 daltons and a pI of about 6.24. Analysis of the full-length PRO1304 sequence shown in Figure 20 (SEQ ID NO:20) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO1304 polypeptide shown in Figure 20 evidences the presence of the following: an endoplasmic reticulum targeting sequence from about amino acid 219 to about amino acid 224; an N-glycosylation site from about amino acid 45 to about amino acid 49; FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase homology blocks from about amino acid 87 to about amino acid 124, and from about amino acid 129 to about amino acid 143; an EF-hand calcium-binding domain protein homology block from about amino acid 202 to about amino acid 215 and from about amino acid 195 to about amino acid 215; a tyrosine kinase phosphorylation site from about amino acid 183 to about amino acid 190; and N-myristoylation sites from about amino acid 19 to about amino acid 25 and from about amino acid 95 to about amino acid 101. Clone DNA65406-1567 has been deposited with the ATCC on September 15, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203219.

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using a WU-BLAST2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 20 (SEQ ID NO:20), evidenced significant homology between the PRO1304 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: AF040252_1, P_R28980, S71238, CELC05C8_1, VFU52045_1, S75144, FKBP3_BOVIN, CELC50F2_6, CELR0511_12, and P_R41781.

The DNA65406-1567 sequence was also obtained by isolating and sequencing the insert of Incyte EST clone no. 2813577.

25

EXAMPLE 13

Stimulation of Heart Neonatal Hypertrophy (Assay #1)

This assay is designed to measure the ability of PRO polypeptides to stimulate hypertrophy of neonatal heart. PRO polypeptides testing positive in this assay are expected to be useful for the therapeutic treatment of various cardiac insufficiency disorders.

Cardiac myocytes from 1-day old Harlan Sprague Dawley rats were obtained. Cells (180 μ l at 7.5×10^5 /ml, serum <0.1%, freshly isolated) are added on day 1 to 96-well plates previously coated with DMEM/F12 + 4% FCS. Test samples containing the test PRO polypeptide are added directly to wells on day 2 in 20 μ l volumes. Cells are stained with crystal violet after an additional two days and scored visually by the next day. Incubator conditions are critical and require 5% CO₂.

Activity reference: phenylephrine at 1-100 μ M, PGE-2 alpha at 0.1-1.0 μ M, endothelin-1 at 1-10 nM, CTT (LIF) at 1-10 nM. No PBS is included, since Ca concentration is critical for assay response. Assay media included: DMEM/F12 (with 2.44 gm bicarbonate), 10 μ g/ml transferrin, 1 μ g/ml insulin, 1 μ g/ml aprotinin, 2 nmol/L

WO 00/73445

PCT/US00/13705

glutamine, 100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin. Protein buffer containing mannitol (4%) gave a positive signal (score 3.5) at 1/10 (0.4%) and 1/100 (0.04%), but not at 1/1000 (0.004%). Therefore, the test sample buffer containing mannitol is not run. A secondary assay consists of measuring the ANP levels (ng/ml) by ELISA in conditioned media from the cells. An increase in the ANP message can be measured by PCR from cells after a few

5 hours.

Results are assessed by visually observing cell size; a score = 3.5 or greater is considered positive for conditioned media; a score of 3.0 or greater is considered positive for purified protein.

PRO183 was observed to stimulate neonatal heart hypertrophy and exhibited a positive score in this assay compared with positive controls.

10

EXAMPLE 14Stimulation of Endothelial Cell Proliferation (Assay #8)

This assay is designed to determine whether PRO polypeptides of the present invention show the ability to stimulate adrenal cortical capillary endothelial cell (ACE) growth. PRO polypeptides testing positive in this assay would be expected to be useful for the therapeutic treatment of conditions or disorders where angiogenesis would be beneficial including, for example, wound healing, and the like (as would agonists of these PRO polypeptides). Antagonists of the PRO polypeptides testing positive in this assay would be expected to be useful for the therapeutic treatment of cancerous tumors.

15

Bovine adrenal cortical capillary endothelial (ACE) cells (from primary culture, maximum of 12-14 passages) were plated in 96-well plates at 500 cells/well per 100 microliter. Assay media included low glucose DMEM, 10% calf serum, 2 mM glutamine, and 1X penicillin/streptomycin/fungizone. Control wells included the following: (1) no ACE cells added; (2) ACE cells alone; (3) ACE cells plus VEGF (5 ng/ml); and (4) ACE cells plus FGF (5 ng/ml). The control or test sample (in 100 microliter volumes), was then added to the wells (at dilutions of 1%, 0.1% and 0.01%, respectively). The cell cultures were incubated for 6-7 days at 37°C/5% CO₂. After the incubation, the media in the wells was aspirated, and the cells were washed 1X with PBS. An acid phosphatase reaction mixture (100 microliter; 0.1M sodium acetate, pH 5.5, 0.1% Triton X-100, 10 mM p-nitrophenyl phosphate) was then added to each well. After a 2 hour incubation at 37°C, the reaction was stopped by addition of 10 microliters 1N NaOH. Optical density (OD) was measured on a microplate reader at 405 nm.

20

25

The activity of a PRO polypeptide was calculated as the fold increase in proliferation (as determined by the acid phosphatase activity; OD 405 nm) relative to (1) cell only background, and (2) relative to maximum stimulation by VEGF. VEGF (at 3-10 ng/ml) and FGF (at 1-5 ng/ml) were employed as an activity reference for maximum stimulation. Results of the assay were considered "positive" if the observed stimulation was > 50% increase over background. VEGF (5 ng/ml) control at 1% dilution gave 1.24 fold stimulation; FGF (5 ng/ml) control at 1% dilution gave 1.46 fold stimulation.

30

PRO1710 tested positive in this assay.

35

EXAMPLE 15Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Stimulated Proliferation of Endothelial Cell Growth

WO 00/73445

PCT/US00/13705

(Assay #9)

The ability of various PRO polypeptides to inhibit VEGF stimulated proliferation of endothelial cells was tested. Polypeptides testing positive in this assay are useful for inhibiting endothelial cell growth in mammals where such an effect would be beneficial, e.g., for inhibiting tumor growth.

- 5 Specifically, bovine aortic endothelial cells (BAEC) (from primary culture, maximum of 12-14 passages) were plated in 96-well plates at 500 cells/well per 100 microliter. Assay media included low glucose DMEM, 10% calf serum, 2 mM glutamine, and 1X penicillin/streptomycin/fungizone. Control wells included the following: (1) no BAEC cells added; (2) BAEC cells alone; (3) BAEC cells plus 5 ng/ml bFGF; (4) BAEC cells plus 3 ng/ml VEGF; (5) BAEC cells plus 3 ng/ml VEGF plus 1 ng/ml TGF-beta; and (6) BAEC cells plus 3 ng/ml VEGF plus 5 ng/ml TGF-beta. The test samples, poly-his tagged PRO polypeptides (in 100 microliter volumes), were then added to the wells (at dilutions of 1%, 0.1% and 0.01%, respectively). The cell cultures were incubated for 6-7 days at 37°C/5% CO₂. After the incubation, the media in the wells was aspirated, and the cells were washed 1X with PBS. An acid phosphatase reaction mixture (100 microliter; 0.1M sodium acetate, pH 5.5, 0.1% Triton X-100, 10 mM p-nitrophenyl phosphate) was then added to each well. After a 2 hour incubation at 37°C, the reaction was stopped by addition of 10 microliters 1N NaOH. Optical density (OD) was measured on a microplate reader at 405 nm.

- 15 The activity of PRO polypeptides was calculated as the percent inhibition of VEGF (3 ng/ml) stimulated proliferation (as determined by measuring acid phosphatase activity at OD 405 nm) relative to the cells without stimulation. TGF-beta was employed as an activity reference at 1 ng/ml, since TGF-beta blocks 70-90% of VEGF-stimulated BAEC cell proliferation. The results are indicative of the utility of the PRO polypeptides in cancer therapy and specifically in inhibiting tumor angiogenesis. Numerical values (relative inhibition) are determined by calculating the percent inhibition of VEGF stimulated proliferation by the PRO polypeptides relative to cells without stimulation and then dividing that percentage into the percent inhibition obtained by TGF-beta at 1 ng/ml which is known to block 70-90% of VEGF stimulated cell proliferation. The results are considered positive if the PRO polypeptide exhibits 30% or greater inhibition of VEGF stimulation of endothelial cell growth (relative inhibition 30% or greater).

PRO183 and PRO202 tested positive in this assay.

EXAMPLE 16Induction of c-fos in Endothelial Cells (Assay #34)

- This assay is designed to determine whether PRO polypeptides show the ability to induce c-fos in endothelial cells. PRO polypeptides testing positive in this assay would be expected to be useful for the therapeutic treatment of conditions or disorders where angiogenesis would be beneficial including, for example, wound healing, and the like (as would agonists of these PRO polypeptides). Antagonists of the PRO polypeptides testing positive in this assay would be expected to be useful for the therapeutic treatment of cancerous tumors.

- Human venous umbilical vein endothelial cells (HUVEC, Cell Systems) in growth media (50% Ham's F12 w/o GHT, low glucose, and 50% DMEM without glycine; with NaHCO₃, 1% glutamine, 10 mM HEPES, 10% FBS, 10 ng/ml bFGF) were plated on 96-well microtiter plates at a cell density of 1×10^4 cells/well. The day after plating, the cells were starved by removing the growth media and treating the cells with 100 μ l/well test samples

WO 00/73445

PCT/US00/13705

and controls (positive control = growth media; negative control = Protein 32 buffer = 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 4% (w/v) mannitol, pH 6.8). The cells were incubated for 30 minutes at 37°C, in 5% CO₂. The samples were removed, and the first part of the bDNA kit protocol (Chiron Diagnostics, cat. #6005-037) was followed, where each capitalized reagent/buffer listed below was available from the kit.

- 5 Briefly, the amounts of the TM Lysis Buffer and Probes needed for the tests were calculated based on information provided by the manufacturer. The appropriate amounts of thawed Probes were added to the TM Lysis Buffer. The Capture Hybridization Buffer was warmed to room temperature. The bDNA strips were set up in the metal strip holders, and 100 µl of Capture Hybridization Buffer was added to each b-DNA well needed, followed by incubation for at least 30 minutes. The test plates with the cells were removed from the incubator, and the media was gently removed using the vacuum manifold. 100 µl of Lysis Hybridization Buffer with Probes were quickly
- 10 pipetted into each well of the microtiter plates. The plates were then incubated at 55°C for 15 minutes. Upon removal from the incubator, the plates were placed on the vortex mixer with the microtiter adapter head and vortexed on the #2 setting for one minute. 80 µl of the lysate was removed and added to the bDNA wells containing the Capture Hybridization Buffer, and pipetted up and down to mix. The plates were incubated at 53°C for at least
- 15 16 hours.

- On the next day, the second part of the bDNA kit protocol was followed. Specifically, the plates were removed from the incubator and placed on the bench to cool for 10 minutes. The volumes of additions needed were calculated based upon information provided by the manufacturer. An Amplifier Working Solution was prepared by making a 1:100 dilution of the Amplifier Concentrate (20 fmol/l) in AL Hybridization Buffer. The hybridization
- 20 mixture was removed from the plates and washed twice with Wash A. 50 µl of Amplifier Working Solution was added to each well and the wells were incubated at 53°C for 30 minutes. The plates were then removed from the incubator and allowed to cool for 10 minutes. The Label Probe Working Solution was prepared by making a 1:100 dilution of Label Concentrate (40 pmol/µl) in AL Hybridization Buffer. After the 10-minute cool-down period, the amplifier hybridization mixture was removed and the plates were washed twice with Wash A. 50 µl of Label
- 25 Probe Working Solution was added to each well and the wells were incubated at 53°C for 15 minutes. After cooling for 10 minutes, the Substrate was warmed to room temperature. Upon addition of 3 µl of Substrate Enhancer to each ml of Substrate needed for the assay, the plates were allowed to cool for 10 minutes, the label hybridization mixture was removed, and the plates were washed twice with Wash A and three times with Wash D. 50 µl of the Substrate Solution with Enhancer was added to each well. The plates were incubated for 30 minutes
- 30 at 37°C and RLU was read in an appropriate luminometer.

- The replicates were averaged and the coefficient of variation was determined. The measure of activity of the fold increase over the negative control (Protein 32/HEPES buffer described above) value was indicated by chemiluminescence units (RLU). The results are considered positive if the PRO polypeptide exhibits at least a two-fold value over the negative buffer control. Negative control = 1.00 RLU at 1.00% dilution. Positive control =
- 35 8.39 RLU at 1.00% dilution.

PRO861 tested positive in this assay.

EXAMPLE 19

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Enhancement of Heart Neonatal Hypertrophy Induced by F2a (Assay #37)

This assay is designed to measure the ability of PRO polypeptides to stimulate hypertrophy of neonatal heart. PRO polypeptides testing positive in this assay are expected to be useful for the therapeutic treatment of various cardiac insufficiency disorders.

- 5 Cardiac myocytes from 1-day old Harlan Sprague Dawley rats were obtained. Cells (180 μ l) at 7.5×10^5 /ml, serum <0.1%, freshly isolated) are added on day 1 to 96-well plates previously coated with DMEM/F12 + 4% FCS. Test samples containing the test PRO polypeptide (20 μ l/well) are added directly to the wells on day 1. PGF $_2$ (20 μ l/well) is then added on day 2 at a final concentration of 10^{-6} M. The cells are then stained on day 4 and visually scored on day 5. Visual scores are based on cell size, wherein cells showing no increase in size as compared to negative controls are scored 0.0, cells showing a small to moderate increase in size as compared to negative controls are scored 1.0 and cells showing a large increase in size as compared to negative controls are scored 2.0. A score of 1.0 or greater is considered positive.

- 10 No PBS is included, since calcium concentration is critical for assay response. Plates are coated with DMEM/F12 plus 4% FCS (200 μ l/well). Assay media included: DMEM/F12 (with 2.44 gm bicarbonate), 10 μ g/ml transferrin, 1 μ g/ml insulin, 1 μ g/ml aprotinin, 2 mmol/L glutamine, 100 U/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin. Protein buffer containing mannitol (4%) gave a positive signal (score 3.5) at 1/10 (0.4%) and 1/100 (0.04%), but not at 1/1000 (0.004%). Therefore the test sample buffer containing mannitol is not run.

PRO183 and PRO202 tested positive in this assay.

EXAMPLE 18

- 20 Induction of Endothelial Cell Apoptosis (Assay #73)

The ability of PRO polypeptides to induce apoptosis in endothelial cells was tested in human venous umbilical vein endothelial cells (HUVEC, Cell Systems). A positive test in the assay is indicative of the usefulness of the polypeptide in therapeutically treating tumors as well as vascular disorders where inducing apoptosis of endothelial cells would be beneficial.

- 25 The cells were plated on 96-well microtiter plates (Amersham Life Science, cytostar-T scintillating microplate, RPNQ160, sterile, tissue culture treated, individually wrapped), in 10% serum (CSG-medium, Cell Systems), at a density of 2×10^4 cells per well in a total volume of 100 μ l. On day 2, test samples containing the PRO polypeptide were added in triplicate at dilutions of 1%, 0.33% and 0.1%. Wells without cells were used as a blank and wells with cells only were used as a negative control. As a positive control 1:3 serial dilutions of 50 μ l of a 3x stock of staurosporine were used. The ability of the PRO polypeptide to induce apoptosis was determined by processing of the 96 well plates for detection of Annexin V, a member of the calcium and phospholipid binding proteins, to detect apoptosis.

- 30 0.2 ml Annexin V - Biotin stock solution (100 μ g/ml) was diluted in 4.6 ml $2 \times \text{Ca}^{2+}$ binding buffer and 2.5% BSA (1:25 dilution). 50 μ l of the diluted Annexin V - Biotin solution was added to each well (except controls) to a final concentration of 1.0 μ g/ml. The samples were incubated for 10-15 minutes with Annexin-Biotin prior to direct addition of ^{35}S -Streptavidin. ^{35}S -Streptavidin was diluted in $2 \times \text{Ca}^{2+}$ Binding buffer, 2.5% BSA and was added to all wells at a final concentration of 3×10^4 cpm/well. The plates were then sealed, centrifuged at 1000

WO 00/73445

PCT/US00/13705

rpm for 15 minutes and placed on orbital shaker for 2 hours. The analysis was performed on a 1450 Microbeta Trilux (Wallac). Percent above background represents the percentage amount of counts per minute above the negative controls. Percents greater than or equal to 30% above background are considered positive. PRO198 gave positive results (induced endothelial cell apoptosis) in the above described assay.

5

EXAMPLE 19Enhancement of Heart Neonatal Hypertrophy Induced by LIF + ET-1 (Assay #75)

This assay is designed to measure the ability of PRO polypeptides to stimulate hypertrophy of neonatal heart. PRO polypeptides testing positive in this assay are expected to be useful for the therapeutic treatment of various cardiac insufficiency disorders.

10 Cardiac myocytes from 1-day old Harlan Sprague Dawley rats were obtained. Cells (180 μ l at 7.5×10^6 /ml, serum <0.1%, freshly isolated) are added on day 1 to 96-well plates previously coated with DMEM/F12 + 4% FCS. Test samples containing the test PRO polypeptide are added directly to wells on day 2 in 20 μ L volumes. LIF and ET are added on Day 3. Cells are stained with crystal violet after an additional two days and scored visually by the next day. Incubator conditions are critical and require 5% CO₂.

15 Activity reference: CT1 (LIF) at 0.1 nM, 0.01 nM; endothelin-1 at 1.0 nM. No PBS is included, since Ca concentration is critical for assay response. Assay media included: DMEM/F12 (with 2.44 gm bicarbonate), 10 μ g/ml transferrin, 1 μ g/ml insulin, 1 μ g/ml prolactin, 2 mmol/L glutamine, 100 U/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin. Protein buffer containing mannitol (4%) gave a positive signal (score 3.5) at 1/10 (0.4%) and 1/100 (0.04%), but not at 1/1000 (0.004%). Therefore, the test sample buffer containing mannitol is not run. A secondary assay consists of measuring the ANP levels (ng/ml) by ELISA in conditioned media from the cells. An increase in the ANP message can be measured by PCR from cells after a few hours.

20 Results are assessed by visually observing cell size: a score = 3.5 or greater is considered positive for conditioned media; a score of 3.0 or greater is considered positive for purified protein.

25 PRO200 and PRO882 purified polypeptides were observed to stimulate neonatal heart hypertrophy and exhibited positive scores in this assay compared with positive controls.

EXAMPLE 20Detection of Endothelial Cell Apoptosis (FACS) (Assay #96)

The ability of PRO polypeptides of the present invention to induce apoptosis in endothelial cells was tested in human venous umbilical vein endothelial cells (HUVEC, Cell Systems) in gelatinized T175 flasks using
30 HUVEC cells below passage 10. PRO polypeptides testing positive in this assay are expected to be useful for therapeutically treating conditions where apoptosis of endothelial cells would be beneficial including, for example, the therapeutic treatment of tumors.

On day one, the cells were split [420,000 cells per gelatinized 6 cm dishes - (11×10^5 cells/cm² Falcon, Primaria)] and grown in media containing serum (CS-C, Cell System) overnight or for 16 hours to 24 hours.

35 On day 2, the cells were washed 1x with 5 ml PBS ; 3 ml of 0% serum medium was added with VEGF (100 ng/ml); and 30 μ l of the PRO test compound (final dilution 1%) or 0% serum medium (negative control)

WO 00/73445

PCT/US00/13705

was added. The mixtures were incubated for 48 hours before harvesting.

The cells were then harvested for FACS analysis. The medium was aspirated and the cells washed once with PBS. 5 μ l of 1 x trypsin was added to the cells in a T-75 flask, and the cells were allowed to stand until they were released from the plate (about 5-10 minutes). Trypsinization was stopped by adding 5 ml of growth media. The cells were spun at 1000 rpm for 5 minutes at 4°C. The media was aspirated and the cells were resuspended in 10 ml of 10% serum complemented medium (Cell Systems), 5 μ l of Annexin-FITC (BioVision) added and chilled tubes were submitted for FACS. A positive result was determined to be enhanced apoptosis in the PRO polypeptide treated samples as compared to the negative control.

PRO1002 and PRO1304 tested positive in this assay.

10

EXAMPLE 21

Fibroblast (BHK-21) Proliferation (Assay #98)

This assay shows that certain PRO polypeptides of the invention act to induce proliferation of mammalian fibroblast cells in culture and, therefore, function as useful growth factors in mammalian systems. The assay is performed as follows. BHK-21 fibroblast cells plated in standard growth medium at 2500 cells/well in a total volume of 100 μ l. The PRO polypeptide, β -FGF (positive control) or nothing (negative control) are then added to the wells in the presence of 1 μ g/ml of heparin for a total final volume of 200 μ l. The cells are then incubated at 37°C for 6 to 7 days. After incubation, the media is removed, the cells are washed with PBS and then an acid phosphatase substrate reaction mixture (100 μ l/well) is added. The cells are then incubated at 37°C for 2 hours. 10 μ l per well of 1N NaOH is then added to stop the acid phosphatase reaction. The plates are then read at OD 405nm. A positive in the assay is acid phosphatase activity which is at least 50% above the negative control.

15

20

PRO356 and PRO1308 tested positive in this assay.

EXAMPLE 22

Inhibition of bFGF Stimulated Proliferation of Endothelial Cell Growth (HUVEC) (Assay #104)

The ability of various PRO polypeptides to inhibit bFGF stimulated proliferation of endothelial cells was tested. Polypeptides testing positive in this assay are useful for inhibiting endothelial cell growth in mammals where such an effect would be beneficial, e.g., for inhibiting tumor growth.

25

Specifically, HUVEC cells in Media 199 (Sigma) w/2% FBS (Hyclone) were plated in 96-well plates at 500 cells/well per 100 microliter and left overnight. Growth Media included: EGM plus 1x Pen Strep plus 1x L-Glutamine plus 10% FBS Assay Media: Media 199 plus 2% FBS plus 50 ng/ml bFGF. On day 2, proteins were diluted at 3 concentrations (1%, 0.1%, 0.01%) in the presence of bFGF (50 ng/ml) and added to the cells. The following steps were done as described in the instruction booklet for the Boehringer Mannheim BrdU Cell Proliferation ELISA (Cat No. 1 637 229). On day 3, the cells were labeled with BrdU (final concentration 10 μ M). On day 4, the cells were fixed and the DNA was denatured by adding FixDenat for 30 minutes. The FixDenat was removed and the anti-BrdU-POD was added after 2 hours. The plate was then washed and the substrate was added. After allowing the color to develop for 5 minutes, the reaction was quenched with 1 M H₂SO₄. The absorbance (OD) was measured on a microplate reader at 405 nm.

30

35

WO 00/73445

PCT/US00/13705

The activity of PRO polypeptides to inhibit bFGF stimulation of HUVEC proliferation was measured against the control cells (bFGF alone). Any test sample that gave an absorbance reading significantly below that of bFGF was considered as a positive result in this assay. The results are indicative of the utility of the PRO polypeptides in cancer therapy and specifically in inhibiting tumor angiogenesis.

- 5 PRO175, PRO364, PRO535, PRO819 and PRO879 polypeptides tested positive in this assay:

EXAMPLE 23

Induction of Endothelial Cell Apoptosis (ELISA) (Assay #109)

The ability of PRO polypeptides to induce apoptosis in endothelial cells was tested in human venous umbilical vein endothelial cells (HUVEC, Cell Systems) using a 96-well format, in 0% serum media supplemented with 100 ng/ml VEGF, 0.1% BSA, 1X pen/strep. The 96-well plates used were manufactured by Falcon (No. 3072). Coating of 96 well plates were prepared by allowing gelatinization to occur for >30 minutes with 100 μ l of 0.2% gelatin in PBS solution. The gelatin mix was aspirated thoroughly before plating HUVE cells at a final concentration of 2×10^4 cells/ml in 10% serum containing medium - 100 μ l volume per well. The cells were grown for 24 hours before adding test samples containing the PRO polypeptide of interest.

15 To all wells, 100 μ l of 0% serum media (Cell Systems) complemented with 100 ng/ml VEGF, 0.1% BSA, 1X pen/strep, was added. Test samples containing PRO polypeptides were added in triplicate at dilutions of 1%, 0.33% and 0.11%. Wells without cells were used as a blank and wells with cells only were used as a negative control. As a positive control 1:3 serial dilutions of 50 μ l of a 3x stock of staurosporine were used. The cells were incubated for 24 to 35 hours prior to ELISA.

20 ELISA was used to determine levels of apoptosis preparing solutions according to the Boehringer Manual [Boehringer, Cell Death Detection ELISA plus, Cat No. 1 920 685]. Sample preparations: 96 well plates were spun down at 1 krpm for 10 minutes (200g); the supernatant was removed by fast inversion, placing the plate upside down on a paper towel to remove residual liquid. To each well, 200 μ l of 1X Lysis buffer was added and incubation allowed at room temperature for 30 minutes without shaking. The plates were spun down for 10 minutes at 1 krpm, and 20 μ l of the lysate (cytoplasmic fraction) was transferred into streptavidin coated MTP. 80 μ l of immunoreagent mix was added to the 20 μ l lysate in each well. The MTP was covered with adhesive foil and incubated at room temperature for 2 hours by placing it on an orbital shaker (200 rpm). After two hours, the supernatant was removed by suction and the wells rinsed three times with 250 μ l of 1X incubation buffer per well (removed by suction). Substrate solution was added (100 μ l) into each well and incubated on an orbital shaker at room temperature at 250 rpm until color development was sufficient for a photometric analysis (approx. after 10-20 minutes). A 96 well reader was used to read the plates at 405 nm, reference wavelength, 492 nm. The levels obtained for PIN 32 (control) buffer) was set to 100%. Samples with levels >130% were considered positive for induction of apoptosis. PRO877 gave positive results as measured by the ELISA assay described above.

EXAMPLE 24

In situ Hybridization

35 *In situ* hybridization is a powerful and versatile technique for the detection and localization of nucleic acid

WO 00/73445

PCT/US00/13705

sequences within cell or tissue preparations. It may be useful, for example, to identify sites of gene expression, analyze the tissue distribution of transcription, identify and localize viral infection, follow changes in specific mRNA synthesis, and aid in chromosome mapping.

In situ hybridization was performed following an optimized version of the protocol by Lu and Gillett, Cell

- 5 Vision, 1: 169-176 (1994), using PCR-generated ³²P-labeled riboprobes. Briefly, formalin-fixed, paraffin-embedded human tissues were sectioned, deparaffinized, deproteinized in proteinase K (20 g/ml) for 15 minutes at 37 °C, and further processed for *in situ* hybridization as described by Lu and Gillett, *supra*. A (γ-³²P)UTP-labeled antisense riboprobe was generated from a PCR product and hybridized at 55 °C overnight. The slides were dipped in Kodak NTB2™ nuclear track emulsion and exposed for 4 weeks.

10 ³²P-Riboprobe synthesis

6.0 μl (125 mCi) of ³²P-UTP (Amersham BF 1002, SA<2000 Ci/mmol) were speed-vacuum dried. To each tube containing dried ³²P-UTP, the following ingredients were added:

- 2.0 μl 5x transcription buffer
1.0 μl DTT (100 mM)
15 2.0 μl NTP mix (2.5 mM: 10 μl each of 10 mM GTP, CTP & ATP + 10 μl H₂O)
1.0 μl UTP (50 μM)
1.0 μl RNAsin
1.0 μl DNA template (1 μg)
1.0 μl H₂O

- 20 1.0 μl RNA polymerase (for PCR products T3 = AS, T7 = S, usually)

The tubes were incubated at 37 °C for one hour. A total of 1.0 μl RQ1 DNase was added, followed by incubation at 37 °C for 15 minutes. A total of 90 μl TE (10 mM Tris pH 7.6/1 mM EDTA pH 8.0) was added, and the mixture was pipetted onto DE81 paper. The remaining solution was loaded in a MICROCON-50™ ultrafiltration unit, and spun using program 10 (6 minutes). The filtration unit was inverted over a second tube and spun using program 2 (3 minutes). After the final recovery spin, a total of 100 μl TE was added, then 1 μl of the final product was pipetted on DE81 paper and counted in 6 ml of BIOHUR II™.

- 25 The probe was run on a TBE/urea gel. A total of 1-3 μl of the probe or 5 μl of RNA Mx III was added to 3 μl of loading buffer. After heating on a 95 °C heat block for three minutes, the gel was immediately placed on ice. The wells of gel were flushed, and the sample was loaded and run at 180-250 volts for 45 minutes. The gel was wrapped in plastic wrap (SARAN™ brand) and exposed to XAR film with an intensifying screen in a -70 °C freezer one hour to overnight.

³²P-Hybridization

A. Pretreatment of frozen sections

- 35 The slides were removed from the freezer, placed on aluminum trays, and thawed at room temperature for 5 minutes. The trays were placed in a 55 °C incubator for five minutes to reduce condensation. The slides were fixed for 10 minutes in 4% paraformaldehyde on ice in the fume hood, and washed in 0.5 x SSC for 5 minutes, at room temperature (25 ml 20 x SSC + 975 ml SQ H₂O). After deproteinization in 0.5 μg/ml proteinase K for 10 minutes at 37 °C (12.5 μl of 10 mg/ml stock in 250 ml prewarmed RNase-free RNase buffer), the sections were washed

WO 00/73445

PCT/US00/13705

in 0.5 x SSC for 10 minutes at room temperature. The sections were dehydrated in 70%, 95%, and 100% ethanol, 2 minutes each.

B. *Pretreatment of paraffin-embedded sections*

- 5 The slides were deparaffinized, placed in SQ H₂O, and rinsed twice in 2 x SSC at room temperature, for 5 minutes each time. The sections were deproteinized in 20 µg/ml proteinase K (500 µl of 10 mg/ml in 250 ml RNase-free RNase buffer, 37°C, 15 minutes) for human embryo tissue, or 8 x proteinase K (100 µl in 250 ml RNase buffer, 37°C, 30 minutes) for formalin tissues. Subsequent rinsing in 0.5 x SSC and dehydration were performed as described above.

C. *Prehybridization*

- 10 The slides were laid out in a plastic box lined with Box buffer (4 x SSC, 50% formamide) - saturated filter paper. The tissue was covered with 50 µl of hybridization buffer (3.75 g dextran sulfate + 6 ml SQ H₂O), vortexed, and heated in the microwave for 2 minutes with the cap loosened. After cooling on ice, 18.75 ml formamide, 3.75 ml 20 x SSC, and 9 ml SQ H₂O were added, and the tissue was vortexed well and incubated at 42°C for 1-4 hours.

D. *Hybridization*

- 15 1.0 x 10⁶ cpm probe and 1.0 µl tRNA (50 mg/ml stock) per slide were heated at 95°C for 3 minutes. The slides were cooled on ice, and 48 µl hybridization buffer was added per slide. After vortexing, 50 µl ³²P mix was added to 50 µl prehybridization on the slide. The slides were incubated overnight at 55°C.

E. *Washes*

- 20 Washing was done for 2x10 minutes with 2xSSC, EDTA at room temperature (400 ml 20 x SSC + 16 ml 0.25 M EDTA, V=4L), followed by RNaseA treatment at 37°C for 30 minutes (500 µl of 10 mg/ml in 250 ml RNase buffer = 20 µg/ml). The slides were washed 2 x10 minutes with 2 x SSC, EDTA at room temperature. The stringency wash conditions were as follows: 2 hours at 55°C, 0.1 x SSC, EDTA (20 ml 20 x SSC + 16 ml EDTA, V=4L).

F. *Oligonucleotides*

- 25 *In situ* analysis was performed on four of the DNA sequences disclosed herein. The oligonucleotides employed for these analyses are as follows:

(1) DNA19355-1150 (PRG175) (TNF motif homolog)

19355 p1:

5'-TC1AATACGACTCACTATAGCTCAGGGGAAGAGCCAAAGA-3' (SEQ ID NO:69)

30 19355 p2:

5'-TGAAATTAACCCCTCACTAAGCACTGCAATGCAGGGGACTA-3' (SEQ ID NO:70)

(2) DNA29101-1122 (PRO200)

p1:

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GGC GGA ATC CAA CCT GAG TAG-3' (SEQ ID NO:71)

35 p2:

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GCG GCT ATC CTC CTG TGC TC-3' (SEQ ID NO:72)

WO 00/73445

PCT/US00/13705

(3) DNA47365-1206 (PRO364) (TNF receptor homolog)

p1:

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AAC CCG AGC ATG GCA CAG CAC-3' (SEQ ID NO:73)

p2:

- 5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TCT CCC AGC CGC CCC TTC TC-3' (SEQ ID NO:74)

(4) DNA28498 (PRO183) (EHE-2)

p1:

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CAG CAA AAG AAG CGG TGG TG-3' (SEQ ID NO:75)

p2:

- 10 5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TTC AGC ACG CCA GAG ACA CTT-3' (SEQ ID NO:76)

p3:

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC ATT CCG CTT GCA CAG TGT CCG-3' (SEQ ID NO:77)

p4:

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CCA CCA CTC GCA GAC CCA CAG-3' (SEQ ID NO:78)

15 G. *Results*

In situ analysis was performed on the above four DNA sequences disclosed herein. The results from these analyses are as follows:

(1) DNA19355-1150-1 (PRO175) (TNF motif)

A specific positive signal was observed over the population of endothelial cells in the fetal adrenals.

- 20 Endothelial cells elsewhere were negative.

(2) DNA29101-1122 (PRO200) (VEGF homolog)*Expression in Human Tissues*

- In fetal tissues, expression was observed in developing lower limb bones at the edge of the cartilaginous anlage (*i.e.*, around the outside edge). Also, expression was seen in developing tendons, in vascular smooth muscle and in cells embracing developing skeletal muscle myocytes and myotubes. Expression was also observed at the epiphyseal growth plate. Expression was also seen in the marginal sinus of developing lymph nodes. In addition, expression in the thymus was seen in the subcapsular region of the thymic cortex, possibly representing either the subcapsular epithelial cells or the proliferating thymocytes that are found in this region. Expression in the smooth muscle of the trachea was also reported. In the brain cerebral cortex, focal expression occurred in cortical neurons.
- 30 Expression was also observed in the following tissues: smooth muscle of the small intestine, generalized expression over the thyroid epithelium, liver expression in ductal plate cells, stomach expression in mural smooth muscle, fetal skin expression in the basal layer of squamous epithelium, placenta expression in interstitial cells (in trophoblastic villi) and cord expression in the wall of arteries and vein. The spleen, spinal cord, and the adrenals showed negative results.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Expression patterns suggest that this VEGF homolog may be involved in cell differentiation and/or proliferation. The expression pattern in developing skeletal muscle suggests a possible role in myoblast differentiation and/or proliferation.

Expression in Tumors and Fetal Tissues

- 5 High expression was observed at the following sites:
 Chimp ovary - granulosa cells of maturing follicles, lower intensity signal observed over thecal cells
 Chimp parathyroid - high expression over chief cells
 Human fetal testis - moderate expression over stromal cells surrounding developing tubules
- 10 Human fetal lung - high expression over chondrocytes in developing bronchial tree, and low level expression over branching bronchial epithelium
 Specific expression was not observed over the renal cell, gastric and colonic carcinomas.
 Fetal tissues examined (E12-E16 weeks) included: placenta, umbilical cord, liver, kidney, adrenals, thyroid, lungs, heart, great vessels, esophagus, stomach, small intestine, spleen, thymus, pancreas, brain, eye, spinal cord.
- 15 body wall, pelvis and lower limb.
 Adult tissues examined included: liver, kidney, adrenals, myocardium, aorta, spleen, lymph node, pancreas, lung, skin, cerebral cortex (rm), hippocampus (rm), cerebellum (rm), penis, eye, bladder, gastric carcinoma, colon, colonic carcinoma, chondrosarcoma, acetaminophen induced liver injury and hepatic cirrhosis.

(3) DNA47365-1206 (PRO364) (TNF receptor homolog)

- 20 In the fetus, there was expression in the fascia lining the anterior surface of the vertebral body. There was also expression over the fetal retina. However, there was low level expression over the fetal neurones. All other tissues were negative.

(4) DNA28498 (PRO183) (LIF-2)

- Expression was seen over the inner aspect of the fetal retina. Strong expression was seen over the spinal ganglia and over neurones in the anterior horns of the spinal cord of the human fetus. While significant expression was not observed in the human fetal brain, high expression was observed over neurones in rhesus monkey brain, including hippocampal neurones.

EXAMPLE 25

- 30 Use of PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 as a Hybridization Probe
 The following method describes use of a nucleotide sequence encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 as a hybridization probe.
- 35 DNA comprising the coding sequence of full-length or mature PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879,

WO 00/73445

PCT/US00/13705

PRO882 or PRO1710 (as shown in Figures 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 and 33, respectively) or a fragment thereof is employed as a probe to screen for homologous DNAs (such as those encoding naturally-occurring variants of PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710) in human tissue cDNA libraries or human tissue genomic libraries.

- Hybridization and washing of filters containing either library DNAs is performed under the following high stringency conditions. Hybridization of radiolabeled probe derived from the gene encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide to the filters is performed in a solution of 50% formamide, 5x SSC, 0.1% SDS, 0.1% sodium pyrophosphate, 50 mM sodium phosphate, pH 6.8, 2x Denhardt's solution, and 10% dextran sulfate at 42°C for 20 hours. Washing of the filters is performed in an aqueous solution of 0.1x SSC and 0.1% SDS at 42°C.

DNAs having a desired sequence identity with the DNA encoding full-length native sequence can then be identified using standard techniques known in the art.

15

EXAMPLE 26

Expression of Nucleic Acid Encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 in *E. coli*

- This Example illustrates preparation of an unglycosylated form of PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 by recombinant expression in *E. coli*.

- The DNA sequence encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 (SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 or 33, respectively) is initially amplified using selected PCR primers. The primers should contain restriction enzyme sites that correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector. A variety of expression vectors may be employed. An example of a suitable vector is pBR322 (derived from *E. coli*; see Bolivar *et al.*, Gene, 2: 95 (1977)), which contains genes for ampicillin and tetracycline resistance. The vector is digested with restriction enzyme and dephosphorylated. The PCR-amplified sequences are then ligated into the vector. The vector will preferably include sequences that encode an antibiotic-resistance gene, a trp promoter, a poly-His leader (including the first six STII codons, poly-His sequence, and enterokinase cleavage site), the region encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710, lambda transcriptional terminator, and an argU gene.

- The ligation mixture is then used to transform a selected *E. coli* strain using the methods described in Sambrook *et al.*, *supra*. Transformants are identified by their ability to grow on LB plates and antibiotic-resistant colonies are then selected. Plasmid DNA can be isolated and confirmed by restriction analysis and DNA sequencing.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

Selected clones can be grown overnight in liquid culture medium such as LB broth supplemented with antibiotics. The overnight culture may subsequently be used to inoculate a larger-scale culture. The cells are then grown to a desired optical density, during which the expression promoter is turned on.

After culturing the cells for several more hours, the cells can be harvested by centrifugation. The cell pellet
 5 obtained by the centrifugation can be solubilized using various agents known in the art, and the solubilized PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide can then be purified using a metal-chelating column under conditions that allow tight binding of the polypeptide.

PRO183, PRO200, PRO202, PRO364 and PRO1308 were successfully expressed in *E. coli* in a poly-His
 10 tagged form by the above procedure.

EXAMPLE 27

Expression of Nucleic Acid Encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 in

Mammalian Cells

15 This Example illustrates preparation of a potentially glycosylated form of PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 by recombinant expression in mammalian cells.

The vector, pRK5 (see, EP 307,247, published March 15, 1989), is employed as the expression vector. Optionally, the PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308,
 20 PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 DNA is ligated into pRK5 with selected restriction enzymes to allow insertion of the DNA encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 using ligation methods such as described in Sambrook *et al.*, *supra*. The resulting vector is called pRK5-(DNA encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710).

In one embodiment, the selected host cells are 293 cells. Human 293 cells (ATCC CCL 1573) are grown to confluence in tissue culture plates in medium such as DMEM supplemented with fetal calf serum and optionally, nutrient components and/or antibiotics. About 10 μ g DNA of pRK5-(DNA encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710) is mixed with about 1 μ g DNA encoding the VA RNA gene (Thimmapaya *et al.*,
 30 Cell, 71: 543 (1982)) and dissolved in 500 μ l of 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.227 M CaCl₂. To this mixture is added, dropwise, 500 μ l of 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM NaPO₄, and a precipitate is allowed to form for 10 minutes at 25°C. The precipitate is suspended and added to the 293 cells and allowed to settle for about four hours at 37°C. The culture medium is aspirated off and 2 ml of 20% glycerol in PBS is added for 30 seconds. The 293 cells are then washed with serum-free medium, fresh medium is added, and the cells are
 35 incubated for about 5 days.

Approximately 24 hours after the transfections, the culture medium is removed and replaced with culture

WO 00/73445

PCT/US00/13705

- medium (alone) or culture medium containing 200 μ Ci/ml ^{35} S-cysteine and 200 μ Ci/ml ^{35} S-methionine. After a 12-hour incubation, the conditioned medium is collected, concentrated on a spin filter, and loaded onto a 15% SDS gel. The processed gel may be dried and exposed to film for a selected period of time to reveal the presence of the PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide. The cultures containing transfected cells may undergo further incubation (in serum-free medium) and the medium is tested in selected bioassays.
- In an alternative technique, the gene encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 may be introduced into 293 cells transiently using the dextran sulfate method described by Sompayrac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 12: 7575 (1981). 293 cells are grown to maximal density in a spinner flask and 700 μ g pRK5-(DNA encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710) is added. The cells are first concentrated from the spinner flask by centrifugation and washed with PBS. The DNA-dextran precipitate is incubated on the cell pellet for four hours. The cells are treated with 20% glycerol for 90 seconds, washed with tissue culture medium, and re-introduced into the spinner flask containing tissue culture medium, 5 μ g/ml bovine insulin, and 0.1 μ g/ml bovine transferrin. After about four days, the conditioned media is centrifuged and filtered to remove cells and debris. The sample containing the expressed gene encoding the PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide can then be concentrated and purified by any selected method, such as dialysis and/or column chromatography.
- In another embodiment, the gene encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 can be expressed in CHO cells. The pRK5-(DNA encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710) nucleic acid can be transfected into CHO cells using known reagents such as CaPO_4 or DEAE dextran. As described above, the cell cultures can be incubated, and the medium replaced with culture medium (alone) or medium containing a radiolabel such as ^{35} S-methionine. After determining the presence of the PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide, the culture medium may be replaced with serum-free medium. Preferably, the cultures are incubated for about 6 days, and then the conditioned medium is harvested. The medium containing the expressed PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 can then be concentrated and purified by any selected method.
- Epitope-tagged gene encoding the PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide may also be expressed in host CHO cells. The gene encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 may be subcloned out of the pRK5 vector. The subclone insert can undergo PCR

WO 00/73445

PCT/US00/13785

- amplification to fuse in frame with a selected epitope tag such as a poly-His tag into a baculovirus expression vector. The gene insert encoding the poly His-tagged-[PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710] can then be subcloned into a SV40 driven vector containing a selection marker such as DHFR for selection of stable clones. Finally, the CHO cells can be transfected (as described above) with the SV40-driven vector. Labeling may be performed, as described above, to verify expression. The culture medium containing the expressed gene encoding the poly His-tagged-[PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710] can then be concentrated and purified by any selected method, such as by Ni²⁺-chelate affinity chromatography.
- PRO175, PRO198, PRO200, PRO202, PRO356, PRO364, PRO535, PRO861, PRO1304 and PRO1308 were stably expressed in CHO cells by the above described method. In addition, PRO356, PRO364, PRO535 and PRO861 were expressed in CHO cells by a transient procedure.

EXAMPLE 28

- Expression of Nucleic Acid Encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 in Yeast

- The following method describes recombinant expression of the gene encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 in yeast.

- First, yeast expression vectors are constructed for intracellular production or secretion of PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 from the ADH2/GAPDH promoter. DNA encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 and the promoter is inserted into suitable restriction enzyme sites in the selected plasmid to direct intracellular expression of the gene encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710. For secretion, DNA encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 can be cloned into the selected plasmid, together with DNA encoding the ADH2/GAPDH promoter, a native PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 signal peptide or other mammalian signal peptide, or, for example, a yeast alpha-factor or invertase secretory signal/leader sequence, and linker sequences (if needed) for expression of the gene encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710.

Yeast cells, such as yeast strain AB110, can then be transformed with the expression plasmids described above and cultured in selected fermentation media. The transformed yeast supernatants can be analyzed by precipitation with 10% trichloroacetic acid and separation by SDS-PAGE, followed by staining of the gels with Coomassie Blue

WO 00/73445

PCT/US00/13705

stain.

Recombinant PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 can subsequently be isolated and purified by removing the yeast cells from the fermentation medium by centrifugation and then concentrating the medium using selected cartridge filters. The concentrate containing PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 may further be purified using selected column chromatography resins.

EXAMPLE 29

Expression of Nucleic Acid Encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 in Baculovirus-Infected Insect Cells

The following method describes recombinant expression in Baculovirus-infected insect cells.

The sequence coding for PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 is fused upstream of an epitope tag contained within a baculovirus expression vector. Such epitope tags include poly-His tags and immunoglobulin tags (like Fc regions of IgG). A variety of plasmids may be employed, including plasmids derived from commercially available plasmids such as pVL1393 (Novagen). Briefly, the sequence encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 or the desired portion of the coding sequence of PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 [such as the sequence encoding the extracellular domain of a transmembrane protein or the sequence encoding the mature protein if the protein is extracellular] is amplified by PCR with primers complementary to the 5' and 3' regions. The 5' primer may incorporate flanking (selected) restriction enzyme sites. The product is then digested with those selected restriction enzymes and subcloned into the expression vector.

Recombinant baculovirus is generated by co-transfecting the above plasmid and BaculoGold™ virus DNA (PharMingen) into *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") cells (ATCC CRL 1711) using lipofectin (commercially available from GIBCO-BRL). After 4 - 5 days of incubation at 28°C, the released viruses are harvested and used for further amplifications. Viral infection and protein expression are performed as described by O'Reilly *et al.*, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual (Oxford: Oxford University Press (1994)).

Expressed poly-His tagged-[PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710] can then be purified, for example, by Ni²⁺-chelate affinity chromatography as follows. Extracts are prepared from recombinant virus-infected Sf9 cells as described by Rupert *et al.*, Nature, 362:175-179 (1993). Briefly, Sf9 cells are washed, resuspended in sonication buffer (25 ml Hepes, pH 7.9; 12.5 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA; 10% glycerol; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl), and sonicated twice for 20 seconds on ice. The sonicates are cleared by centrifugation, and the supernatant is diluted 50-fold in loading buffer (50 mM phosphate, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 7.8) and

WO 00/73445

PCT/U500/13705

- filtered through a 0.45 µm filter. A Ni²⁺-NTA agarose column (commercially available from Qiagen) is prepared with a bed volume of 5 ml, washed with 25 ml of water and equilibrated with 25 ml of loading buffer. The filtered cell extract is loaded onto the column at 0.5 ml per minute. The column is washed to baseline A₂₈₀ with loading buffer, at which point fraction collection is started. Next, the column is washed with a secondary wash buffer (50 mM phosphate, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 6.0), which elutes non-specifically-bound protein. After reaching A₂₈₀ baseline again, the column is developed with a 0 to 500 mM imidazole gradient in the secondary wash buffer. One ml fractions are collected and analyzed by SDS-PAGE and silver staining or Western blot with Ni²⁺-NTA-conjugated to alkaline phosphatase (Qiagen). Fractions containing the eluted His₆-tagged-[PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710], respectively, are pooled and dialyzed against loading buffer.
- Alternatively, purification of the IgG-tagged (or Fe tagged)-[PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710] can be performed using known chromatography techniques, including for instance, Protein A or protein G column chromatography.
- While expression was actually performed in a 0.5-2 L scale, it can be readily scaled up for larger (e.g., 8 L) preparations. The proteins are expressed as an IgG construct (immunoadhesin), in which the protein extracellular region is fused to an IgG1 constant region sequence containing the hinge, CH2 and CH3 domains and/or in poly-His tagged forms.
- Following PCR amplification, the respective coding sequences are subcloned into a baculovirus expression vector (pb.PH.IgG for IgG fusions and pb.PH.His.c for poly-His tagged proteins), and the vector and Baculogold® baculovirus DNA (Pharmingen) are co-transfected into 105 *Spodoptera frugiperda* ("SF9") cells (ATCC: CRL 1711), using Lipofectin (Gibco BRL). pb.PH.IgG and pb.PH.His are modifications of the commercially available baculovirus expression vector pVL1393 (Pharmingen), with modified polylinker regions to include the His or Fe tag sequences. The cells are grown in Hink's TNM-FH medium supplemented with 10% FBS (Hyclone). Cells are incubated for 5 days at 28°C. The supernatant is harvested and subsequently used for the first viral amplification by infecting SF9 cells in Hink's TNM-FH medium supplemented with 10% FBS at an approximate multiplicity of infection (MOI) of 10. Cells are incubated for 3 days at 28°C. The supernatant is harvested and the expression of the constructs in the baculovirus expression vector is determined by batch binding of 1 ml of supernatant to 25 ml of Ni²⁺-NTA beads (QIAGEN) for histidine tagged proteins or Protein-A Sepharose CL-4B beads (Pharmacia) for IgG tagged proteins followed by SDS-PAGE analysis comparing to a known concentration of protein standard by Coomassie blue staining.
- The first viral amplification supernatant is used to infect a spinner culture (500 ml) of SF9 cells grown in ESF-921 medium (Expression Systems L.C.) at an approximate MOI of 0.1. Cells are incubated for 3 days at 28°C. The supernatant is harvested and filtered. Batch binding and SDS-PAGE analysis are repeated, as necessary, until expression of the spinner culture is confirmed.
- The conditioned medium from the transfected cells (0.5 to 3 L) is harvested by centrifugation to remove the cells and filtered through 0.22 micron filters. For the poly-His tagged constructs, the protein construct is purified using a Ni²⁺-NTA column (Qiagen). Before purification, imidazole is added to the conditioned media to a

WO 00/73445

PCT/US00/13705

concentration of 5 mM. The conditioned media is pumped onto a 6 ml Ni²⁺-NTA column equilibrated in 20 mM Hepes, pH 7.4, buffer containing 0.3 M NaCl and 5 mM imidazole at a flow rate of 4-5 ml/min. at 4°C. After loading, the column is washed with additional equilibration buffer and the protein eluted with equilibration buffer containing 0.25 M imidazole. The highly purified protein is subsequently desalted into a storage buffer containing 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl and 4% mannitol, pH 6.8, with a 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) column and stored at -80°C.

Immunoadhesin (Fc containing) constructs of proteins are purified from the conditioned media as follows. The conditioned media is pumped onto a 5 ml Protein A column (Pharmacia) which has been equilibrated in 20 mM Na phosphate buffer, pH 6.8. After loading, the column is washed extensively with equilibration buffer before elution with 100 mM citric acid, pH 3.5. The eluted protein is immediately neutralized by collecting 1 ml fractions into tubes containing 275 ml of 1 M Tris buffer, pH 9. The highly purified protein is subsequently desalted into storage buffer as described above for the poly-His tagged proteins. The homogeneity of the proteins is verified by SDS polyacrylamide gel (PAGE) electrophoresis and N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation.

PRO175, PRO183 and PRO189 were successfully expressed in Baculovirus-infected insect Sf9 cells by the above procedure.

Alternatively, a modified baculovirus procedure may be used incorporating high-5 cells. In this procedure, the DNA encoding the desired sequence is amplified with suitable systems, such as Pfu (Stratagene), or fused upstream (5'-of) of an epitope tag contained with a baculovirus expression vector. Such epitope tags include poly-His tags and immunoglobulin tags (like Fc regions of IgG). A variety of plasmids may be employed, including plasmids derived from commercially available plasmids such as pIE1-1 (Novagen). The pIE1-1 and pIE1-2 vectors are designed for constitutive expression of recombinant proteins from the baculovirus *ie1* promoter in stably-transformed insect cells. The plasmids differ only in the orientation of the multiple cloning sites and contain all promoter sequences known to be important for *ie1*-mediated gene expression in uninfected insect cells as well as the h5 enhancer element. pIE1-1 and pIE1-2 include the translation initiation site and can be used to produce fusion proteins. Briefly, the desired sequence or the desired portion of the sequence (such as the sequence encoding the extracellular domain of a transmembrane protein) is amplified by PCR with primers complementary to the 5' and 3' regions. The 5' primer may incorporate flanking (selected) restriction enzyme sites. The product is then digested with those selected restriction enzymes and subcloned into the expression vector. For example, derivatives of pIE1-1 can include the Fc region of human IgG (pb.PH.IgG) or an 8 histidine (pb.PH.His) tag downstream (3'-of) the desired sequence. Preferably, the vector construct is sequenced for confirmation.

High-5 cells are grown to a confluency of 50% under the conditions of, 27°C, no CO₂, NO pen/strep. For each 150 mm plate, 30 µg of pIE based vector containing the sequence is mixed with 1 ml Ex-Cell medium (Media: Ex-Cell 401 + 1/100 L-Glu JRH Biosciences #14401-78P (note: this media is light sensitive)), and in a separate tube, 100 µl of Cellfectin (Cellfectin (GibcoBRL #10362-010) (vortexed to mix)) is mixed with 1 ml of Ex-Cell medium. The two solutions are combined and allowed to incubate at room temperature for 15 minutes. 8 ml of Ex-Cell media is added to the 2 ml of DNA/Cellfectin mix and this is layered on high-5 cells that have been washed once with Ex-Cell media. The plate is then incubated in darkness for 1 hour at room temperature. The DNA/Cellfectin mix is then aspirated, and the cells are washed once with Ex-Cell to remove excess

WO 00/73445

PCT/US00/13705

CellFECTIN. 30 ml of fresh Ex-Cell media is added and the cells are incubated for 3 days at 28°C. The supernatant is harvested and the expression of the sequence in the baculovirus expression vector is determined by batch binding of 1 ml of supernatant to 25 ml of Ni²⁺-NTA beads (QIAGEN) for histidine tagged proteins or Protein-A Sepharose CL-4B beads (Pharmacia) for IgG tagged proteins followed by SDS-PAGE analysis comparing to a known concentration of protein standard by Coomassie blue staining.

The conditioned media from the transfected cells (0.5 to 3 L) is harvested by centrifugation to remove the cells and filtered through 0.22 micron filters. For the poly-His tagged constructs, the protein comprising the sequence is purified using a Ni²⁺-NTA column (QIAGEN). Before purification, imidazole is added to the conditioned media to a concentration of 5 mM. The conditioned media is pumped onto a 6 ml Ni²⁺-NTA column equilibrated in 20 mM Hepes, pH 7.4, buffer containing 0.3 M NaCl and 5 mM imidazole at a flow rate of 4-5 ml/min. at 48°C. After loading, the column is washed with additional equilibration buffer and the protein eluted with equilibration buffer containing 0.25 M imidazole. The highly purified protein is then subsequently desalted into a storage buffer containing 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl and 4% mannitol, pH 6.8, with a 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) column and stored at -80°C.

Immunoadhesion (Fc containing) constructs of proteins are purified from the conditioned media as follows. The conditioned media is pumped onto a 5 ml Protein A column (Pharmacia) which has been equilibrated in 20 mM Na phosphate buffer, pH 6.8. After loading, the column is washed extensively with equilibration buffer before elution with 100 mM citric acid, pH 3.5. The eluted protein is immediately neutralized by collecting 1 ml fractions into tubes containing 275 ml of 1 M Tris buffer, pH 9. The highly purified protein is subsequently desalted into storage buffer as described above for the poly-His tagged proteins. The homogeneity of the sequence is assessed by SDS polyacrylamide gels and by N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation and other analytical procedures as desired or necessary.

PRO175, PRO183, PRO198, PRO200, PRO202, PRO356, PRO364, PRO535, PRO819, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882, PRO1002, PRO1304 and PRO1308 were expressed in high 5 cells by the above described method.

EXAMPLE 30

Preparation of Antibodies that Bind PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710

This Example illustrates preparation of monoclonal antibodies that can specifically bind PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710.

Techniques for producing the monoclonal antibodies are known in the art and are described, for instance, in Goding, *supra*. Immunogens that may be employed include purified PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 fusion proteins containing PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710, and cells expressing the gene encoding PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819,

WO 00/73445

PCT/US00/13705

PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 on the cell surface. Selection of the immunogen can be made by the skilled artisan without undue experimentation.

- Mice, such as Balb/c, are immunized with the PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710
- 5 immunogen emulsified in complete Freund's adjuvant and injected subcutaneously or intraperitoneally in an amount from 1 to 100 micrograms. Alternatively, the immunogen is emulsified in MPL-TDM adjuvant (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) and injected into the animal's hind foot pads. The immunized mice are then boosted 10 to 12 days later with additional immunogen emulsified in the selected adjuvant. Thereafter, for
- 10 several weeks, the mice may also be boosted with additional immunization injections. Serum samples may be periodically obtained from the mice by retro-orbital bleeding for testing in ELISA assays to detect anti-PRO175, anti-PRO200, anti-PRO198, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO535, anti-PRO819, anti-PRO1002, anti-PRO1308, anti-PRO1304, anti-PRO183, anti-PRO202, anti-PRO861, anti-PRO877, anti-PRO879, anti-PRO882 or anti-PRO1710 antibodies.

- After a suitable antibody titer has been detected, the animals "positive" for antibodies can be injected with a
- 15 final intravenous injection of PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710. Three to four days later, the mice are sacrificed and the spleen cells are harvested. The spleen cells are then fused (using 35% polyethylene glycol) to a selected murine myeloma cell line such as P3X63AgU.1, available from ATCC, No. CRL 1597. The fusions generate hybridoma cells that can then be plated in 96-well tissue culture plates containing HAT
- 20 medium to inhibit proliferation of non-fused cells, myeloma hybrids, and spleen cell hybrids.

- The hybridoma cells will be screened in an ELISA for reactivity against PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710. Determination of "positive" hybridoma cells secreting the desired monoclonal
- 25 antibodies against PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 is within the skill in the art.

- The positive hybridoma cells can be injected intraperitoneally into syngeneic Balb/c mice to produce ascites containing the anti-PRO175, anti-PRO200, anti-PRO198, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO535, anti-PRO819, anti-PRO1002, anti-PRO1308, anti-PRO1304, anti-PRO183, anti-PRO202, anti-PRO861, anti-PRO877, anti-PRO879, anti-PRO882 or anti-PRO1710 monoclonal antibodies. Alternatively, the hybridoma cells can be grown
- 30 in tissue-culture flasks or roller bottles. Purification of the monoclonal antibodies produced in the ascites can be accomplished using ammonium-sulfate precipitation, followed by gel-exclusion chromatography. Alternatively, affinity chromatography based upon binding of antibody to protein A or protein G can be employed.

Deposit of Material

- The following material(s) has/have been deposited with the American Type Culture Collection, 10801
- 35 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

<u>Material</u>	<u>ATCC Dep. No.</u>	<u>Deposit Date</u>
DNA19355-1150-1	209466	November 18, 1997

WO 00/73445

PCT/US00/13705

	DNA29101-1122	209653	March 5, 1998
	DNA33457-1078	209283	September 18, 1997
	DNA47365-1206	209436	November 7, 1997
	DNA47470-1130-P1	209422	October 28, 1997
5	DNA49143-1429	203013	June 23, 1998
	DNA57695-1340	203006	June 23, 1998
	DNA59208-1373	209881	May 20, 1998
	DNA62306-1570	203254	September 9, 1998
	DNA65406-1567	203219	September 15, 1998

- 10 This deposit was made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty). This assures maintenance of a viable culture of the deposit for 30 years from the date of deposit. The deposit will be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an agreement between Genentech, Inc., and ATCC, which assures permanent and unrestricted availability of the progeny of the culture of the deposit to the public upon issuance of the pertinent U.S. patent or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures availability of the progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto according to 35 USC §122 and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 CFR §1.14 with particular reference to 886 OG 638).

- 15 The assignee of the present application has agreed that if a culture of the material(s) on deposit should die or be lost or destroyed when cultivated under suitable conditions, the material(s) will be promptly replaced on notification with another of the same. Availability of the deposited material(s) is not to be construed as a license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

- 20 The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. The present invention is not to be limited in scope by the construct(s) deposited, since the deposited embodiment(s) is/are intended as single illustration(s) of certain aspects of the invention and any constructs that are functionally equivalent are within the scope of this invention. The deposit of material(s) herein does not constitute an admission that the written description herein contained is inadequate to enable the practice of any aspect of the invention, including the best mode thereof, nor is it to be construed as limiting the scope of the claims to the specific illustrations that it represents. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A composition comprising a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide or agonist or antagonist thereof, in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier.
2. The composition of Claim 1 comprising a therapeutically effective amount of said polypeptide or said agonist or antagonist thereof.
3. The composition of Claim 1, wherein the agonist is an anti-PRO175, anti-PRO200, anti-PRO198, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO535, anti-PRO819, anti-PRO1002, anti-PRO1308, anti-PRO1304, anti-PRO183, anti-PRO202, anti-PRO861, anti-PRO877, anti-PRO879, anti-PRO882 or anti-PRO1710 antibody.
4. The composition of Claim 1, wherein the antagonist is an anti-PRO175, anti-PRO200, anti-PRO198, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO535, anti-PRO819, anti-PRO1002, anti-PRO1308, anti-PRO1304, anti-PRO183, anti-PRO202, anti-PRO861, anti-PRO877, anti-PRO879, anti-PRO882 or anti-PRO1710 antibody.
5. The composition of Claim 1 further comprising a cardiovascular, endothelial, angiogenic or angiostatic agent.
6. A method of preparing the composition of Claim 1 comprising admixing a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide or agonist or antagonist thereof, with a pharmaceutically acceptable carrier.
7. An article of manufacture comprising:
 - (1) a composition comprising (a) a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide, (b) an agonist of a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide, or (c) an antagonist of a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide, in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier;
 - (2) a container containing said composition; and
 - (3) a label affixed to said container, or a package insert included in said container, referring to the use of said composition, in the treatment of a cardiovascular, endothelial, and angiogenic disorder.
8. The article of manufacture of Claim 7, wherein said agonist is an anti-PRO175, anti-PRO200, anti-PRO198, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO535, anti-PRO819, anti-PRO1002, anti-PRO1308, anti-PRO1304,

WO 00/73445

PCT/US00/13705

anti-PRO183, anti-PRO202, anti-PRO861, anti-PRO877, anti-PRO879, anti-PRO882 or anti-PRO1710 antibody.

9. The article of manufacture of Claim 7, wherein said antagonist is an anti-PRO175, anti-PRO200, anti-PRO198, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO535, anti-PRO819, anti-PRO1002, anti-PRO1308, anti-PRO1304, anti-PRO183, anti-PRO202, anti-PRO861, anti-PRO877, anti-PRO879, anti-PRO882 or anti-PRO1710 antibody.

10. The article of manufacture of Claim 7, wherein said composition comprises a therapeutically effective amount of said polypeptide or agonist or antagonist thereof, in admixture with said pharmaceutically acceptable carrier.

11. A method for identifying an agonist of a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide comprising:

(a) contacting cells and a test compound to be screened under conditions suitable for the induction of a cellular response normally induced by a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide; and

(b) determining the induction of said cellular response to determine if the test compound is an effective agonist, wherein the induction of said cellular response is indicative of said test compound being an effective agonist.

12. The method of Claim 11, wherein the cellular response normally induced by said polypeptide is stimulation of cell proliferation.

13. A method for identifying a compound that inhibits an activity of a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide comprising contacting a test compound with said polypeptide under conditions and for a time sufficient to allow the test compound and polypeptide to interact and determining whether the activity of said polypeptide is inhibited.

14. A method for identifying a compound that inhibits an activity of a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide comprising the steps of:

(a) contacting cells and a test compound to be screened in the presence of said polypeptide under conditions suitable for the induction of a cellular response normally induced by said polypeptide; and

(b) determining the induction of said cellular response to determine if the test compound is an effective antagonist.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

15. The method of Claim 14, wherein the cellular response normally induced by said polypeptide is stimulation of cell proliferation.

16. A method for identifying a compound that inhibits the expression of a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide in cells that normally expresses the polypeptide, wherein the method comprises contacting the cells with a test compound under conditions suitable for allowing expression of said polypeptide and determining whether the expression of said polypeptide is inhibited.

17. An agonist of a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide.

18. An antagonist of a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide.

19. A compound that inhibits the expression of a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide in a mammalian cell which expresses said polypeptide.

20. The compound of Claim 19, wherein said compound is an antisense oligonucleotide.

21. An isolated antibody that binds to a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide.

22. The antibody of Claim 21 which is a monoclonal antibody.

23. The antibody of Claim 21 which is an antibody fragment.

24. The antibody of Claim 21 which is a single-chain antibody.

25. A method for diagnosing a disease or susceptibility to a disease which is related to a mutation in a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide-encoding nucleic acid sequence comprising determining the presence or absence of said mutation in said polypeptide-encoding nucleic acid sequence, wherein the presence or absence of said mutation is indicative of the presence of said disease or susceptibility to said disease.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

26. A method of diagnosing a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in a mammal which comprises analyzing the level of expression of a gene encoding a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide (a) in a test sample of tissue cells obtained from said mammal, and (b) in a control sample of known normal tissue cells of the same cell type, wherein a higher or lower expression level in the test sample as compared to the control sample is indicative of the presence of a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in said mammal.

27. A method of diagnosing a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in a mammal which comprises detecting the presence or absence of a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide in a test sample of tissue cells obtained from said mammal, wherein the presence or absence of said polypeptide in said test sample is indicative of the presence of a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in said mammal.

28. A method of diagnosing a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in a mammal comprising (a) contacting an anti-PRO175, anti-PRO200, anti-PRO198, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO535, anti-PRO819, anti-PRO1002, anti-PRO1308, anti-PRO1304, anti-PRO183, anti-PRO202, anti-PRO861, anti-PRO877, anti-PRO879, anti-PRO882 or anti-PRO1710 antibody with a test sample of tissue cells obtained from the mammal, and (b) detecting the formation of a complex between said antibody and a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide in the test sample, wherein the formation of said complex is indicative of the presence of a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in the mammal.

29. A method for determining the presence of a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide in a sample comprising contacting a sample suspected of containing said polypeptide with an anti-PRO175, anti-PRO200, anti-PRO198, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO535, anti-PRO819, anti-PRO1002, anti-PRO1308, anti-PRO1304, anti-PRO183, anti-PRO202, anti-PRO861, anti-PRO877, anti-PRO879, anti-PRO882 or anti-PRO1710 antibody and determining binding of said antibody to a component of said sample.

30. A cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder diagnostic kit comprising an anti-PRO175, anti-PRO200, anti-PRO198, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO535, anti-PRO819, anti-PRO1002, anti-PRO1308, anti-PRO1304, anti-PRO183, anti-PRO202, anti-PRO861, anti-PRO877, anti-PRO879, anti-PRO882 or anti-PRO1710 antibody and a carrier in suitable packaging.

31. A method for treating a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in a mammal comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364,

WQ 00/73445

PCT/US00/13705

PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide or agonist or antagonist thereof.

32. The method according to Claim 31, wherein the mammal is human.
33. The method of Claim 32, wherein the human has suffered myocardial infarction.
34. The method of Claim 32, wherein the human has cardiac hypertrophy, trauma, a cancer, or age-related macular degeneration.
35. The method of Claim 34, wherein the cardiac hypertrophy is characterized by the presence of an elevated level of $\text{PGF}_{2\alpha}$.
36. The method of Claim 31, wherein the PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide is administered together with a cardiovascular, endothelial or angiogenic agent.
37. The method of Claim 34, wherein the PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide is administered following primary angioplasty.
38. The method of Claim 31, wherein the cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder is cancer.
39. The method of Claim 38, wherein the PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide is administered in combination with a chemotherapeutic agent, a growth inhibitory agent or a cytotoxic agent.
40. The method of Claim 31 wherein said agonist is an anti-PRO175, anti-PRO200, anti-PRO198, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO535, anti-PRO819, anti-PRO1002, anti-PRO1308, anti-PRO1304, anti-PRO183, anti-PRO202, anti-PRO861, anti-PRO877, anti-PRO879, anti-PRO882 or anti-PRO1710 antibody.
41. The method of Claim 31 wherein said antagonist is an anti-PRO175, anti-PRO200, anti-PRO198, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO535, anti-PRO819, anti-PRO1002, anti-PRO1308, anti-PRO1304, anti-PRO183, anti-PRO202, anti-PRO861, anti-PRO877, anti-PRO879, anti-PRO882 or anti-PRO1710 antibody.
42. A method for treating a cardiovascular, endothelial or angiogenic disorder in a mammal comprising administering to the mammal a nucleic acid molecule that encodes a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364,

WO 00/73445

PCT/US00/13705

PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide or agonist or antagonist thereof.

43. The method of Claim 42 wherein said agonist is an anti-PRO175, anti-PRO200, anti-PRO198, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO535, anti-PRO819, anti-PRO1002, anti-PRO1308, anti-PRO1304, anti-PRO183, anti-PRO202, anti-PRO861, anti-PRO877, anti-PRO879, anti-PRO882 or anti-PRO1710 antibody.

44. The method of Claim 42 wherein said antagonist is an anti-PRO175, anti-PRO200, anti-PRO198, anti-PRO364, anti-PRO356, anti-PRO535, anti-PRO819, anti-PRO1002, anti-PRO1308, anti-PRO1304, anti-PRO183, anti-PRO202, anti-PRO861, anti-PRO877, anti-PRO879, anti-PRO882 or anti-PRO1710 antibody.

45. The method of Claim 42, wherein the mammal is human.

46. The method of Claim 42, wherein the nucleic acid molecule is administered via *ex vivo* gene therapy.

47. A recombinant retroviral particle comprising a retroviral vector consisting essentially of (1) a promoter, (2) nucleic acid encoding a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide or agonist or antagonist thereof, and (3) a signal sequence for cellular secretion of the polypeptide, wherein the retroviral vector is in association with retroviral structural proteins.

48. An *ex vivo* producer cell comprising a nucleic acid construct that expresses retroviral structural proteins and also comprises a retroviral vector consisting essentially of a (1) promoter, (2) nucleic acid encoding a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide or agonist or antagonist thereof, and (3) a signal sequence for cellular secretion of the polypeptide, wherein said producer cell packages the retroviral vector in association with the structural proteins to produce recombinant retroviral particles.

49. A method for inhibiting endothelial cell growth in a mammal comprising administering to the mammal a PRO175, PRO183, PRO198, PRO202, PRO364, PRO535, PRO819, PRO877, PRO879, PRO1002 or PRO1304 polypeptide or agonist thereof, wherein endothelial cell growth in said mammal is inhibited.

50. A method for stimulating endothelial cell growth in a mammal comprising administering to the mammal a PRO356, PRO861, PRO1308 or PRO1710 polypeptide or agonist thereof, wherein endothelial cell growth in said mammal is stimulated.

51. A method of inhibiting endothelial cell growth in a mammal comprising administering to the mammal an antagonist of a PRO356, PRO861, PRO1308 or PRO1710 polypeptide, wherein endothelial cell growth in said

WO 00/73445

PCT/US00/13705

mammal is inhibited.

52. A method of stimulating endothelial cell growth in a mammal comprising administering to the mammal an antagonist of a PRO175, PRO183, PRO198, PRO202, PRO364, PRO535, PRO819, PRO877, PRO879, PRO1002 or PRO1304 polypeptide, wherein endothelial cell growth in said mammal is stimulated.

53. A method for inducing cardiac hypertrophy in a mammal comprising administering to the mammal a PRO183, PRO200, PRO202 or PRO882 polypeptide or agonist thereof, wherein cardiac hypertrophy in said mammal is induced.

54. A method of reducing cardiac hypertrophy in a mammal comprising administering to the mammal an antagonist of a PRO183, PRO200, PRO202 or PRO882 polypeptide, wherein cardiac hypertrophy in said mammal is reduced.

55. A method for inhibiting angiogenesis induced by a PRO861 polypeptide in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of an anti-PRO861 antibody to the mammal, wherein said angiogenesis is inhibited.

56. A method for stimulating angiogenesis induced by a PRO861 polypeptide in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of said polypeptide to the mammal, wherein said angiogenesis is stimulated.

57. A method for inhibiting angiogenesis in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of a PRO198, PRO877, PRO1002 or PRO1304 polypeptide to the mammal, wherein said angiogenesis is inhibited.

58. A method for stimulating angiogenesis in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of an anti-PRO198, anti-PRO877, anti-PRO1002 or anti-PRO1304 polypeptide to the mammal, wherein said angiogenesis is stimulated.

59. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to a nucleotide sequence that encodes an amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), and Figure 34 (SEQ ID NO:34).

WO 00/73445

PCT/US00/13705

60. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to a nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 5 (SEQ ID NO:5), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 9 (SEQ ID NO:9), Figure 11 (SEQ ID NO:11), Figure 13 (SEQ ID NO:13), Figure 15 (SEQ ID NO:15), Figure 17 (SEQ ID NO:17), Figure 19 (SEQ ID NO:19), Figure 21 (SEQ ID NO:21), Figure 23 (SEQ ID NO:23), Figure 25 (SEQ ID NO:25), Figure 27 (SEQ ID NO:27), Figure 29 (SEQ ID NO:29), Figure 31 (SEQ ID NO:31), and Figure 33 (SEQ ID NO:33).

61. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to a nucleotide sequence selected from the group consisting of the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 5 (SEQ ID NO:5), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 9 (SEQ ID NO:9), Figure 11 (SEQ ID NO:11), Figure 13 (SEQ ID NO:13), Figure 15 (SEQ ID NO:15), Figure 17 (SEQ ID NO:17), Figure 19 (SEQ ID NO:19), Figure 21 (SEQ ID NO:21), Figure 23 (SEQ ID NO:23), Figure 25 (SEQ ID NO:25), Figure 27 (SEQ ID NO:27), Figure 29 (SEQ ID NO:29), Figure 31 (SEQ ID NO:31), and Figure 33 (SEQ ID NO:33).

62. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to the full-length coding sequence of the DNA deposited under ATCC accession number 209466, 209653, 209283, 209436, 209422, 203013, 203006, 209881, 203254, or 203219.

63. A vector comprising the nucleic acid of any one of Claims 59 to 62.

64. The vector of Claim 63 operably linked to control sequences recognized by a host cell transformed with the vector.

65. A host cell comprising the vector of Claim 63.

66. The host cell of Claim 65, wherein said cell is a CHO cell.

67. The host cell of Claim 65, wherein said cell is an *E. coli*.

68. The host cell of Claim 65, wherein said cell is a yeast cell.

69. The host cell of Claim 65, wherein said cell is a Baculovirus infected insect cell.

70. A process for producing a PRO175, PRO200, PRO198, PRO364, PRO356, PRO535, PRO819, PRO1002, PRO1308, PRO1304, PRO183, PRO202, PRO861, PRO877, PRO879, PRO882 or PRO1710 polypeptide comprising culturing the host cell of Claim 65 under conditions suitable for expression of said polypeptide and recovering said polypeptide from the cell culture.

WO 00/73445

PCT/US00/13705

71. An isolated polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), and Figure 34 (SEQ ID NO:34).

72. An isolated polypeptide scoring at least 80% positives when compared to an amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), and Figure 34 (SEQ ID NO:34).

73. An isolated polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the DNA deposited under ATCC accession number 209466, 209653, 209283, 209436, 209422, 2094013, 203606, 209881, 203254, or 203219.

74. A chimeric molecule comprising a polypeptide according to any one of Claims 71 to 73 fused to a heterologous amino acid sequence.

75. The chimeric molecule of Claim 74, wherein said heterologous amino acid sequence is an epitope tag sequence.

76. The chimeric molecule of Claim 74, wherein said heterologous amino acid sequence is a Fc region of an immunoglobulin.

77. An antibody which specifically binds to a polypeptide according to any one of Claims 71 to 73.

78. The antibody of Claim 77, wherein said antibody is a monoclonal antibody, a humanized antibody or a single-chain antibody.

79. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to:

(a) a nucleotide sequence encoding the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), or Figure 34 (SEQ ID NO:34), lacking its

WO 00/73445

PCT/US00/13705

associated signal peptide:

(b) a nucleotide sequence encoding an extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), or Figure 34 (SEQ ID NO:34), with its associated signal peptide; or

(c) a nucleotide sequence encoding an extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), or Figure 34 (SEQ ID NO:34), lacking its associated signal peptide.

80. An isolated polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to:

(a) the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), or Figure 34 (SEQ ID NO:34), lacking its associated signal peptide;

(b) an extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), or Figure 34 (SEQ ID NO:34), with its associated signal peptide;

or

(c) an extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), or Figure 34 (SEQ ID NO:34), lacking its associated signal peptide.

[illegible]

WO 00/73445

PCT/US00/13705

2/34

FIGURE 2

MCLSHLENNPLSRRTQGAQRSSWXLWLFCSIVMLFLCSFEWLIFIFLQLETAKRPNKAKPGFLPRKQNM
ASSEPPCVNRYSDNKLLELLONGSLYLYGQVAPKATYNEVAFEFVRLYKTKDMIQTLINKSKIQNVGGTYEL
HVGETIDLIENSHQVTXNNTYWGILLANRQPIR

Signal peptide:	Amino acids 1-25
Transmembrane Domain:	Amino acids 26-51
Extracellular Domain:	Amino acids 52-177
N-linked glycosylation sites:	Amino acids 129-133;161-165
N-myristoylation site:	Amino acids 18-24

[illegible]

WO 00/73445

PCT/US00/13705

4/34

FIGURE 4

signal sequence: Amino acids 1-14
N-glycosylation sites: Amino acids 25-29;55-59;254-258
N-myristoylation sites: Amino acids 15-21;117-123;127-133;
281-287;282-288;319-325
Amidation site: Amino acids 229-233

MSLFGLLILTSALAGQRQGTQMSNLSSKQFSSNKBONGVODPOHERIIIVSTNGSLHGPREFHTYPRNT
VLVRRLVAEENVWICLTFFDRA:GLEDPEDDICKYDFVEVEEPSKGTILGRWCGSGTVPGKQISKGNQIRI
RFVSDRYFPRRPGFCIHYNIVMFGFTEAVSPSVLPFGALPLDLLNNAITAFSTIEDLIEYLEPERWQLDIE
DLYRFINQLLGKAPFPGKSRVVDLNLTEEVRLYSCIFNFVSIRRELKRTDTIFWPGCLLVEKCGSNC
ACCLHRCNZCQCVPKVTKKYHEVLQIRPKIGVRGLHSLIDVLEHUEECDCVCRGSTGG

FIGURE 5

[illegible]

WO 00/73445

PCT/US00/13705

6/34

FIGURE 6

MDLLWILYSLRLMLGCPACIKTORHPSCEGPELEASKVLLPSCPGNPGSPGERGAPGPGTTPGPPGKM
 GPKGEPEPRNCRELLSCGATLSGWYINLCIPKGRALPVPCDNDTEKCGWLVFORRGDGSVDFFRSWSYRAG
 FGNQSESEFWLGNENLHQLTLQGNKELRVELEDINGMRTFAHYATFRLGPMVHYQLALGKFSSEGTAGDSLS
 LUSGRDPPTYDADHDSMSNCVIVRGAWYVASCYRSNLRGYAVSEAAAIKYGTWASCRGVGRPYRRVR
 MMLR

Signal peptide: Amino acids 1-16
 N-glycosylation site: Amino acids 178-182
 Glycosaminoglycan attachment site: Amino acids 272-276
 Tyrosine kinase phosphorylation site: Amino acids 188-197
 N-myristoylation sites: Amino acids 16-22, 89-95, 144-150;
 267-273
 Fibrinogen beta and gamma chains C-terminal domain signature:
 Amino acids 242-255

WO 00/73445

PCT/US00/13705

7/34

FIGURE 7

CACGCACTTTGACCTGGGTCGGGATTTCTCAGGTCTGAAAGGTCCAGCCACCTCCGGGCAAGGGCGGTTGAG
GACGGGGACGGGGGCTGTCTCAACTGGCTGTGGGCTCTTGAACCCGAGCAATGGCACACACACGGGGCGATGG
GCGGCTTTCGGGCGCTGTGGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCT
CCGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCT
GCGCTGTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCT
TCCACTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCT
CAGGGGAAATTCAGTTTTCGGCTTCCAGTGTATCGACTGTGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCT
CCACTGTGAAACTTGGACAGACTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCT
ACCTGTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCT
GCGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCT
GTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCT
CCGAGGAGAGTCGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCT
CCCTCCTCCTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCT
CTGCTCTGAGCCCGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCTGTGGGCT
GGACCATGTGATTC

WO 00/73445

PCT/US00/13705

8/34

FIGURE 8

MAQHGAAGAPRAI/CGLALLCALSLGQSPPTGGPGCGPGRLLLTCTDARCCRVHTTRCCPDYFGERCCSEWD
QMVCQPEFHCGDFCCTTCRHHECPGGQGVQSGKFSFGTQCIDCASGTFSSGHEHCKPWTDCCTQFGFLTV
FPGNKITHNAVCPGSPPAEPLGRITVVTHAVAACVLLLTSAQLGLHINQLRSQCMNPRETQLLEVPFSTB
DARSCQPFEEERGEHSAEEKRLGDLAV

Signal sequence:	Amino acids 1-25
Potential transmembrane domain:	Amino acids 162-180
N-glycosylation site:	Amino acids 146-150
N-myristoylation sites:	Amino acids 5-11;8-14;25-31;30-36; 33-39;118-124;122-128;156-162
Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site:	Amino acids 166-177
Leucine zipper pattern:	Amino acids 171-193

FIGURE 9

[illegible]

WO 00/73445

PCT/US00/13705

10/34

FIGURE 10

ELKKPLSAVTKLCTFIVAFVSEPAWLQKLSKHKTPAOPOLKANCCEEVKELKAOVANRSLLSLNNKKQS
 RLWVSEVVMQVMELESNSKRMESRLTDAESKYSFMNQDTDTMQLQAQTVTQTSADALYDCSSLYQGNRIS
 GUYKLPPDIFLGSPELEVPFCDMETSCGGWITIQRRKSSGLVSPYRQWKQYKQGSIRGLFWLGNFPIHRLS
 RQPTRLRVFMEDWEGNLKYAPVSHFVLGNELNSVELLGNITGNVGNIALQVHNNTAFETKDKDDQDCIDK
 CAQIDRKGYYVNCCTDSNLNAYYSKLGSHNHLDGITTWVGWGGSTYSLKRVEMKLTPEDFK

N-glycosylation sites: Amino acids 58-62;253-257;267-271

Glycosaminoglycan attachment site: Amino acids 167-171

cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site:
Amino acids 176-180

N-myristoylation sites: Amino acids 168-174;196-202;241-247;
252-258;256-262;327-333

Cell attachment sequence: Amino acids 199-202

Signal sequence: Amino acids 1-26

FIGURE 11

FIGURE 11

[illegible]

WO 00/73445

PCT/US00/13705

12/34

FIGURE 12

MTIRPSLELPKILLILLLLSAAVCRNAGSLTESPVRTLQVETLVEPPPEFCABPAAPCDTLFHHYTGSLVIG
RIIDTSITRDPINVTESGCKDVIPOLEQSLLDNVYSGKKKALIPSHLAYGKRGFPSPVPADAVVOYDVLLIA
LIRANYMLKLVKSLPIAKTAMVPALLGLCYHLVKKANRPVSKKKLNEKKRKKSKKK

Signal peptide:	Amino acids 1-25
Transmembrane domain:	Amino acids 155-174
N-glycosylation site:	Amino acids 196-200
N-myristoylation site:	Amino acids 95-101
Amidation site:	Amino acids 119-123
FKBP-type peptidyl-prolyl <i>cis</i> - <i>trans</i> isomerase signature 1:	Amino acids 62-78; 87-124; 128-142

WO 00/73445

PCT/US00/13705

13/34

FIGURE 13

CAGTTCCTGAATCAATGGAGTTAATTTAGGGGAATACAAACAGCCATGCGGGGTGGAGATTGCTTTGCGG
AGTGAATCTCACTGCTCTCTCTCTGGGAGCAGGAGCTCTCCGAGTTGTTCTCTCCAGCCAGTTCCTAA
CTCAGGAGACAGGTCCCAAGGCCATGGGAGACCTCTCTCTCTGGGCTTGGCGGCCACTCATGAGAGTGT
TGCTGAAGATATTCTTTAGGAATACGTGTGACTTCTCTCTCTGATTAAATAACCATCTCTTGGGAAGCTTATGA
GGCTTTAGGGGAATGTCACCTCTAAATTTCTGTAACTAGATGGCTTCCATTTACCCACACTATTGTA
AGGTCCCTTTATTTTAGGCTCAAGGTTCAATTTGACTTGAGAAAGTGGCTTCTGAGCTTCATTTGATTTT
GTTTATCTTCACTATTAAITGTAAAGATTAAAAAGGAATAGGAGCAGCGAGACTCTAGGAGAAATATTTA
TCCCTGGGTGCGCTGACACTTTATGTAGTATCCGACAAATGCTGATTGTTAATTAAATGTTATTTCTAA
TATTAGTACATTCAGTCTGTGATGTAATAGAAATAGCCAGAACTCATTTCTTAAAGTTTGGAGTATTTT
TCACCTAGATTTTGTATAGAAAGACTGAATAGTGTG

WO 00/73445

PCT/US00/13705

14/34

FIGURE 14

MSVEIAPASVILTCLELLAAGVSGVLLQPVPTQETGPKMGCLSCCFAGHS

Signal peptide: Amino acids 1-24

N-myristoylation site: Amino acids 2-8

Homologous region to Ig light chain: Amino acids 5-33

WO 00/73445

PCT/US00/13705

15/34

FIGURE 15

TCTCAGACTCTTGGAGGGGCTATCTAGACACACAAAGACAGCCCTAAGAGGACGGTGGAGTASTGTCC
TGGCTANAGACAGTAGATATGCAAGCCCTCTTGTCTCTGCCCCCTTCTCCTGCTGGGAACAGTTCTGCTC
TTCATCTGGAGATGATGCCCCCATCTGGAGAGCCTAGAGACACAGCCAGACCTAGGCCAGGATCTGGAT
ACTTCANNGGAGCAGGAGAGACACTTGGCTCTGACCGGAGGAGGTGATTGAGGCAGTAGGGAGGAGGTCAA
GGCTTCTGCTGTCAAGACAACTTTGAGGATGAGGAAAGCCATGGAGTGGGACCCACCTGCCCTAGACAAAG
ACTTCCAGTGGCCCGAGGAGAGACATTTGTAAGTGGCGGGAAGTCCAGAGTGCAGACCTTGGCTAC
CTATGGTGCGGACTCTTAACCTTTTGCAGAGCTCAGGATGTTCTCCAGCAGATGCTACGGAGGCCAACC
TGCTCTATCCATGACTTCAACTTCAACTATCGATTCAGTGTCTGACTAGGACAGTCAACCAAGCCGAGG
TCTGGATTGGAGGCAACTCTCAGGGGCTGGTTCTGTGGGAAGGGTTTGTGGACTGATGGGAGCCAGTGG
AATTTGCTTACTGCTCCCGGCAACCTGGGGAATGGGCAAGGCTCTCTGTGCGCCCTATGCAACCAAGG
AGGTTATTGGGACGAUCTCAATGCAACAGCACTGCCCTTCGCTGCTCTTCTAAGCCAGCCGACAGG
AGACCTTGCCAGCAGCTCCCTCCCGTCCCCCAACTCTCTGCTCATAAATCCAGACTTGTCAACGCAAAA
AAAAAAAAAAAA

WQ 00/73445

PCT/US00/13705

16/34

FIGURE 16

MQRLLLLPPIALLGTVSALHLENDAPHLESLETTQADLGCOLUSSXEQERDLALTRFVIQREGSEVYASACQV
NFEDEEMESDPAALDRDFQCPRERTIVEVCGSPRCKTCRILLVRTPKITFAEAQNVCSRKYGSLVSIHDF
NFMFRIQCCTSTVNGAQVWIGSLRGWFWKRFQWTDGSHWHPAYWSPGQPCNGQSSQVALCTKGGYWRRA
QCDRQLFVCSF

Signal peptide:	Amino acids 1-17
N-myristoylation sites:	Amino acids 13-19;103-109;134-140; 164-170;180-186;191-197;194-200; 196-202;198-204
C-type lectin domain signature:	Amino acids 200-224

PCT/US00/13705

FIGURE 17

[illegible]

WO 00/73445

PCT/US00/13705

18/34

FIGURE 18

MEHGAPGPIWPLPRGALANAVGFVSSMSGNRPAGGVVWLOCGGEATCSLVLQCDVTRAECCASGNIDTAW
SNLTHPGNKINLLGFLGTAHCLDCKDSCLGVECGPGKACRMILGGRPRCECAPIACSGLPARLQVCCSDGATY
RDECELRARCRKHFPCLSMVYRGRCKSCRHVVCPREQSCVVDQTSANCVVCRAAPCPVPSSPGQELCGN
NNVTYISSCHMRQATCFIGRSLGVRJIAGSCAGTPEEDTCGESABEEENFV

Signal peptide:	Amino acids 1-20
N-glycosylation sites:	Amino acids 73-77;215-219
Osteonectin domain proteins:	Amino acids 97-130;169-202

[illegible]

WO 00/73445

PCT/US00/13705

20/34

FIGURE 20

NPKTMHFLRFRPIVFFYLWGLFTACROKKKEESTEEVXIIEVLHRRPENQSKTKKGDLLNANHVDGYLAKDSSRF
YCSRTQNECHPKWFLVGVGVIRGLDIAMTDMCFSEKRRKVVIIPSPAYGKESYALGKIPEDATLIFEIELY
AVIKGPRESTETFKQIDMDNDRQLSKAEINLYLQRFEEKDEKPRDKSYGDAVLEDFKKWHDGCHGPISPKE
YNVYQHDEL

Endoplasmic reticulum targeting sequence:	Amino acids 219-224
N-glycosylation site:	Amino acids 45-49
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase:	Amino acids 87-124; 129-143
EF-hand calcium binding domain proteins:	Amino acids 202-215; 195-215
Tyrosine kinase phosphorylation site:	Amino acids 183-190
N-myristoylation sites:	Amino acids 19-25; 85-101

PCT/US00/13705

21/34

FIGURE 21

[illegible]

WO 00/73445

PCT/US00/13705

22/34

FIGURE 22

NAAATAGGILIPQKRRQAREFEKSNACKCVSSPGRKGTSCDKNKLNVFSRVKLPFGSKKKRRRRPPEPOLKGIYT
 KLYSTQCYLLOLQAGPTIOCTKDEDSTYTLNLIFFVSLRVVATQGVQTKLYLAMNSGGYLYTSELFTPECK
 FKSSVFENYYVTYSSGHIYRQOQSSGRGKYLGLNKGGEINKGHHVKKKKDAAHFLFKPLKVAMYEPESLHDLT
 EFSRSCSTPTTKSRSVSGVLNKGKSMHNEST

N-glycosylation site:	Amino acids 242-246
Glycosaminoglycan attachment sites:	Amino acids 165-169, 216-222
Tyrosine kinase phosphorylation site:	Amino acids 93-100
N-myristoylation sites:	Amino acids 67-93, 231-237
ATP/GTP-binding site motif A (P-loop):	Amino acids 231-239
HBGF/FGF family proteins:	Amino acids 78-94, 102-153

WO 00/73445

PCT/US00/13705

23/34

FIGURE 23

CAGCGCTGACTGCGCCGCGGAGAAAGCCAGTGGGAACCCGACCCATAGCAGACCCGCGTCCCGCTCGGC
CTGGCCAGGSCCCGCGCTATGGAGTTCTCTGGGCCCCCTCCCTGGGCTCTGAGCTGCACTCTGGCCGCTG
TCACCGCCACACCGCTCTTCTGGGACAGTTCGAATCCCAAGTCCCGGAATGAGGACTACACCTATACATGTGC
AGCTGAATGACTACGTGGACATCATCTGTCCGCACTATGAAGATCACTCTGTGGCAGACGCTGCCATGGAG
CAGTACATCTGTACCTGGTGGAGCATGAGGACTACCGAGCTGTGCCAGCCCGAGTCCGAGGACCAAGTCCG
CTGGCAGTGCACCCGCGCCAGTGGCAAGCATGGCCCGGAGAGGTGTCTGAGAAGTTCCAGCGCTTCACAC
CTTTCACCCCTGGCCAAAGCACTTCAAGAAGGACACAGCTACTACTACATCTCCAAACCATCCACCGCAT
GAAGACCGCTGCTTGAGGTTGAGGTGACTGTCAGTGGCAAAATCACTCACAAGTCCCTCAGGCCCATGACAAT
CCACAGGAGAGAGACTTGCAGCAGATGACCCAGAGGTTCGGGTCTCTACTAGCATCGGTACAGTGTCTGC
CCACCGCTCTTCCCACTTGGCTGGACTGTGTCTCTTCCACTCTGTGTGTGTGCAAAACCCCGTGAAGGT
GTGTGCCACACTGGCCCTTAAAGAGGGGACAGGCTGAAGAGAGGGGACAGCCACTCCAAACCTGTCTTGGGTC
CACTTTAGAGGCCCCGAGCTCTGGGACCACTCCCACTCAGGCATAAGCTATCAGCTAGCAGCCCTCAAAA
CGGTCAATATTAGGTTTTCAACCGGAGAGAGGCCAACAGCCGACAGTCCCATCCCACTTCACTC
GGAGGGATGGAGAAAGAGCTGAGACACTCTTCCCACTTCTGTCTTAAAGCTAAGAAACAGCTG
TGCAGGCAATGCTCCCTTAAGGCACTGTGGAGCTGAGCTGGAGGGGACAGTGGATCCCAAACTTGTG
AAACATGCCCTCTCAGGAGAGAGCCAGGATGCCAGATGACTGACTGAGGAAAGCAAGAAACAGTTT
CTTGTCTGGAAGCCAGGTACAGGAGAGGAGCATGCTTGGCTGACCCAGCATCTCCAGCAGAGACCTCAT
CTGTGAGATGCCACAGAAAGTTTGTAGCCAGTACTGCACTCTCTCCCATCTGGGGCAGCACTCCCA
GAGCTGTGCGCAGGAGGGGCTGTGCCAACCTGTTCTTAGAGTCTAGCTGTAGGGGAGTGGCCATGTGT
CATTTCTGCTAGAGTGTAGCTTAAAGGGCAGGCCCACTGTATAGTATCTGTATATAGTTGCTGTGTG
CTGTCTGATTTCTACAACTGGAGTTTTTTATACAACTCTCTTTGTCTCAAAATAAGCAATGTGTTTT
TCGG

WQ 00/73445

PCT/US00/13705

24/34

FIGURE 24

MEFLWAPLLGLCCSLAAADRHVFRNSSNPKFRNEDYTRVQLMDYVDIICPHYEDMSVADAAMEQYILYL
VEHEEYQLCCPQSKDOVRWQCNHPSAKHSPPKLSKFPQRFTPTILGKFFKKGHSYYYISKPIHGHEDRCIR
LKVTYSGKITHSPCAHDNPFQEKRLAADDFEVRLHSIGHSAAAPRLPPLAWTOLLGULLLLQTF

Signal sequence: Amino acids 1-17
N-glycosylation site: Amino acids 26-30
Tyrosine kinase phosphorylation site: Amino acids 118-127
N-myristoylation site: Amino acids 10-16

FIGURE 25

[illegible]

WO 00/73445

PCT/US00/13705

26/34

FIGURE 26

MLFLCLVAALLLAAGPGPSLGGDEATHCDCCSEFKTARCRPPVQCSKIVREPGCGCCATCALGLMPCGVYT
 PROCSGLRCYPPRGVLKPLUTLHGGGVCKELAEIEAIQESLQPSOKDEGDHFNNSFSCSAIEDRRCLQKH
 FAKIRDRSTSGGKMKVNGAPREDARPPVQGSQSELHRALEKLAASQSKITHECLYIIPNCDNRGNTHPK
 QCHPAIDGGGRKCKVCVKKKGVLDPGGLEPRGELDCHQLAUSFRE

Signal sequence: Amino acids 1-21

transmembrane domain: Amino acids 51-69 (weak)

N-glycosylation site: Amino acids 125-129

Tyrosine kinase phosphorylation site: Amino acids 191-198

N-myristoylation sites: Amino acids 52-58; 54-60; 64-70;
 95-102; 172-178

Insulin-like growth factor binding proteins signature:
 Amino acids 52-68

IGF binding protein (less stringent than prosite's):
 Amino acids 52-61

WO 00/73445

PCT/US00/13705

27/34

FIGURE 27

AGCTCCAGCTGACCAACGGAA7GGCTGTCTCTCAAGGAGGGCTGAAGCTCCACCCAGGCCAGCTCTCT
CCCAACAACGGTTCCTCAGAGCATGAAAGATCTCGTGGCTGCCATTCCCTCTTCTCTCTCATCACCATTGG
CCTAGGACCAAGACTGAATCTCTCTCAGGGACCTTACCACTCCCTCAGAGTGTCTCTCAGCTACACTA
CCTACAGATCCCGGCTCAGCGGATTATGGATTACTATGAGACCAACAGCCAGTGTCTCCAGCCCGGAATT
GTCTTCAACCAAAAGGGCCATTCCGTCTGTACCAACCCCACTGACAAAGTGGTCCAGGACTATATCAG
GACTGAAGGAGAACTGAATGACCCAGAGGGGTGGCGAAGGCACAGCTCAGAGACATAAAGAGAGATGC
CAAGCCCCCTCTCCACCCACCGCTAACTCTCAGCCCAAGTCACTCTT

WO 00/73445

PCT/US00/13705

28/34

FIGURE 26

NKISVAAIPFLLITIALSTKTFSSSRGPTHPSECCFTYTTTKIPRQRLMDYVFTNSQCSKPGIVFITKRG
HSVCTINPSDKRWQDYTKDMREN

Signal sequence:

Amino acids 1-22

WO 00/73445

PCT/US00/13705

29/34

FIGURE 29

CCCCAGGAGGAATGAAGGTCTCGGTGGCTGCCCTCTGCTGCTCATGCTTGTGCTGTGCTTGGATGCCAG
GCCAGTTCAAAATGATGCAGAGACAGATTATGATGTCAAGGCTTCCAGTGGAAAATCCACTAGTTCT
GAACAGCTTTCACTTTGCTCTGACTGCTGCACCTTCCTACATCTC/CAAAGCATCCCGTGTCACTCATGA
AAAGTTATTTGAAACGAGCAGCGAGTGTCCAGGCCAGGTGTCA/CTTCCACCAAGAAAGGGGCGGCAA
GTCTGTGCCAAACCAAGTGTCCGGAGTTCAGGATTGCATGAAAAAGCTGAAAGCCCTACTCAATATAATA
ATAAAGAGACAAAGAGGCCAGGCCACCCACCTCCACACCTCCJAGATCTGATC

WO 00/73445

PCT/US00/13705

30/34

FIGURE 30

MKVSVAAAGCLMLVANLGSQSQFTNDAETELKMSKLPLENPVVLSFPEFAADCCTSYISQSIPOSLMKSYF
ETSSBCKKPGVIFLTKEGRQVCARKPSGPGVQDCMKKLPYSI

Signal sequence: Amino acids 1-21

Glycosaminoglycan attachment site: Amino acids 97-101

N-myristoylation site: Amino acids 100-106

[illegible]

WO 00/73445

PCT/US00/13705

32/34

FIGURE 32

MSHFGSSIDPDQTSSVSLLPHLEAKIRQTHSLAKLLTKYAEQILQEVVQLGGDPFGLPGFSPPRILPVAGL
SAPAPSSHAGI/PVHERLLLEDAALALPPLLDVCRKQAEINPRAPIILRRLEPPARQARALGNAVEALLAA
LGAANNRGPRAEPPAATASAAASNTGVFPAXVLGLRVCGLYKRWISRTGGDLGGLLPGSSA

N-myristoylation sites: Amino acids 166-172;174-180

Leucine zipper pattern: Amino acids 37-59

FIGURE 3.3

[illegible]

WO 00/73445

PCT/US00/13705

34/34

FIGURE 34

Mature oxytocin:

CYIQNCELGGKRAAPDLVRKCLPCGGGGKRCFPGNICAEELGCFVGTAEALRCQEENYLSPCQSGQK
ACGSGGRCVILGLCCSFDGCHADPACDAEATFSQR

Pro-oxytocin:

MMGPSLACCLGLLALTSACYIQNCELGGKRAAPDLVRKCLPCGGGGKRCFPGNICAEELGCFVGTAE
ALRCQEENYLSPCQSGQKACGSGGRCVILGLCCSFDGCHADPACDAEATFSQR

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 December 2000 (07.12.2000)

PCT

(10) International Publication Number
WO 00/73445 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/47, 14/53, A61K 38/17, C07K 16/18, G01N 33/53, C12Q 1/68, C12N 15/11, 15/86
- (71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. (US/US); 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US00/13705
- (22) International Filing Date: 17 May 2000 (17.05.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
- | | | |
|----------------|-------------------------------|----|
| PCT/US99/12352 | 2 June 1999 (02.06.1999) | US |
| 60/141,037 | 23 June 1999 (23.06.1999) | US |
| 60/144,758 | 20 July 1999 (20.07.1999) | US |
| 60/145,698 | 26 July 1999 (26.07.1999) | US |
| 60/146,222 | 28 July 1999 (28.07.1999) | US |
| PCT/US99/20111 | 1 September 1999 (01.09.1999) | US |
| PCT/US99/28313 | 30 November 1999 (30.11.1999) | US |
| PCT/US99/28409 | 30 November 1999 (30.11.1999) | US |
| PCT/US99/28565 | 2 December 1999 (02.12.1999) | US |
| PCT/US99/30395 | 16 December 1999 (16.12.1999) | US |
| PCT/US00/00219 | 4 January 2000 (04.01.2000) | US |
| PCT/US00/00376 | 6 January 2000 (06.01.2000) | US |
| PCT/US00/03565 | 11 February 2000 (11.02.2000) | US |
| PCT/US00/04341 | 18 February 2000 (18.02.2000) | US |
| PCT/US00/04342 | 18 February 2000 (18.02.2000) | US |
| PCT/US00/05004 | 24 February 2000 (24.02.2000) | US |
| PCT/US00/05841 | 2 March 2000 (02.03.2000) | US |
| PCT/US00/06319 | 10 March 2000 (10.03.2000) | US |
| PCT/US00/06884 | 15 March 2000 (15.03.2000) | US |
| PCT/US00/07532 | 21 March 2000 (21.03.2000) | US |
| PCT/US00/08439 | 30 March 2000 (30.03.2000) | US |
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): ASHKENAZI, Avi, J. (US/US); 1456 Tarrytown Street, San Mateo, CA 94402 (US); BAKER, Kevin, P. (US/US); 14006 Indian Run Drive, Damascus, MD 20878 (US); FERRARA, Napoleone (US/US); 2090 Pacific Avenue #704, San Francisco, CA 94109 (US); GERBER, Hanspeter (CH/US); 1121 Tennessee Street #5, San Francisco, CA 94107 (US); GERRITSEN, Mary, E. (CA/US); 341 Parrott Drive, San Mateo, CA 94402 (US); GODDARD, Audrey (CA/US); 110 Congo Street, San Francisco, CA 94133 (US); GODOWANSKI, Paul, J. (US/US); 2627 Easton Drive, Burlingame, CA 94010 (US); GURNEY, Austin, L. (US/US); 1 Debbie Lane, Belmont, CA 94002 (US); KLO, Sophia, S. (US/US); 59 Surrey Street #3, San Francisco, CA 94134 (US); MARK, Melvin, R. (US/US); 958 B Chula Vista Avenue, Burlingame, CA 94010 (US); MARSTERS, Scot, A. (US/US); 980 Cherry Street, San Carlos, CA 94070 (US); PAONI, Nicholas, E. (US/US); 1756 Terrace Drive, Belmont, CA 94002 (US); PITT, Robert, M. (US/US); 1110 Liberty Street, El Cerrito, CA 94530 (US); WATANABE, Colin, K. (US/US); 128 Corliss Drive, Moraga, CA 94556 (US); WILLIAMS, P., Mickey (US/US); 509 Alto Avenue, Half Moon Bay, CA 94019 (US); WOOD, William, L. (US/US); 35 Southdown Court, Hillsborough, CA 94010 (US).
- (74) Agents: BARNES, Elizabeth, M. et al.; Genentech, Inc., MS49, 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(Continued on next page)

(54) Title: INTERLEUKIN-1-RECEPTOR ASSOCIATED KINASE-3 (IRAK3)

(57) Abstract: Compositions and methods are disclosed for stimulating or inhibiting angiogenesis and/or cardiovascularization in mammals, including humans. Pharmaceutical compositions are based on polypeptides or antagonists thereto that have been identified for one or more of these uses. Disorders that can be diagnosed, prevented, or treated by the compositions herein include trauma such as wounds, various cancers, and disorders of the vessels including atherosclerosis and cardiac hypertrophy. In addition, the present invention is directed to novel polypeptides and to nucleic acid molecules encoding those polypeptides. Also provided herein are vectors and host cells comprising those nucleic acid sequences, chimeric polypeptide molecules comprising the polypeptides of the present invention fused to heterologous polypeptide sequences, antibodies which bind to the polypeptides of the present invention and to methods for producing the polypeptides of the present invention.

WO 00/73445 A3

WO 00/73445 A3



(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

With (any) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description.

(85) Date of publication of the international search report:
1 March 2001

Published:

— *With international search report.*

— *Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments.*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Inter- national Application No. PCT/US 00/13705
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC 7	C12N15/12 G01N33/53	C07K14/47 C12Q1/68	C07K14/52 C12N15/11	A61K38/17 C12N15/86 C07K16/18
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A61K G01N C12Q				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, STRAND				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim No.
X	WO 99 25834 A (GENENTECH INC) 27 May 1999 (1999-05-27) the whole document			1-24, 29, 31-34, 38, 46-48, 59-60
X	WO 98 07880 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC; NI JIAN (US); ROSEN CRAIG A (US); YU GU) 26 February 1998 (1998-02-26) the whole document --- -/-			1-4, 11-24, 47, 48, 59-60
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ 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 "F" 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 claim 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 distinguished therefrom 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 "Z" document member of the same patent family				
Date of the actual completion of the international search		Date of making of the international search report		
13 September 2000		22. 12. 00		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentstr. 2 NL - 2560 HW Rijswijk Tel. (+31 70) 340-2000, Ex. 31 651 ext. 40 Fax (+31 70) 340-2010		Authorized officer Smalt, R		

Form PCT/ISA/210 (2 second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter: nat Application No
PCT/US 00/13705

C.2(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GURNEY A L ET AL: "Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GLTR" CURRENT BIOLOGY, CURRENT SCIENCE, GB, vol. 9, no. 4, 25 February 1999 (1999-02-25), pages 215-218, XP000938588 ISSN: 0950-9822 the whole document	1-4, 6, 11-24, 59-80
X	KWON BYUNGSIK ET AL: "Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 10, 5 March 1999 (1999-03-05), pages 6056-6061, XP002147323 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-4, 11-24, 47, 48, 59-80
A	KLASBRUN M: "REGULATORS OF ANGIOGENESIS: STIMULATORS, INHIBITORS, AND EXTRACELLULAR MATRIX" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, US, LISS, NEW YORK, NY, vol. 47, no. 3, 1 November 1991 (1991-11-01), pages 199-200, XP000616588 ISSN: 0730-2312 the whole document	
A	WO 95 29242 A (CHILDRENS MEDICAL CENTER) 2 November 1995 (1995-11-02) the whole document	
A	EP 0 335 243 A (HARVARD COLLEGE) 4 October 1989 (1989-10-04) the whole document	
P, X	WO 99 40196 A (GENENTECH INC) 12 August 1999 (1999-08-12) examples 2, 10, 11	1, 2, 6, 7, 10, 11, 13-15, 17, 18, 31-34, 38, 42, 45-48, 59-65, 67, 70-73, 79, 80

1

Form P-21 (2/2001) (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	in international application No. PCT/US 00/13705
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 31-45 and 49-56 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. ☒ Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a),	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows: see additional sheet	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by this applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-49, 52, 59-66	
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 00/13705

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: Invention 1: claims 1-49,52,59-80, all partially

Composition comprising PR0175 polypeptide or (ant)agonist thereof, fusion proteins comprising a portion of said protein, antibody against said protein, method for identifying (ant)agonists of said protein or compounds which modulate the expression level or the activity of said protein, methods for modulating the activity of said protein using said (ant)agonists or modulators, methods for diagnosis comprising assessing the protein or expression levels of said polypeptide, retroviral particle encoding said protein or (ant)agonist, and producer cell of said protein or (ant)agonist comprising said retroviral particle, use of said protein, (ant)agonists thereof or nucleic acids encoding said protein in the manufacture of a composition for the treatment of angiogenesis or cardiovascularization related disorder.

2. Claims: Inventions 2-17: claims 1-80,
all partially and in as far as applicable

Idem as subject 1 but limited to the respective proteins PR0200, PR0198, PR0364, PR0356, PR0535, PR0819, PR01002, PR01308, PR01304, PR0183, PR0262, PR0861, PR0877, PR0879, PR0882, and PR01710.

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

International Application No. PCT/US 00/13705

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

A meaningful search for the full scope of claims 1,2,5-7,10,17-19,31-35,38,42, and 45-54, referring to (ant)agonists of the claimed proteins and compounds inhibiting the expression thereof, could not be performed due to insufficient characterization of the (ant)agonists and/or expression inhibitors in the description (lack of disclosure, support, clarity, and conciseness, PCT articles 5 & 6). It is clear from e.g. claims 3,4 and 20, however, that the claimed (ant)agonists could be agonistic antibodies against proteins defined in the application, and that the expression inhibiting compound could be an antisense molecule. The search for the above claims, in as far as they relate to (ant)agonists and expression inhibitors, was therefore limited to (ant)agonistic antibodies and antisense molecules only.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 65.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter. nat. Application No.

PCT/US 00/13705

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9925834 A	27-05-1999	AU 1418099 A	07-06-1999
		EP 1032672 A	06-09-2000
WO 9807880 A	26-02-1998	AU 6847896 A	06-03-1998
		EP 0961831 A	08-12-1999
WO 9529242 A	02-11-1995	US 5639725 A	17-06-1997
		US 5792845 A	11-08-1998
		AU 692865 B	18-06-1998
		AU 2461795 A	16-11-1995
		BR 9507479 A	16-09-1997
		CA 2188813 A	02-11-1995
		CN 1149319 A	07-05-1997
		CZ 9603122 A	14-05-1997
		EP 0758390 A	19-02-1997
		HU 75895 A	30-06-1997
		JP 9512173 T	09-12-1997
		NZ 285501 A	26-02-1998
		US 5885795 A	23-03-1999
		US 5733876 A	31-03-1998
		US 5776704 A	07-07-1998
		ZA 9503419 A	11-01-1996
EP 0335243 A	04-10-1989	US 4900673 A	13-02-1990
		AT 96844 T	15-11-1993
		AU 621358 B	12-03-1992
		AU 3433189 A	16-10-1989
		CA 1331356 A	09-08-1994
		DE 68910354 D	09-12-1993
		DE 68910354 T	03-03-1994
		DK 233390 A	26-11-1990
		JP 3503641 T	15-08-1991
		PT 90129 A	10-11-1989
		WO 8909277 A	05-10-1989
		ZA 8902270 A	24-12-1991
WO 9940196 A	12-08-1999	AU 2501599 A	23-08-1999
		EP 1053321 A	22-11-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family search) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 9/10	4 C 0 8 4
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 17/02	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 27/02	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/47	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 1/19	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 7/00	C 1 2 N 7/00	
C 1 2 N 9/99	C 1 2 N 9/99	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 15/00	Z N A A
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	B
(C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 R 1:91)	C 1 2 P 21/02	C
	C 1 2 R 1:91	

- (31)優先権主張番号 60/145,698
 (32)優先日 平成11年7月26日(1999.7.26)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/146,222
 (32)優先日 平成11年7月28日(1999.7.28)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US9920111
 (32)優先日 平成11年9月1日(1999.9.1)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US9928313
 (32)優先日 平成11年11月30日(1999.11.30)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US9928409
 (32)優先日 平成11年11月30日(1999.11.30)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US9928565
 (32)優先日 平成11年12月2日(1999.12.2)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US9930095
 (32)優先日 平成11年12月16日(1999.12.16)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US0000219

- (32)優先日 平成12年1月5日(2000.1.5)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US0000376
 (32)優先日 平成12年1月6日(2000.1.6)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US0003565
 (32)優先日 平成12年2月11日(2000.2.11)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US0004341
 (32)優先日 平成12年2月18日(2000.2.18)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US0004342
 (32)優先日 平成12年2月18日(2000.2.18)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US0005004
 (32)優先日 平成12年2月24日(2000.2.24)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US0005841
 (32)優先日 平成12年3月2日(2000.3.2)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US0006319
 (32)優先日 平成12年3月10日(2000.3.10)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US0006884
 (32)優先日 平成12年3月15日(2000.3.15)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US0007532
 (32)優先日 平成12年3月21日(2000.3.21)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US0008439
 (32)優先日 平成12年3月30日(2000.3.30)
 (33)優先権主張国 米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

U N I X

- (72)発明者 ベーカー, ケヴィン, ピー.
 アメリカ合衆国 メリーランド 20878, ダーンズタウン, インディアン ラン ドライブ
 14006
 (72)発明者 フェララ, ナポレオン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94109, サンフランシスコ, パシフィック アヴェニュー
 2090 704号室
 (72)発明者 ゲルバー, ハンズピーター
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94107, サンフランシスコ, テネシー ストリート 11

21 5号室

- (72)発明者 ゲリッツェン, マリー, イー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94402, サン マテオ, パロット ドライブ 541
- (72)発明者 ゴッダード, 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 ゴドフスキー, ポール, ジェー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリンゲーム, イーストン ドライブ 2627
- (72)発明者 ガーニー, オースティン, エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002, ベルモント, デビー レーン 1
- (72)発明者 クオ, ソフィア, エス.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94131, サンフランシスコ, シュリー ストリート 593号室
- (72)発明者 マーク, メラニー, アール.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリンゲーム, チュラ ヴィスタ アヴェニュー 958 ビー
- (72)発明者 マースターズ, スコット, エー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, チェリー ストリート 990
- (72)発明者 パオニ, ニコラス, エフ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002, ベルモント, テラス ドライブ 1756
- (72)発明者 ピッティ, ロバート, エム.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94530, エル セリト, リバティー ストリート 1110
- (72)発明者 ワタナベ, コリン, ケー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94556, モラガ, コーリス ドライブ 128
- (72)発明者 ウィリアムズ, ビー., ミッキー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94019, ハーフ ムーン ベイ, アルト アヴェニュー 509
- (72)発明者 ウッド, ウィリアム, アイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, ヒルズバラ, サウスダウン コート 35

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB05 BB14 BB29 BB41 BB50 BB51 CB01 DA13
DA36 FA29 FB02 FB03 FB05 FB08 GC10
4B024 AA01 AA11 BA43 CA02 CA04 CA07 DA02 DA06 DA12 EA02
EA04 FA10 GA11 GA13 HA01 HA11 HA17
4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ41 QQ79 QR48 QR55 QR77 QS34
4B064 AG01 AG27 CA02 CA05 CA10 CA19 CC24 DA03 DA13
4B065 AA26X AA72X AA90X AA91X AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA03
CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA17 AA19 BA01 BA02 BA22 NA14 ZA33
ZA36 ZA89 ZB21 ZB26
4C085 AA14 AA16 BB11 CC02 CC23 CC32 EE01 GG02
4H045 AA10 AA20 AA30 BA09 BA41 BA54 CA40 DA75 DA76 EA20
EA50 FA74

专利名称(译)	促进或抑制血管生成和心血管化		
公开(公告)号	JP2004506595A	公开(公告)日	2004-03-04
申请号	JP2001500757	申请日	2000-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	アシュケナジアヴィジェー ベーカーケヴィンピー フェララナポレオン ゲルバーハンズピーター ゲリッツエンマリーイー ゴッダードオードリー ゴドフスキーポールジェー ガーニーオースティンエル クオソフィアエス マークメラニーアール マースターズスコットエー パオニニコラスエフ ピッティロバートエム ワタナベコリンケー ウィリアムズピーミッキー ウッドウィリアムアイ		
发明人	アシュケナジ,アヴィ,ジェー. ベーカー,ケヴィン,ピー. フェララ,ナポレオン ゲルバー,ハンズピーター ゲリッツエン,マリー,イー. ゴッダード,オードリー ゴドフスキー,ポール,ジェー. ガーニー,オースティン,エル. クオ,ソフィア,エス. マーク,メラニー,アール. マースターズ,スコット,エー. パオニ,ニコラス,エフ. ピッティ,ロバート,エム. ワタナベ,コリン,ケー. ウィリアムズ,ピー.,ミッキー ウッド,ウィリアム,アイ.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K45/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P17/02 A61P27/02 A61P35/00 C07K14/47 C07K14/52 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N9/99 C12N15/09 C12N15/11 C12N15/12 C12N15/86 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61P17/02 A61P27/02 C07K14/475 C07K14/52 C12Q1/6886 C12Q2600/136 C12Q2600/156 G01N33/5011 G01N2800/32		
FI分类号	A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P17/02 A61P27/02 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12N9/99 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/577.B C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B C12P21/08 C12R1/91		

F-TERM分类号 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB05 2G045/BB14 2G045/BB29 2G045/BB41 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA29 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB08 2G045/GC10 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA13 4B024/HA01 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ41 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA03 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/NA14 4C084/ZA33 4C084/ZA36 4C084/ZA89 4C084/ZB21 4C084/ZB26 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/GG02 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/BA54 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74

優先権 09/912252 1999-06-02 US
60/141037 1999-06-23 US
60/144758 1999-07-20 US
60/145698 1999-07-26 US
60/146222 1999-07-28 US
09/920111 1999-09-01 US
09/928313 1999-11-30 US
09/928409 1999-11-30 US
09/928565 1999-12-02 US
09/930095 1999-12-16 US
0000219 2000-01-05 US
0000376 2000-01-06 US
0003565 2000-02-11 US
0004341 2000-02-18 US
0004342 2000-02-18 US
09/000050 2000-02-24 US
0005841 2000-03-02 US
0006319 2000-03-10 US
0006884 2000-03-15 US
0007532 2000-03-21 US
0008439 2000-03-30 US

其他公开文献 JP4297317B2

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

公开了用于在哺乳动物（包括人）中刺激或抑制血管生成和/或心血管形成的组合物和方法。药物组合物基于针对这些用途中的一种或多种鉴定的多肽或其拮抗剂。本文组合物诊断，预防或治疗的疾病包括创伤，例如伤口，各种癌症和血管疾病，包括动脉粥样硬化和心脏肥大。此外，本发明涉及编码这些多肽的新多肽和核酸分子。本文还提供了包含这些核酸序列的载体和宿主细胞，包含与异源多肽融合的本发明多肽的嵌合分子，与本发明多肽结合的抗体，以及产生本发明多肽的方法还提供。

(P2004-506595 (43) 公表日 平成16年3月4日 (2004. 3.			
(51) Int. Cl. ⁷	F 1	テーマコード（参考）	
A 61 K 38/00	A 61 K 37/02	2 G 0 4 5	
A 61 K 39/395	A 61 K 39/395	D	4 B 0 2 4
A 61 K 45/00	A 61 K 39/395	N	4 B 0 6 3
A 61 P 9/00	A 61 K 45/00	4 B 0 6 4	
A 61 P 9/10	A 61 P 9/00	4 B 0 6 5	
審査請求 有		予備審査請求 有	（全 332 頁） 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2001-500757 (P2001-500757)	(71) 出願人	596168317
(22) 出願日	平成12年5月17日 (2000. 5. 17)	ジェネンテック・インコーポレーテッド	
(23) 出願国	米国 (US)	GENENTECH, INC.	
(31) 優先権主張番号	60/141, 037	アメリカ合衆国カリフォルニア・9 4 0・	
(32) 優先日	平成11年6月23日 (1999. 6. 23)	0 2, サン マテオ, テリー タウン	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	トリート 1 4 5 6	
(31) 優先権主張番号	60/144, 758		
(32) 優先日	平成11年7月20日 (1999. 7. 20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		