

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4297317号
(P4297317)

(45) 発行日 平成21年7月15日 (2009. 7. 15)

(24) 登録日 平成21年4月24日 (2009. 4. 24)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 9/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00
請求項の数 58 (全 130 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2001-500757 (P2001-500757)	(73) 特許権者	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
(65) 公表番号	特表2004-506595 (P2004-506595A)		GENENTECH, INC.
(43) 公表日	平成16年3月4日 (2004. 3. 4)		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/013705		0-4990・サウス・サン・フランシス
(87) 国際公開番号	W02000/073445		コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(87) 国際公開日	平成12年12月7日 (2000. 12. 7)	(74) 代理人	100109726
審査請求日	平成13年12月3日 (2001. 12. 3)		弁理士 園田 吉隆
(31) 優先権主張番号	US9912252	(74) 代理人	100101199
(32) 優先日	平成11年6月2日 (1999. 6. 2)		弁理士 小林 義敦
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	アシュケナジ, アヴィ, ジェー.
(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 944
(32) 優先日	平成11年6月23日 (1999. 6. 23)		02, サン マテオ, テリー タウン ス
(33) 優先権主張国	米国 (US)		トリート 1456
		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) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：16のPRO1002ポリペプチド、又はその抗体を、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、又はその前記抗体の治療的有效量を含有する請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

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 4】

配列番号：16のPRO1002ポリペプチド、又はその抗体を、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。

【請求項 5】

(1)(a)配列番号：16のPRO1002ポリペプチド、又は(b)配列番号：16のPRO1002ポリペプチドの抗体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；

(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 6】

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抗体の治療の有効量を含む請求項 5 に記載の製造物品。

【請求項 7】

配列番号：16のPRO1002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、配列番号：16のPRO1002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方法。

10

【請求項 8】

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 7 に記載の方法。

【請求項 9】

配列番号：16のPRO1002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。

【請求項 10】

配列番号：16のPRO1002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：

20

(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；

(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 11】

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 10 に記載の方法。

【請求項 12】

配列番号：16のPRO1002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。

30

【請求項 13】

配列番号：16のPRO1002ポリペプチドに結合する単離された抗体。

【請求項 14】

モノクローナル抗体である請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 15】

抗体断片である請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 16】

一本鎖抗体である請求項 13 に記載の抗体。

40

【請求項 17】

疾患又は疾患に対する感受性に関連する配列番号：16のPRO1002ポリペプチドのコード化核酸配列の突然変異を生体外で検出する方法であって、生体から得られた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に関連する方法。

【請求項 18】

哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患に関連する遺伝子の発現レベルを生体外で検出する方法において、(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配列番号：16のPRO1002ポ

50

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に関連する方法。

【請求項 19】

哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患に関連するポリペプチドの有無を生体外で検出する方法において、前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料における配列番号：16のPRO1002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に関連する方法。

【請求項 20】

10

哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患に関連する複合体の形成を生体外で検出する方法において、(a)前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料を抗-配列番号：16のPRO1002抗体と接触させ、そして(b)試験試料中での前記抗体と配列番号：16のPRO1002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に関連する方法。

【請求項 21】

試料中の配列番号：16のPRO1002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-配列番号：16のPRO1002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。

20

【請求項 22】

抗-配列番号：16のPRO1002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 23】

ヒト以外の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、配列番号：16のPRO1002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んでなる方法。

【請求項 24】

前記ヒト以外の哺乳動物が心筋梗塞に罹患している請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

30

前記ヒト以外の哺乳動物が心臓肥大、外傷、癌、又は加齢性黄斑変性を有する請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

心臓肥大がPGF2 α のレベル上昇の存在によって特徴づけられる請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

配列番号：16のPRO1002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 23 に記載の方法。

【請求項 28】

配列番号：16のPRO1002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 25 に記載の方法。

40

【請求項 29】

心臓血管、内皮又は血管形成疾患が癌である請求項 23 に記載の方法。

【請求項 30】

配列番号：16のPRO1002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 29 に記載の方法。

【請求項 31】

ヒト以外の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、配列番号：16のPRO1002ポリペプチド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。

50

【請求項 3 2】

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 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

(1)プロモータ、(2)配列番号：1 6 の P R O 1 0 0 2 ポリペプチドをコードする核酸、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 3 4】

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)配列番号：1 6 の P R O 1 0 0 2 ポリペプチドをコードする核酸、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 3 5】

ヒト以外の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、配列番号：1 6 の P R O 1 0 0 2 ポリペプチド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 3 6】

ヒト以外の哺乳動物における血管形成を阻害する方法において、配列番号：1 6 の P R O 1 0 0 2 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 3 7】

F i g 1 6 (配列番号：1 6)に示すアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % の核酸配列同一性を有する単離された核酸であって、該核酸にコードされるポリペプチドが内皮細胞にアポトーシスを誘導することのできる核酸。

【請求項 3 8】

F i g 1 5 (配列番号：1 5)に示す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であって、該核酸にコードされるポリペプチドが内皮細胞にアポトーシスを誘導することのできる核酸。

【請求項 3 9】

F i g 1 5 (配列番号：1 5)に示すヌクレオチド配列の全長コード化配列と少なくとも 8 0 % の核酸配列同一性を有する単離された核酸であって、該核酸にコードされるポリペプチドが内皮細胞にアポトーシスを誘導することのできる核酸。

【請求項 4 0】

A T C C 登録番号 2 0 9 8 8 1 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であって、該核酸にコードされるポリペプチドが内皮細胞にアポトーシスを誘導することのできる核酸。

【請求項 4 1】

請求項 3 7 から 4 0 のいずれか一項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 4 2】

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 4 1 に記載のベクター。

【請求項 4 3】

請求項 4 1 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 4 4】

前記細胞が C H O 細胞である請求項 4 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 5】

前記細胞が大腸菌である請求項 4 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 6】

前記細胞が酵母菌細胞である請求項 4 3 に記載の宿主細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 47】

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 43 に記載の宿主細胞。

【請求項 48】

配列番号：16 の PRO1002 ポリペプチドの製造方法において、請求項 43 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 49】

Fig 16 (配列番号：16) に示すアミノ酸配列と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチドであって、内皮細胞にアポトーシスを誘導することのできるポリペプチド。

10

【請求項 50】

Fig 16 (配列番号：16) に示すアミノ酸配列と比較したとき少なくとも 80 % ポジティブのスコアとされる単離されたポリペプチドであって、内皮細胞にアポトーシスを誘導することのできるポリペプチド。

【請求項 51】

ATCC 登録番号 209881 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であって、内皮細胞にアポトーシスを誘導することのできるポリペプチド。

【請求項 52】

異種アミノ酸配列に融合した請求項 49 から 51 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。

20

【請求項 53】

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 52 に記載のキメラ分子。

【請求項 54】

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 52 に記載のキメラ分子。

【請求項 55】

請求項 49 から 51 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 56】

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 55 に記載の抗体。

30

【請求項 57】

(a) Fig 16 (配列番号：16) 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 16 (配列番号：16) 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 16 (配列番号：16) 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であって、該核酸にコードされるポリペプチドが内皮細胞にアポトーシスを誘導することのできる核酸。

40

【請求項 58】

(a) Fig 16 (配列番号：16) 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；

(b) Fig 16 (配列番号：16) 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；又は

(c) Fig 16 (配列番号：16) 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であって、内皮細胞にアポトーシスを誘導することのできるポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

50

【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

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)。

【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-アンジ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。アンジオテンシン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、アンジオテンシン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。

【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。Metcalf, 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. Nat. Acad. Sci. USA, 92: 1142-1146(1995))、カテコールアミン類、副腎皮質ステロイド類、アン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、LIF、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CT-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(tartalolol)、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。Pollick, 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。Wigleら, Circulation, 92: 1680-1

10

20

30

40

50

692(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(A C E)インヒビター、例えばキナプリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル及びリシノプリル；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、メチルクロチアジド(methylchlothiazide)、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。

10

【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。Szlachcic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、C H Fの治療におけるインシュリン様成長因子-1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。

20

30

【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。

40

【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(A C E)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、C H F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(19

50

91)。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ⅢⅢⅢの心不全を有している。

【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及びVaughanを参照されたい。

10

【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/AngⅡ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、AngⅡ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、AngⅡが実験的に付与された場合に肥大を発現しない(AngⅡ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(ATsub1A)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。

20

30

【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が、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, KHR R(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。

40

【0018】

B. 成長因子

50

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); 1996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(angiostatin)(O'Reilly等, Cell, 79:315-328(1994))及びエンドスタチン(endostatin)が含まれる。O'Reilly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

10

20

30

40

50

管の浸透性及び血管形成を誘発する点においても V E G F 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 V E G F 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、V E G F 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。V E G F m R N A 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 V E G F 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、A M D の影響を受けている患者の脈絡膜新生血管膜に V E G F 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-V E G F 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。Adam is等, *Arch. Ophthalmol.*, 114:66-71(1996)。よって、抗-V E G F モノクローナル抗体又は V E G F 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W098/45331及びW098/45332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、c e f 1 0 (Simmons等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1178-1182(1989))、血清-又は血小板誘導成長因子(P D G F)により素早く活性化される c y r 6 1 (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 (T G F - 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、P D G F 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 P D G F と競合するヒト結合組織成長因子(C T G F) (Bradham等, *J. Cell. Biol.*, 114:1285-1294(1991))、f i s p - 1 2 (Ryseck等, *Cell Growth Differ.*, 2:235-233(1991))、ヒト血管 I B P - 様成長因子(V I G F) (W096/17931)、及び通常は成人腎臓細胞に静止され、骨髄芽球-関連-ウイルス I 型誘発腎芽細胞腫において過剰発現することが見出されている n o v が含まれる。Jolait等, *Mol. Cell. Biol.*, 12:10-21(1992)。

【0028】

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。

10

20

30

40

50

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(I G F B P s)が、インシュリン様成長因子(I G F)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I G F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I G F作用に対するI G F B Pの阻害効果は、脂肪細胞によるグルコース輸送の刺激、軟骨細胞によるサルフェートの取り込み、及び線維芽細胞中へのチミジンの取り込みを含む。Zapf等, J. Clin. Invest., 63: 1077(1979)。さらに、正常な細胞での、成長因子媒介性分裂促進因子活性におけるI G F B Pの阻害効果が示されている。

【0029】

C. さらなる治療の必要性

10

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。

【0030】

(発明の概要)

20

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。

【0031】

30

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。

40

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

50

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 P R O ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストと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-P R O 抗体を含有する組成物に関する。一態様において、組成物は治療的有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-P R O 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。

10

さらなる実施態様において、本発明は製薬的に許容される担体と、治療的有效量の抗-P R O 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) 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有する物質の組成物；

20

(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 P R O ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの使用を記した、該容器に添付されるラベル又は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 P R O 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 P R O ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを含んでいてもよい。

【0035】

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

30

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

(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。

40

【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決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

50

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、PROポリペプチドの存在下で、PROポリペプチドによる細胞増殖の刺激に適した条件下で接触させ；

(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PRO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、PROポリペプチドの発現が阻害されるか否かを測定することを含む方法を提供する。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PROポリペプチドを発現させるのに適した条件下で接触させ；

(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、PRO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PRO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。

PROポリペプチドの一又は複数の機能又は活性を阻害するPROポリペプチドのアンタゴニストの一種は抗体である。よって、他の態様では、本発明はPROポリペプチドに結合する単離された抗体を提供する。好ましい態様において、抗体はモノクローナル抗体であり、好ましくは非ヒト相補性決定領域(CDR)残基及びヒトフレームワーク領域(FR)残基を有する。抗体は標識され、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)同じ細胞型の公知の正常組織細胞の対照試料におけるPROポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを分析することを含んでなり、対照試料に比較した場合の試験試料中の発現レベルの高低が、前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す方法を提供する。PROポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、場合によっては、対照試料と比較した際の試験試料中のmRNA又はポリペプチドのレベルの測定によってなされてもよい。

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-PRO抗体と接触させ、(b)試験試料中での前記抗体とPROポリペプチドとの複合体形成を検出することを含んでなり、前記複合体の形成が前記哺乳動物における心臓血管、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

10

20

30

40

50

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

10

【0041】

さらなる態様において、本発明は、抗-PRO抗体と担体とを適切な包装内に具備してなる心臓血管、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PROポリペプチド存在検出に使用するための指示書をさらに具備する。好ましくは、担体は例えばバッファーである。好ましくは、心臓血管、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、PROポリペプチドの有効量を当該哺乳動物に投与することを含んでなる方法を提供する。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ACE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。

20

他の好ましい態様において、心臓肥大は、PGF_{2α}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PRO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】

30

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PRO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、ACEインヒビター、エンドセリンレセプターアンタゴニスト及び血栓溶解剤からなる群から選択される。血栓溶解剤が投与される場合、好ましくは、PROポリペプチドはこのような薬剤の投与後に投与される。より好ましくは、血栓溶解剤は組換えヒト組織プラスミノゲン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。

40

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。

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

50

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。

【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。

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。

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含有し、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)PRO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-PRO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)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-PRO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)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-PRO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)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-PRO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PRO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效量の抗-PRO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。

10

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物においてPRO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效量の抗-PRO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、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。

20

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、PRO356、PRO861、PRO1308又はPRO1710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、PRO356、PRO861、PRO1308又はPRO1710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、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。

30

【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、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。

40

【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效量の抗-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。

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效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、

50

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。

【0050】

2. さらに実施態様

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。

【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、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を用いて PRO ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列と他の公知のヌクレオチド配列とを整列させ、いずれの PRO ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することにより、常套的な手法で同定してもよい。このような PRO ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列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-PRO 抗体に対する結合部位を含む PRO ポリペプチド断片によってコードされる PRO ポリペプチド断片も考慮される。

【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 PRO ポリペプチドを提供する。

【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 PRO ポリペプチドに対して少なくとも約 80% のアミノ酸配列同一性、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。

10

【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。

20

【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 % 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。

30

40

【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。

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、

50

単離されたPRO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PRO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PRO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PROポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストに関する。特別な実施態様では、アゴニスト又はアンタゴニストは抗-PRO抗体又は小分子である。

さらなる実施態様では、本発明は、PRO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、PROポリペプチドを候補分子と接触させ、前記PROポリペプチドによって媒介される生物学的活性を監視することを含む。好ましくは、PROポリペプチドは天然PROポリペプチドである。

【0060】

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

本発明の他の実施態様は、PRO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-PRO抗体の、PROポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニスト又は抗-PRO抗体に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DNAを含むベクターを提供する。そのようなベクターの任意のものを含む宿主細胞も提供される。例として、宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又はバキュロウイルス感染昆虫細胞であってよい。ここに記載する任意のポリペプチドの製造方法がさらに提供され、それは、宿主細胞を所望のポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培地から所望のポリペプチドを回収することを含む。

【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Fc領域に融合したここに記載の任意のポリペプチドを含む。

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

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

【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、癭痕化、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、アングナ（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。

【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。

【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。

【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。

【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: 869-8

10

20

30

40

50

74(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)。

【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、アルファトポミオシン、心臓ミオシン結合プロテインC、必須ミオシン軽鎖、及び調節性ミオシン軽鎖が含まれる。Malik及びWatkins, Curr. Opin. Cardiol., 12: 295-302(1997)を参照されたい。

【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。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。

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、例えば肝臓癌(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。

【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、メトトレキサート、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。

【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、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル及びAra-Cである。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael,編集, Chapter 1, Murakamiらによる表題「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」(WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出される。さらなる例には、腫瘍壊死因子(TNF)、酸性又は塩基性FGF又は肝実質細胞成長因子(HGF)の血管形成活性を阻害又は中和可能な抗体、組織因子の凝固活性を阻害又は中和可能な抗体、プロテインC又はプロテインS(1991年2月21日に公開されたW091/01753を参照されたい)、又はHER2レセプターに結合可能な抗体(W089/06692)、例えば4D5抗体(及びそれらの機能的等価物)(例えばW092/22653)が含まれる。

【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(cardiotrophic)、又は筋栄養性の原因、又は虚血又は虚血発作、例えば心筋梗塞を含む、任意の原因の結果によるものである。

「慢性」投与とは、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BOSENTAN^{T M}及びMOXONODIN^{T M}、インターフェロン-ガンマ(I F N- 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-P A、及び半減期がより長く、非常に高いフィブリン特異性を有するように設計されたt-P A変異体、TNK-t-P A(T 1 0 3 N、N 1 1 7 Q、K H R R(296-299)A A A A t-P A変異体、Keyt等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3670-3674(1994))；強心薬又は昇圧薬、例えばジゴキシゲニン、及び 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(A C E)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、傷の治癒を促進する因子、例えば成長ホルモン、インシュリン様成長因子-I(I G F-I)、V E G F、V I G F、P D G F、表皮成長因子(E G F)、C T G F及びそのファミリーのメンバー、F G F、及びT G F- α 及びT G F- 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V E G Fに対する抗体が含まれる。さらに、細胞治療薬、例えば細胞毒性薬、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-H E R-2、抗-C D 2 0、及び生物活性及び有機化学薬が含まれる。

【0075】

本発明における薬理学的意味で、活性剤、例えばP R Oポリペプチド、又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-P R O抗体の「治療的有效量」とは、哺乳動物の心臓血管、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P R Oポリペプチド、又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-P R O抗体の「有効量」とは記載した目的の実行に有効な量を指すものであり、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。

【0076】

ここで用いられる用語「P R Oポリペプチド」及び「P R O」は、直後に数値符号がある場合には種々のポリペプチドを指し、完全な表示(例えば、P R O／数字)は、ここに記載する特定のポリペプチド配列を意味する。ここで使用される「P R O／数字ポリペプチド」及び「P R O／数字」であって、「数字」がここで使用される実際の数値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。

【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-末端境界は変化するが、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 Heinje等, Nucl. Acids. Res. 14: 4683-4690 (1986))。さらに、幾つの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナルペプチドの切断は完全に均一ではなく、一以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここに定義されるシグナルペプチドのC-末端境界の何れかの側の約5アミノ酸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2 A-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e-値=0.01、マルチパスの定数=25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ=25、及びスコアリングマトリクス=BLOSUM62を含む。

10

【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。

20

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=BLOSUM62。ここでの目的のために、%アミノ酸配列同一性値は、(a)天然PROポリペプチドから誘導された配列を有する関心あるPROポリペプチドのアミノ酸配列と、関心ある比較アミノ酸配列(即ち、関心あるPROポリペプチドが比較されるPROポリペプチド変異体であってもよい配列)との間の、WU-BLAST-2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。

30

【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

40

50

%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。

【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。

【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2 C-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

10

20

30

40

50

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e-値=0.01、マルチパスの定数=25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ=25、及びスコアリングマトリクス=BLOSUM62を含む。

【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ということもできる)は次のように計算される：

分率W/Zの100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のC及びDの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ということもできる)は次のように計算される：

分率X/Yの100倍

10

20

30

40

50

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。

【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。

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、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

【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

10

20

30

40

50

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同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をより緊縮性にするが、低い温度は緊縮性を低下させる。ハイブリッド形成反応の緊縮性の更なる詳細及び説明は、Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

ここで定義される「緊縮性条件」又は「高度の緊縮性条件」は、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50℃において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2)ハイブリッド形成中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42℃において50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；(3)42℃における50%ホルムアミド、5xSSC(0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5xデンハード液、超音波処理サケ精子DNA(50µg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストラン硫酸と、42℃における0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中の洗浄及び55℃での50%ホルムアミド、次いで55℃におけるEDTAを含む0.1xSSCからなる高緊縮性洗浄を用いるものによって同定される。

「中程度の緊縮性条件」は、Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor 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、5xSSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハード液、10%デキストラン硫酸、及び20mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の37℃での終夜インキュベーション、次いで1xSSC中37-50℃でのフィルターの洗浄といった条件が含まれる。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識するであろう。

【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。

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

10

20

30

40

50

形成活性を阻止、阻害、又は中和する任意の分子を含む。PROポリペプチドのアンタゴニストは、PROポリペプチドの細胞レセプターへの結合に干渉する、PROポリペプチドにより活性化される細胞を無力化又は死亡させる、又はPROポリペプチドが細胞レセプターに結合した後に血管内皮細胞の活性化に干渉することにより作用する。PROポリペプチドアンタゴニストによる仲介のこのような点の全ては、この発明の目的と等しいと考えられる。アンタゴニストは、分裂促進、血管形成、又はPROポリペプチドの他の生物学的活性を阻害し、よって、腫瘍、特に固形悪性腫瘍、慢性関節リュウマチ、乾癬、アテローム性動脈硬化、糖尿病、他の網膜症、水晶体後繊維増殖症、年齢関連性斑变性、血管新生緑内障、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。

20

【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。

30

「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。

40

【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

50

位の形成に寄与している。Kabat等, NIH Publ. No.91-3242, Vol.I, 647-669頁(1991)を参照のこと。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。

【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、F a b、F a b'、F (a b')₂ 及びF v断片；ダイアボディー(diabodies)；直鎖状抗体(Zapata等, Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995))；単鎖抗体分子；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。

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

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

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

任意の脊椎動物種からの抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(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 G1、I g G2、I g G3、I g G4、I g A及びI g A2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Kohler等, Nature 256, 495 (1975)により開示されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えDNA法によって作ることができる(例えば、米国特許第4,816,567号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson等, Nature 352:624-628(1991)、及び

Marksほか, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリ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する抗体の対応する配列と同一であるか相同である「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、並びにそれが所望の生物活性を有する限りそれら抗体の断片を特に含む。米国特許第4,816,567号; Morrisonほか, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)。

【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. Op. Struct. Biol. 2, 593-596(1992)を参照のこと。ヒト化抗体は、抗体の抗原結合領域が、関心ある抗原でマカクザルを免疫化することにより生産された抗体から由来するプリマタイズした(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鎖に存在する。好ましくは、Fvポリペプチドは、sFvが抗原結合に対する所望の構造を形成できるようにするポリペプチドリンカーをV_HとV_Lドメインの間に更に含んでいる。sFvのレビューには、例えば、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol.113, Rosenberg及びMoore編(Springer-Verlag, New York, 1994)pp.269-315を参照されたい。

「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】

「リポソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤からなる小型の小胞であり、哺乳動物への薬物(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。リポソームの成分は、通常は生体膜の脂質配列に類似する二層形式に配列させる。

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, 0, _M, 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},
0, _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, 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, 0, _M, 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, 0, _M, 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();

```

表1(続き)

```

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

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

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

main(ac, av)
    int ac;
    char *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file %s align.out\n", 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 jmps */
    readjmps(); /* get the actual jmps */
    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 ongong del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

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

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

```

10

20

30

表 1 (続き)

...nw

```

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

```

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

    int nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char outx[32];
    double pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;

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

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

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

```

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]-- = 'Y0';
}

```

...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; 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(ix)
    int ix;
    {

```

putline

40

表1(続き)

<pre> 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); } </pre>	...putline	10
<pre> /* * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock() */ static stars() { int i; register char *p0, *p1, cx, *px; if (!*out[0] (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') !*out[1] (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' ')) return; px = star; for (i = lmax+P_SPC; i; i--) *px++ = ' '; for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) { if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) { if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) { cx = '*'; nm++; } else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0) cx = '.'; else cx = ' '; } else cx = ' '; *px++ = cx; } *px++ = '\n'; *px = 'Y0'; } </pre>	stars	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/hongXXXXXX";          /* 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] = 'Y0';

```

cleanup

getseq

10

20

30

40

表1(続き)

```

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

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

char *
g_alloc(msg, nx, sz)                                g_alloc
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()                                          readjmps
{
    int      fd = -1;
    int      siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

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

```

...getseq

10

20

30

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)                                writejumps
{
    int ix;

    char      *mktemp();

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

```

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) =

30

5 ÷ 15 = 33.3%

表 2B

PRO	XXXXXXXXXXXX	(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) =

40

5 ÷ 10 = 50%

表 2C

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

10

6 ÷ 14 = 42.9%

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) =

20

4 ÷ 12 = 33.3%

【0108】

II. 本発明の組成物と方法

30

A. PRO変異体

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

天然全長配列PROポリペプチド又はここに記載したPROポリペプチドの種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第5,364,934号に記載されている保存的及び非保存的変異についての任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列PROポリペプチドと比較してPROポリペプチドのアミノ酸配列が変化するPROポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも1つのアミノ酸のPROポリペプチドの一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。アミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、PROポリペプチドの配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸の類似した構造及び／又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては1から5のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、得られた変異体を全長又は成熟天然配列によ

40

50

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	20
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu	
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile	
Lys (K)	arg; gln; asn	arg	
Met (M)	leu; phe; ile	leu	
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu	30
Pro (P)	ala	ala	
Ser (S)	thr	thr	
Thr (T)	ser	ser	
Trp (W)	tyr; phe	tyr	
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe	
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu	

【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。

10

20

30

40

50

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。

10

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。

20

【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。

30

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。

40

【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。

50

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 P R O 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。P R O アミノ酸配列は、場合によっては、D N A レベルでの変化、特に、P R O ポリペプチドをコードする D N A 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。

【0114】

P R O 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 W O 87/05330、及び Aplin 及び Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981) に記載されている。

10

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

P R O ポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、P R O 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(P E G)、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。

20

【0115】

また、本発明の P R O 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 P R O 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 P R O 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 P R O 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 P R O 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 P R O 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 HA タグポリペプチド及びその抗体 1 2 C A 5 [Field 等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-myc タグ及びそれに対する 8 F 9、3 C 7、6 E 1 0、G 4、B 7 及び 9 E 1 0 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)]；K T 3 エピトープペプチド [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 T 7 遺伝子 1 0 タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth 等, Proc. Natl. Aca d. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)] を含む。

30

40

これに換わる実施態様では、キメラ分子は P R O 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 I g G 分子の F c 領域であり得る。I g 融合体は、好ましくは I g 分子内の少なくとも 1 つの可変領域に換えて P R O 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、I g G 1 分子のヒンジ、C H 2 及び C H 3、又はヒンジ、C H 1、C H 2 及び C H 3 領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造について

50

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、PRODNA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、化学的又は酵素的方法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を保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたcDNAライブラリ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; 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W089/05859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、Van solingen等, J. Bact., 130: 946 (1977)及びHsiao等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることができる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown等, Methods in Enzymology, 185: 527-537 (1990)及び Mansour等, Nature, 336: 348-352 (1988)を参照のこと。

【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 marcescens*)、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、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA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 *t o n A* を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 1 A 2 ; 完全な遺伝子型 *t o n A p t r 3* を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 9 E 4 ; 完全な遺伝子型 *t o n A p r t 3 p h o A E 1 5 (a r g F - l a c) 1 6 9 d e g P o m p T k a n^r* を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 2 7 C 7 (ATCC 55,244) ; 完全な遺伝子型 *t o n A p t r 3 p h o A E 1 5 (a l g F - l a c) 1 6 9 d e g P o m p T r b s 7 i l v G k a n^r* を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 3 7 D 6 ; 非カナマイシン耐性 *d e g P* 欠失変異を持つ 3 7 D 6 株である大腸菌 W 3 1 1 0 株 4 0 B 4 ; 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 P C R 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、P R Oコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセスプロンブ(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, Nature, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日公開のEP 139,383) ; クルベロミセスホスト(*Kluveromyces hosts*) (米国特許第4,943,529号; Fleer等, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991))、例えばケー.ラクチス(*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt等, J. Bacteriol. 737 [1983])、ケー.フラギリス(*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、ケー.ブルガリクス(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、ケー.ウィケラミイ(*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、ケー.ワルチイ(*K. waltii*) (ATCC 56,500)、ケー.ドロソフィラルム(*K. drosophilarum*) (ATCC 36,906; Van den Berg等, Bio/Technology, 8: 135 (1990))、ケー.テモトレランス(*K. themotolerans*) 及びケー.マルキシアナス(*K. marxianus*) ; ヤロウィア(*Yarrowia*) (EP 402,226) ; ピッチャパストリス(*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sheekrishna等, J. Basic Microbiol, 28: 265-278 [1988]) ; カンジダ ; トリコデルマレーシア(*reesia*) (EP 244,234) ; アカパンカビ (Case等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]) ; シュワニオマイセス(*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(*Tolypocladium*) (1991年1月10日公開のWO 91/00357) ; 及びコウジ菌、例えば偽巢性コウジ菌 (Ballance等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilburn等, Gene, 26: 205-221 [1983]; Yelton等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) 及び

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

グリコシル化 P R O 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 S 2 及びスポドスペラ S f 9 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 (C H O) 及び C O S 細胞を含む。より特定の例は、S V 4 0 によって形質転換されたサル腎臓 C V 1 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 / - D H F R (CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)) ; マウスのセルトリ細胞 (TM4, Mather, Bio l. 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 CCL51) 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

P R O ポリペプチドをコードする核酸 (例えば、c D N A 又はゲノム D N A) は、クローニ

10

20

30

40

50

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。

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、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*)及びクレイベロマイシス(*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WO 90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

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

【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 (19

78); Goeddel等, Nature, 281:544 (1979)), アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系(Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776)、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーター(deBoer 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983))を含む。細菌系で使用するプロモーターもまたPRO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-ホスホグリセラートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

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

【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】

iv. 遺伝子増幅／発現の検出

遺伝子の増幅及び／又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプロ

10

20

30

40

50

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

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び／又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列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, Methodes in Enzymology, 182 (1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, (Springer-Verlag, New York 1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定のPRO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、雄のニュージール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】

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

創傷治癒活性のアッセイには、例えば、Eaglststein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 B_1 (ET B_1) レセプターポリペプチドに結合し、シグナル変換活性を調節するPROポリペプチドに関連したテスト用分子のスクリーニングアッセイは、米国特許第5,773,223号に記載されたようにして、エンドセリン B_1 レセプターポリペプチドをコードする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 B_1 レセプターシグナル変換活性を測定する。

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 $F_{2\alpha}$ (PG $F_{2\alpha}$) 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、PG $F_{2\alpha}$ 又はPG $F_{2\alpha}$ 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。

【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(PG $F_{2\alpha}$ 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PG $F_{2\alpha}$ 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。

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 : 985-94(1955)。大動脈を外科的切開により曝露し、短い太針を管の隣におく。大動脈を針周囲に絹糸で結紮して収縮させ、すぐに除去し、針の直径まで大動脈の管腔を低減させる。このアプローチは、例えばRossi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。

【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(MI)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MIを左冠動脈結紮にて誘発し、さらにこれを心電図試験で確認する。また動物の擬似操作グループを対照動物として用意する。初期のデータには、心臓肥大はMIを有するグループに存在することが示され、体重に対し心臓重量は18%増加していることが明らかとなった。上掲のLai等。心臓肥大の候補ブロッカー、例えばPROポリペプチドでこれらの動物を治療し、テストした候補薬の治療可能性についての貴重な情報を提供する。Sprague-Dawley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PROポリペプチドの抗体及び他のアンタゴニスト、例えば小分子アンタゴニストを含む治療用候補薬の効力をテストするために、種々のよく知られた動物モデルを使用することができる。このようなモデルのインビボの性質は、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(orthopin)移植、例えば結腸組織に移植された結腸癌細胞を使用し、同系のマウスに腫瘍細胞を移入することにより作成することができる。例えば、1997年9月18日に公開されたPCT公開番号W097/33551を参照されたい。おそらくは癌遺伝子の研究に最も頻繁に使用される動物種は、免疫欠損マウス、特にヌードマウスである。胸腺刺激/形成不全を有するヌードマウスがヒト腫瘍異種移植片用の宿主として成功裡に作用するという知見はこの目的への広範な使用に導いた。常染色体劣性nu遺伝子は、例えばASW、A/He、AKR、BALB/c、B10、LP、C17、CH3、C57BL、C57、CBA、DBA、DDD、I/St、NC、NFR、NFS、NFS/N、NZB、NZC、NZW、P、RII及びSJLを含む、非常に多数の明確に同族のヌードマウスに導入される。さらに、ヌードマウス以外に免疫学的欠損を受け継いだ広範囲の他の動物を育て、腫瘍異種移植片のレシピエントとして使用する。さらなる詳細は、例えばThe Nude Mouse in Oncology Research, E. Boven及びB. Winograd. eds.(CRC Press, Inc., 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); ras-形質移入NIH-3T3細胞; Caco-2(ATCC HTB-37); 又は中程度に分化したグレードIIヒト結腸腺癌細胞系、HT-29(ATCC HTB-38)、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。Karmali等, Br. J. Cancer. 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(trochar)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、Drebin等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83:9129-9133(1986)に記載されたようにして、例えばラット神経芽細胞(当初単離されたneu癌遺伝子からのもの)、又はneu-形質転換NIH-3T3細胞を、ヌードマウスに移植することにより作成することができる。

同様に、結腸癌の動物モデルは、動物、例えばヌードマウスに結腸癌細胞を通過させ、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、Me t h A、CMS 4、CMS 5、CMS 2 1及びWEHI - 1 6 4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 100μ 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。

10

【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能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Rygaard及びSpang-Thomsen, Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals. Wu及びSheng. eds.(Basel. 1989), p.301により報告されているプログラムが利用できる。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。

20

30

【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、前核のミクロ注射(米国特許第4,873,191号)；胚へのレトロウイルス媒介性遺伝子移動(例えば、Van der Putten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。

40

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

50

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

【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Capecchi, Cell, 51:503(1987)を参照のこと。ベクターは胚性幹細胞に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞が選択される。例えば、Li等, Cell, 69:915(1992)参照。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する。例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間をおいて「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、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パイオプシーとし、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。

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。

【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。

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な方法、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。

【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, (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-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、そ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PRO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。

【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ポリペプチドを分泌させるシグナル配列を含む。好ましくは、この目的のためのシグナル配列は哺乳動物シグナル配列、最も好ましくはPROポリペプチドのための天然シグナル配列である。場合によっては、ベクター作成物は、ポリアデニル化を指示するシグナル並びに一又は複数の制限部位及び翻訳終結配列も含む。例として、このようなベクターは典型的には5'LTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、第二鎖DNA合成の開始点、及び3'LTR又はその一部を含む。非ウイルスの他のベクター、例えばカチオン性脂質、ポリリジン、及びデンドリマーを用いることもできる。

10

【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 93/25673及びそこに引用された参考文献も参照。好適な遺伝子治療及びレトロウイルス粒子及び構造タンパク質の作成方法は、米国特許第5,681,746号に見出される。

20

【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RNA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。

30

40

【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

50

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RNA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(1985)により明らかになる。

よって、特定のDNA配列の欠失はハイブリッド形成、RNA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。

10

【0146】

vii. 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、変異はインサイツ分析で検出することもできる。

PROポリペプチドをコードする核酸の発現は、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。

20

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】

viii. 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。

30

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。

40

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、大きなゲノムクローンのプール又は特定の染色体からの断片のパネルで達成することができる。同様に、その染色体へのマッピングに使用可能な他のマッピング方法には、インサイツハイブリッド形成、標識されたフローソート染色体を用いたプレスクリーニング、及び染色体特異性cDNAライブラリ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クローンの蛍光インサイツハイブリッド形成(FISH)を、正確な染色体位置を一工程で提供するために使用することができる。この技術は500又

50

は600塩基と短いcDNAで使うことができるが；2000塩基対を越える長さのクローンは、単純な検出に対して十分なシグナル強さを有する独特の染色体位置に結合する見込みが高い。FISHには、PROポリペプチドをコードする遺伝子を誘導するクローンの使用が必要であり、長くなればなる程良好になる。例えば、2000塩基対で良好であり、4000塩基対でより好ましく、4000を越えても、時間の合理的なパーセンテージの良好な結果を得るのには、おそらく必要ではない。この技術のレビューについては、Verma等、Human Chromosomes ; a Manual of Basic Techniques(Pergamon Press, New York, 1988)を参照されたい。

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間

10

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)。

20

【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

30

する、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。

【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。

40

【0151】

50

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ポリペプチドに結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Chevray及びNathans, Proc.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(Fiels及びSong, Nature(London) 340, 245-246 (1989); Chien等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991))に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより監視することができる。酵母菌GAL4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系(一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる)は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-lacZリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、 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つの特定の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を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。

PROポリペプチドが同時有糸分裂促進物質ConAの存在下で内皮細胞の増殖を刺激する能力を有している場合、スクリーニング方法の一例では、この能力の利点を利用される。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, Warrington, 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。

【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。

10

【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。

20

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-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。

30

【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ピボでmRNAにハイブリッド形成してmRNA分子のPROポリペプチドへの翻訳を阻止する(アンチセンス-Okano, *Neurochem.*, 56: 560 (1991); *Oligodeoxy nucleotides 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D

40

50

NA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。

【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。

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W0 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W0 97/33551を参照されたい。

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

【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む。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、肥大型心筋症、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。

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。

【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-Schonlein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。

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を害している。Griener等, Lymphology, 4: 140-144 (1971)。

【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關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、胃癌腫、食道癌腫、結腸直腸癌腫、肝臓癌腫、卵巣癌腫、テコマ、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、脾臓癌腫、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) に關連した異常な血管増殖、浮腫(例えば脳腫瘍に關連したもの)、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關連しているため、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。

【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。

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、血管不全に關連した潰瘍、外科的又は外傷的な傷等を含む治癒していない傷を、より良好により早く閉塞させることを促進させるのに有用である。

またさらに、PROポリペプチド又はそのアンタゴニストは、他の組織、例えば器官(例えば、脾臓、肝臓、腸、腎臓、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。

【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。

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癒に適用される。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】

PROポリペプチド又はそのアンタゴニストは神経細胞の増殖、及び神経及び脳組織の再生、すなわち神経細胞又は神経組織の変性、死亡又は外傷に関与する中枢及び末梢神経系の病気及び神経障害、並びに機械的又は外傷的疾患の治療に有用である。特に、PROポリペプチド又はそのアンタゴニストは、末梢神経系の病気、例えば末梢神経損傷、末梢神経障害及び局所的神経障害、及び中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、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、PRO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、PRO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PROポリペプチド又はそのアンタゴニストは、肥大性心筋症と診断された患者のかなりの部分に発現する、心房細動の治療に有用である。

さらなる徴候には、アンギナ、心筋梗塞、例えば急性心筋梗塞、及び心不全、例えば鬱血性心不全が含まれる。さらなる、非新生物病状には乾癬、糖尿病、及び時期尚早の網膜症、水晶体後方繊維増殖症、新血管緑内障を含む他の増殖性網膜症、甲状腺過形成(グレーブス病を含む)、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、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

10

20

30

40

50

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. 投与プロトコール、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；E D T A等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Z n-タンパク質錯体)；及び／又はT W E E N^{T M}、P L U R O N I C S^{T M}又はポリエチレングリコール(P E G)等の非イオン性界面活性剤を含む。

【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。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、P R O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P R O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。P R O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、P R O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。P R O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) P R Oポリペプチド又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニスト；
 - 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p H、好ましくは約4-8のp Hを維持可能なバッファー；
 - c) 主として、攪拌誘発性集合体に対しポリペプチド又は分子を安定化させる洗浄剤／界面活性剤；
 - d) 等張剤；
 - e) フェノール、ベンジルアルコール及びベンゼトニウムハロゲン化物、例えば塩化物の群から選択される防腐剤；及び
 - f) 水；
- を含有し得る。

【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、EP257,956を参照されたい)。

等張剤は、P R O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。

バッファーは、所望するp Hに応じて、アセタート、シタラート、スクシナート又はホスファートバッファーであってよい。本発明の液体製剤の一タイプのp Hは、約4から8の範囲、好ましくはほぼ生理学的p H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P R Oポリペプチド組成物は、一般的に無菌のアクセスポートを具備する容器、例えば、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針で穿孔可能なストッパーを具備するバイアルに配される。製剤は、好ましくは繰り返し静脈内(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、P R Oポリペプチドは持続放出製剤の形態で投与することもできる。持続放出製剤の好適な例は、タンパク質を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、当該マトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、Langer等, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981)及びLanger, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)に記載されたようなポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール)、ポリアクチド(米国特許第3,773,919号、EP 58,481)、L-グルタミン酸及びガンマエチル-L-グルタメートのコポリマー(Sidman等, Biopolymers, 22: 547-556 (1983))、非分解性エチレン-酢酸ビニル(Langer等, 上掲)、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLupron 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

10

20

30

40

50

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ったら、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。

P R Oポリペプチドの持続放出組成物は、リポソーム的に封入されたP R Oポリペプチドを含む。P R Oポリペプチドを含有するリポソームは、それ自体周知である方法、例えば、DE 3,218,121、Epstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985)、Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4034 (1980) ; EP 52,322 ; EP 36,676 ; EP 88,046 ; EP 143,949 ; EP 142,641 ; 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。

【0172】

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

上記の指針では、有効投与量は、一般的に約0.001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P R O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、P R O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 Biologics standardsで要求されるようにして精製される。

組織再生に使用されるP R O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I G F - 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。

【0174】

P R Oポリペプチド又はアンタゴニスト又はアゴニスト投与の経路は周知の方法に従い、

例えば静脈内、筋肉内、脳内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、眼内、関節内、滑膜内、包膜内、経口、局所又は吸入経路による注射又は注入、あるいは以下に記載する持続放出系による。またPROポリペプチド又はそれらのアンタゴニストは腫瘍内、腫瘍周辺、病巣内、又は病巣周辺経路で好適に投与され、局所的並びに全身に治療効果を発揮する。腹腔内経路は、例えば卵巣腫瘍の治療に特に有用であることが期待される。

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。

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癒及び組織の修復に適している。好ましくは、骨及び／又は軟骨の形成のためには、組成物は、骨及び／又は軟骨のダメージ部位にタンパク質含有組成物を送達せしめ、好ましくは体内に再吸収可能な骨及び軟骨を発育する構造体を提供することのできるマトリクスを含む。このようなマトリクスは他の移植医療用途に使用される材料で作成される。

【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。生物セラミックスは組成において、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。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(ヒドロキシアリ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。

【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

10

20

30

40

50

される量は、治療薬をPROポリペプチドと共に投与しない場合と同じ用量である。

【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

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。

20

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、PROポリペプチド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫化剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に抱合させるのが有用である。このような免疫原タンパク質の例は限られないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びMPL-TDMアジュバント(モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコラート)が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

30

【0180】

i i . モノクローナル抗体

あるいは、抗-PRO抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature, 256:495 (1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用することで調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫化剤により免疫化することで、免疫化剤に特異的に結合する抗体を生成するかあるいは生成可能なリンパ球を誘発する。また、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。

40

免疫化剤は、典型的にはPROポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「PBL」)が使用され、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する。Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, (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。通常、ラット又はマウスの骨髓腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。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

50

フェラーゼ(HGPRT又はHPRT)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】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髓腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴの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髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓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髓腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより(米国特許第4,816,567号; Morrison等, 上掲)、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

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

一価抗体の調製にはインビトロ法がまた適している。抗体の消化による、その断片、特に

F a b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-P R O抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片(例えばF v、F a b、F a b'、F(a b')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C D Rの残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のC D Rの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのF vフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたC D Rもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのC D R領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのF R領域がヒト免疫グロブリン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(F c)、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C D R又はC D R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C D R残基及び場合によっては幾つかのF R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。

【0186】

i v. 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

10

20

30

40

50

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。

10

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。

【0187】

v. ヘテロ抱合抗体

20

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4,676,980号に開示されているものが含まれる。

【0188】

vi. エフェクター機能の加工

30

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌治療における抗体の有効性を向上させるのが望ましい。例えば、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させるようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上した内部移行能力及び／又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存性細胞毒性(ADCC)を有する。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体はまた、Wolff等, Cancer research 53: 2560-2565 (1993)に記載されたような異種二官能性架橋を用いても調製する。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。

40

【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(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカナ(Phytolaca americana)タンパク質(PAPI、

50

P A P I I、及び P A P - S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crocin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapao naria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)を含む。様々な放射性ヌクレオチドが放射性抱合抗体の生成に利用可能である。例として、 ^{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(S P D P)、イミノチオラン(I T)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートH C L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(M X - D T P A)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。W O 94/11026参照。

他の実施態様では、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】

v i i i . 免疫リポソーム

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

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びP E G-誘導ホスファチジルエタノールアミン(P E G - P E)を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、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F a b '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。

【0191】

i x . 抗体の製薬組成物

ここで同定されるP R O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。

P R O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D N A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。

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に1以上の活性化化合物、好ましくは

互いに悪影響を及ぼさない相補的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。

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。

10

【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。

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

20

【0193】

x. 抗体を使用する治療方法

PRO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。

抗体は、哺乳動物、好ましくはヒトに、周知の方法、例えば、ボーラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入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。

30

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

40

また、抗体を癌の治療に使用する場合、他の腫瘍関連抗原に対する抗体、例えば一又は複数のErbb2、EGFR、Erbb3、Erbb4、又はVEGFレセプターに結合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

50

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

【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の有効量で、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-、ベータ-又はガンマ-インターフェロン、抗-H E R 2抗体、ヘレグリン(heregulin)、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W091/01753)、又は熱又は放射線を単独で、又は組合せて投与する。

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-P R Oポリペプチド抗体及びT N F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-P R Oポリペプチド抗体は、T N F、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、F G F又はP D G Fアンタゴニスト、例えば抗-F G F又は抗-P D G F中和剤は、抗-P R Oポリペプチド抗体と共に患者に投与される。抗-P R O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-P R O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、P R

10

20

30

40

50

Ｏ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)

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。幾つの場合には、コンセンサス配列が約1-1.5kb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の場合には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、

10

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、NotI部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSalIヘミキナーゼアダプターに結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動で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(pRK5B又はpRK5D等；pRK5BはSfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である；Holmes等、Science, 253: 1278-1280 (1991)参照)に、独特のXhoI及びNotI部位において、所定の方向でクローニングした。

【0200】

20

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。

30

【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。

40

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

50

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 DNA 19355-1150-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%)、Fas/Apo-リガンド (19.0%)、TNF-アルファ (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); Lewit-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。DNA 19355-1150-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。

【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：

5'-ACTTCTCAGTGTCCATAAGGG-3' (配列番号：35)

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

5'-CACACAGCGTTTAACCAGG-3' (配列番号：37)

5'-ACAACAGGCACAGTTCCCAC-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 からのものである。市販試薬を用いて標準的方法によって形成した。cDNA は、NotI 部位を含むオリゴ dT でプライムし、SalI ヘミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、NotI で切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター (pRKB 又は pRKD 等；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。DNA 29101-1122 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 DNA 29101-1122 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。

クローンDNA29101-1122は1998年3月5日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209653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。

Fig 4 (配列番号：4)に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析法を用いたDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の分析により、PRO200アミノ酸配列と血管内皮細胞成長因子(VEGF)及び骨形態形成タンパク質(VEGF-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PRO198をコードするcDNAクローンの単離

PRO198をコンピュータプログラムBLAST(Altschulら, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いてGenbank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。PRO198配列は既知のEST配列T57280及びT50719と相同性を有することが示された。既知のEST配列で、全長配列として同定されているか、又はTIE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、Clontech, Inc., (Palo Alto, CA)から購入したmRNA、カタログ番号#6528-1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'-TGGTTGGCAAAGGCAAGGTGGCTGACGATCCGG-3' (配列番号：39)

5'-GTGGCCCTTATCTCTCCTGTACAGCTTCCGGATCGTCAGCCAC-3' (配列番号：40)

5'-TCCATTCACCTATGACGCTGACCCA-3' (配列番号：41)

cDNAクローンを同定し、全体を配列決定した。DNA33457-1078の全ヌクレオチド配列をFig 5 (配列番号：5)に示す。クローンDNA33457-1078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33-35に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置897-899に停止コドンを持つ(Fig 5；配列番号：5)。予測されるポリペプチド前駆体は288アミノ酸長である。全長PRO198タンパク質をFig 6 (配列番号：6)に示す。

Fig 6 (配列番号：6)に示した全長PRO198配列の分析により、Fig 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、上記の通りおよそそのものである。全長PRO198配列(Fig 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16のシグナルペプチド；約アミノ酸178～約アミノ酸182のN-グリコシル化部位；約アミノ酸272～約アミノ酸276のグリコサミノグリカン付着部位；約アミノ酸188～約アミノ酸197のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸16～約アミノ酸22、約アミノ酸89～約アミノ酸95、約アミノ酸144～約アミノ酸150、及び約アミノ酸267～約アミノ酸273のN-ミリスチル化部位；及び約アミノ酸242～約アミノ酸255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DNA33457-1078は1997年9月18日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209283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 6 (配列番号：6)に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析法を用いたDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の分析により、PRO198アミノ酸配列とTIE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。「TIE

」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(tyrosine kinase containing I g and E G F homology domains)」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 クローンの単離

発現配列タグ(E S T) D N A データベース(LIFESEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA)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 Incyte EST 配列(Incyte EST 番号3003460)を同定した。

次に、BLAST(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))及び「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)の繰り返しサイクルを用いて Incyte 3003460 EST 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「<concen01>」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「<concen01>」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ーンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドプローブを合成した。正方向及び逆方向 P C R プライマーは一般的に20から30ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約100-1000bp長のP C R産物を与えるように設計される。プローブ配列は典型的には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D N Aを上掲のAusubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、P C R プライマー対でのP C R増幅によりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリーを、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。

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):

5'-CACAGCACGGGGCGATGGG-3'(配列番号: 4 2)

正方向 P C R プライマー(4 4 8 2 5 . f 2):

5'-GCTCTGCGTTCTGCTCTG-3'(配列番号: 4 3)

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

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

逆方向 P C R プライマー(4 4 8 2 5 . r 1):

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

逆方向 P C R プライマー(4 4 8 2 5 . r 2):

5'-CGCTGACCCAGGCTGAG-3'(配列番号: 4 6)

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

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

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'-GAGGAGTGCTGTTCCGAGTGGGACTGCATGTGTGTCAGC-3'(配列番号: 4 8)

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

5'-AGCCTGGGTGTCAGCGCCCCACCGGGGTCCCGGTGCGGCC-3'(配列番号: 4 9)

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D N Aを上で同定したP C R プライマー対でP C R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P C R プライマー対の一方を用いてP R O 3 6 4 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】

c D N A ライブラリーの構築のためのR N Aはヒト小腸組織(LIB231)から単離した。c D

10

20

30

40

50

N A クローンを単離するために用いた c D N A ライブラリーは、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。c D N A は、N o t I 部位を含むオリゴ d T でプライムし、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ニングベクター (p R K B 又は p R K D 等; p R K 5 B は、S f i I 部位を持たない p R K 5 D の前駆体である; Holmes 等, Science, 253:1278-1280 (1991) を参照されたい) に独特の X h o I 及び N o t I 部位においてクローン化した。

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

F i g 8 (配列番号: 8) に示した全長 P R O 3 6 4 配列の分析により、F i g 8 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 P R O 3 6 4 配列 (F i g 8 ; 配列番号: 8) の分析により、以下の存在が明らかになった: 約アミノ酸 1 ~ 約アミノ酸 2 5 のシグナルペプチド; 約アミノ酸 1 6 2 ~ 約アミノ酸 1 8 0 の潜在的膜貫通ドメイン; 約アミノ酸 1 4 6 ~ 約アミノ酸 1 5 0 の N - グリコシル化部位; 約アミノ酸 5 ~ 約アミノ酸 1 1、約アミノ酸 8 ~ 約アミノ酸 1 4、約アミノ酸 2 5 ~ 約アミノ酸 3 1、約アミノ酸 3 0 ~ 約アミノ酸 3 6、約アミノ酸 3 3 ~ 約アミノ酸 3 9、約アミノ酸 1 1 8 ~ 約アミノ酸 1 2 4、約アミノ酸 1 2 2 ~ 約アミノ酸 1 2 8、約アミノ酸 1 5 6 ~ 約アミノ酸 1 6 2 の N - ミリスチル化部位; 約アミノ酸 1 6 6 ~ 約アミノ酸 1 7 7 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 1 7 1 ~ 約アミノ酸 1 9 3 のロイシンジッパーパターン。

クローン D N A 4 7 3 6 5 - 1 2 0 6 は 1 9 9 7 年 1 1 月 7 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 4 3 6 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 P R O 3 6 4 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 P R O 3 6 4 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。P R O 3 6 4 の細胞内ドメインは、T R A F 2 結合に必要であることが示された C D 3 0 内、そして T N F R 2 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 2 0 7 - 2 1 4 の領域内) を含む。T N F R 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 C R D は、T N F R 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 G I T R に比較すると、マウス G I T R の C R D 1 における 5 つのシステインに対して P R O 3 6 4 アミノ酸配列は C R D 1 に 8 個のシステインを有し、マウス G I T R における 4 つの潜在的な N - 結合グリコシル化部位に比較して E C D 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 P R O 3 6 4 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 G I T R (m G I T R) タンパク質との配列相同性が明らかとなる。従って、P R O 3 6 4 は Nocentini 等によって報告されたマウス G I T R 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 P R O 3 5 6 をコードする c D N A クローンの単離

発現配列タグ (E S T) D N A データベース (LIFESEQ (登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA) を検索し、T I E リガンドファミリーと相同性を示す E S T (#2939340)

10

20

30

40

50

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(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。

10

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。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。

20

使用したオリゴヌクレオチド配列は次の通りである:

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

5'-TGTGCACACTTGTCCAAGCAGTTGTCATTGTC-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の全ヌクレオチド配列をFig9 (配列番号: 9)に示す。クローンDNA47470-1130-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。

30

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PRO356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、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-ミリスチン化部位; 約アミノ酸199~約アミノ酸202の細胞接着配列。

40

クローンDNA47470-1130-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。

Fig10 (配列番号: 10)に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析法を用いた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

50

ために作られた。

【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。

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Fig11(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(Fig11)。予測されるポリペプチド前駆体は201アミノ酸長である(Fig12; 配列番号: 12)。Fig12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。

Fig12(配列番号: 12)に示した全長PRO535配列の分析により、Fig12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-シグネチャー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。

Fig12(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, FKB2_HUMAN, CELC05C8_1, S55383, S72485, CELC50F2_6及びS75144。

【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 Enzym

ology 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。

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Fig13(配列番号:13)に示し、ここでDNA57695-1340と命名する。

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(Fig13)。予測されるポリペプチド前駆体は52アミノ酸長である(Fig14;配列番号:14)。Fig14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。

Fig14(配列番号:14)に示した全長PRO819配列の分析により、Fig14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、上記のようにおよそそのものである。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。

Fig14(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, HUM IGLITEB_1, VG28_HSVSA, AF031522_1, PAD1_YEAST及びAF045484_1。

【0209】

実施例10:ヒトPRO1002をコードするcDNAクロンの単離
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。

【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1-1.5kb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'-TCCTGTGAGCACGTGGTGTG-3'(35726.f1；配列番号：53)

5'-GGGTGGGATAGACCTGCG-3'(35726.f2；配列番号：54)

5'-AAGGCCAAGAAGGCTGCC-3'(35726.f3；配列番号：55)

5'-CCAGGCCTGCAGACCCAG-3'(35726.f4；配列番号：56)

逆方向PCRプライマー：

5'-CTTCCTCAGTCCTTCCAGGATATC-3'(35726.r1；配列番号：57)

5'-AAGCTGGATATCCTCCGTGTTGTC-3'(35726.r2；配列番号：58)

5'-CCTGAAGAGGCATGACTGCTTTTCTCA-3'(35726.r16.mm；配列番号：59)

5'-GGGGATAAACCTATTAATTATTGCTAC-3'(35726.r15.mm；配列番号：60)

さらに、コンセンサスDNA35726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'-AACGTCACCTACATCTCCTCGTGCCACATGCGCCAGGCCACCTG-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。

【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、

10

20

30

40

50

N o t I 部位を含むオリゴd Tでプライムし、S a l Iヘミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、N o t Iで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター(p R K B又はp R K D等；p R K 5 Bは、S f i I部位を持たないp R K 5 Dの前駆体である；Holmes等，Science，253:1278-1280 (1991)を参照されたい)に独特のX h o l及びN o t I部位においてクローン化した。

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、DNA 6 2 3 0 6 - 1 5 0 7 [F i g 1 7、配列番号：1 7])の全長DNA配列；及びP R O 1 3 0 8の誘導タンパク質配列が得られた。

P R O 1 3 0 8の全コード化配列をF i g 1 7(配列番号：1 7)に示す。クローンDNA 6 2 3 0 6は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置1 7 - 1 9 10
に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置8 0 6 - 8 0 8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2 6 3アミノ酸長である。F i g 1 8に示す全長P R O 1 3 0 8タンパク質は約2 7, 6 6 3ダルトンの推定分子量及び約6 . 7 7のp Iを持つ。さらなる特徴には、約アミノ酸1 - 2 0のシグナルペプチド、約アミノ酸7 3 - 7 7及び2 1 5 - 2 1 9の潜在的N-グルコシル化部位、及び約アミノ酸9 7 - 1 3 0及び1 6 9 - 2 0 2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。

F i g 1 8(配列番号：1 8)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、P R O 1 3 0 8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P R O 1 3 0 8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_H 20
UMAN, P_R20063, CELT13C2_1, AGRI_ RAT, p_W09406, G01639, SC1_RAT, S60062, S51362, 及びIOV7_CHICK。

クローンDNA 6 2 3 0 6 (U N Q 6 7 4)は1 9 9 8年9月9日にA T C Cに寄託され、A T C C寄託番号2 0 3 2 5 4が付与された。

【0 2 1 2】

実施例 1 2

ヒトP R O 1 3 0 4をコードするc D N A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E S T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DNA 3 5 7 4 5と命名する。DNA 3 5 7 4 5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 30
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 1 3 0 4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。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(3 5 7 4 5 . f 1)：

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

正方向P C Rプライマー(3 5 7 4 5 . f 2)：

5'-GACATGGACAATGACAGG-3'(配列番号：6 3)

正方向P C Rプライマー(3 5 7 4 5 . f 3)：

5'-CCTTTCAGGATGTAGGAG-3'(配列番号：6 4)

正方向P C Rプライマー(3 5 7 4 5 . f 4)：

5'-GATGCTGCCACCCCAAG-3'(配列番号：6 5)

逆方向P C Rプライマー(3 5 7 4 5 . r 1)：

5'-GCATCCTGATATGACTTGTCACGTGGC-3'(配列番号：6 6)

逆方向P C Rプライマー(3 5 7 4 5 . r 2)：

5'-TACAAGAGGGAAGAGGAGTTGCAC-3'(配列番号：6 7)

さらに、コンセンサスDNA 3 5 7 4 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(3 5 7 4 5 . p 1)：

5'-GCCCATTATGACGGCTACCTGGCTAAAGACGGCTCGAAATTCTACTGCAG-3'(配列番号：6 8)

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 50

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。

【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FKBP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DNA65406-1567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。

DNA65406-1567配列は、IncyteEST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(7.5×10^4 /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CO₂を必要とする。活性基準：1-100 μ Mのフェニルエフリン(phenylephrine)、0.1-1.0 μ MのPGF-2アルファ、1-10nMのエンドセリン、1-10nM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(2.44gm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、1/1000(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。

PRO183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14

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PROポリペプチドが副腎皮質毛細管内皮細胞(ACE)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)。

ウシ副腎皮質毛細管内皮(ACE)細胞(初代培養からのもの、最大12-14継代)を96ウェルのプレートにおいて100マイクロリットル当たり500細胞/ウェルでプレーティングした。アッセイ媒体は、低グルコースDMEM、10%子ウシ血清、2mMグルタミン、及び1xペニシリン/ストレプトマイシン/ファンギゾンを含む。対照ウェルは以下を含む：(1)ACE細胞無添加；(2)ACE細胞のみ；(3)ACE細胞+VEGF(5ng/ml)；及び(4)ACE細胞+FGF(5ng/ml)。次いで、対照及び試験試料(100マイクロリットル容量)をウェルに添加した(各々、1%、0.1%及び0.01%希釈)。細胞培地を37°C/5%CO₂で6-7日間インキュベートした。インキュベーションの後、ウェル中の培地を吸引して細胞をPBSで1x洗浄した。次いで、酸ホスファターゼ反応混合物(100マイクロリットル、0.1M酢酸ナトリウム、pH5.5、0.1%トリトンX-100、10mMのリン酸p-ニトロフェニル)を各ウェルに添加した。37°Cで2時間のインキュベーション後に、10マイクロリットルの1NのNaOHの添加により反応を停止させた。光学密度(OD)を405nmでマイクロプレートリーダーで測定した。

PRO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)VEGFによる最大阻害に対する(酸ホスファターゼ活性、OD405nm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VEGF(3-10ng/ml)及びFGF(1-5ng/ml)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>=50%である場合に「陽性」と考えた。VEGF(5ng/ml)対照は1%希釈において1.24倍の刺激を与え；FGF(5ng/ml)対照は1%希釈において1.46倍の刺激を与えた。

PRO1710はこのアッセイにおいて陽性と検定された。

【0216】

実施例15

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

内皮細胞のVEGF刺激増殖を阻害する様々なPROポリペプチドの能力を試験した。

このアッセイで陽性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(ACE)細胞(初代培養からのもの、最大12-14継代)を96ウェルのプレートにおいて100マイクロリットル当たり500細胞/ウェルでプレーティングした。アッセイ媒体は、低グルコースDMEM、10%子ウシ血清、2mMグルタミン、及び1xペニシリン/ストレプトマイシン/ファンギゾンを含む。対照ウェルは以下を含む：(1)ACE細胞無添加；(2)ACE細胞のみ；(3)ACE細胞+5ng/ml FGF；(4)ACE細胞+3ng/ml VEGF；(5)ACE細胞+3ng/ml VEGF+1ng/ml TGF- β ；及び(6)ACE細胞+3ng/ml VEGF+5ng/ml LIF。次いで、試験試料、ポリ-HisタグPROポリペプチド(100マイクロリットル容量)をウェルに添加した(各々、1%、0.1%及び0.01%希釈)。細胞培地を37°C/5%CO₂で6-7日間インキュベートした。インキュベーションの後、ウェル中の培地を吸引して細胞をPBSで1x洗浄した。次いで、酸ホスファターゼ反応

10

20

30

40

50

混合物(100マイクロリットル、0.1M酢酸ナトリウム、pH5.5、0.1% トリトンX-100、10mMのリン酸 p-ニトロフェニル)を各ウェルに添加した。37℃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、(OD405nmでの酸性ホスファターゼ活性を測定したときの)VEGF(3ng/ml)刺激増殖の阻害パーセントとして計算した。TGF-ベータは、VEGF-刺激ACE細胞増殖の70-90%をブロックするため、TGF-ベータを1ng/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1ng/mlのTGF-βにより得られた阻害パーセントでそのパーセントを割ることにより決定される。結果は、PROポリペプチドが内皮細胞成長のVEGF刺激の30%又はそれ以上の阻害を示した場合(30%以上の相対的阻害)を陽性と考えた。

PRO183及びPRO202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)。

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。

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b-DNAウェルに添加し、少なくとも30分インキュベートした。細胞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。

【0218】

次の日に、bDNAキットプロトコールの第2の部分に従った。特に、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。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。A L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)(20fm/μl)を作成することにより50μl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。50μl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℃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、A L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(40pmoles/μl)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。50μlの標識プローブ作用液を各ウェルに添加し、ウェルを53℃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3μl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。50μl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℃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。

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/H E P E S 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。P R O 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1.00RLU。陽性対照=1.00%希釈で8.39RLU。

このアッセイにおいてP R O 8 6 1は陽性と検定された:

【0219】

実施例19

F 2 a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P R O 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P R O 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180μl、血清<0.1%、新たに単離)をDMEM/F12+4%FCSで予めコートした96ウェルプレートに1日目に添加した。試験P R O ポリペプチド(20μl/ウェル)を含有する試験試料を1日目にウェルに直接添加した。次いで2日後にP G F(20μl/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、陰性対照に比較してサイズの増加を示さない細胞を0.0とスコア付けし、陰性対照に比較してサイズの小さな増加を示す細胞を1.0とスコア付けし、陰性対照に比較してサイズの大きな増加を示す細胞を2.0とスコア付けした。1.0又はそれ以上のスコアを陽性と考えた。

アッセイ反応にC a濃度が重要であるためP B Sは含有しない。プレートはDMEM/F12+4%FCS(200μl/ウェル)でコートした。アッセイ媒体は以下を含む: DMEM/F12(2.44gmの重炭酸塩を含む)、10μg/mlのトランスフェリン、1μg/mlのインシュリン、1μg/mlのアプロチニン、2mmol/Lのグルタミン、100U/mlのペニシリンG、100μg/mlのストレプトマイシン。マンニトール(4%)を含むタンパク質バッファーは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P R O 1 8 3及びP R O 2 0 2は陽性と検定された。

【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P R O 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ウェルマイクロタータープレート(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でプレーティングした。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3 x 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 ^3S -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。 ^3S -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 CO_2 を必要とする。

活性基準: 0.1nM 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、1/1000(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。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継代未満のHUV E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

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-(11×10^3 細胞/ cm^2 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30 μ l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°Cにおいて1000rpmで5分間スピンさせた。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、5 μ l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100 μ lで標準的な成長培地にプレーティングした。次にPROポリペプチド、 β -FGF(陽性対照)又は何ものなし(陰性対照)を、最終的な全容量200 μ lで、1 μ g/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°C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(100 μ l/ウェル)を添加する。次に細胞を37°Cで2時間インキュベートする。ウェル当たり10 μ l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

内皮細胞成長(HUVEC)のbFGF刺激性増殖の阻害(アッセイ#104)

内皮細胞のbFGF刺激性増殖を阻害する種々のPRO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199(Sigma)w/2%FBS(Hyclone)中のHUVEC細胞を100マイクロリットル当たり500細胞/ウェルで、96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: EGMプラス1xPen Strepプラス1xL-グルタミンプラス10%FBS アッセイ用培地: 培地199プラス2%FBSプラス50ng/ml bFGF。2日目、タンパク質を、bFGF(50mg/ml)の存在下、3つの濃度(1%、0.1%、0.01%)に希釈し、細胞に添加した。次の工程は、Boehringer Mannheim BrdU Cell Proliferation ELISA(Cat No.1637229)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BrdU(最終濃度10 μ M)で標識した。4日目、細胞を固定し、DNAを30分間FixDenatを添加することにより変性させた。FixDenatを取り除き、2時間後に抗-BrdU-POD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、1MのH₂SO₄を用いて反応を停止した。吸光度(OD)をマイクロプレートにより405nmで測定した。

HUVEC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。

【0225】

実施例23

内皮細胞アポトーシスの誘導(E L I S A)(アッセイ#109)

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、100ng/mlのV E G F、0.1%のB S A、1Xpenn/strepを補充した0%血清培地中で96ウェルフォーマットを使用して、ヒト静脈の臍静脈内皮細胞(HUVEC, Cell Systems)中で試験した。使用した96ウェルプレートはFalconにより製造された(番号3072)。96ウェルのコーティングは、P B S溶液中の0.2%ゼラチン100μlで>30分間ゼラチン化を起こすことにより調製した。10%血清含有培地中で最終濃度 2×10^4 細胞/mlの最終濃度ーウェル当たり100μl容量でプレ

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24時間成長させた。全てのウェルに、100ng/mlのV E G F、0.1%のB S A、1Xpenn/strepを補充した0%血清培地中100μl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%、0.33%及び0.11%の希釈で三つ組で添加した。細胞の無いウェルをブランクとして使用し、細胞だけのウェルを陰性対照として使用した。陽性対照として、3x原液のスタウロスポリンの50μl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24から35時間インキュベートした。

E L I S Aを、Boehringer マニュアル [Boehringer, 細胞死検出ELISA plus, カタログ番号1920685] に従ってアポトーシス調製溶液のレベルを決定するのに使用した。試料調製: 96ウェルプレートを1krpmで10分間スピン沈降させ(200g)、高速反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、200μlの1x溶菌バッファーを添加して振盪させずに30分間室温でインキュベートした。プレートを1krpmで10分間スピン沈降させ、20μl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。80μlの免疫試薬混合物を各ウェルで20μl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(200rpm)に配することにより2時間室温でインキュベートした。2時間後、上清を吸引により除去し、ウェル当たり250μl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(100μl)、軌道振盪機で室温において250rpmで、光度測定分析に十分な発色がされるまでインキュベートした(約10-20分後)。参照波長492nmとして405nmでプレートを読むのに96ウェルリーダーを用いた。P I N 3 2(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。P R O 8 7 7は、上記のE L I S A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】

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m R N A合成における変化の追跡及び染色体マッピングにおける補助に有用である。

インサイツハイブリッド形成は、Lu及びGillett, Cell Vision 1: 169-176 (1994)のプロトコルの最適化バージョンに従って、P C R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(20g/ml)で15分間37℃で脱タンパクし、さらに上掲のLu及びGill

ettに記載されたようにインサイツハイブリッド形成する。 $(^3\ ^3\text{-P})\text{UTP}$ -標識アンチセンスリボプローブをPCR産物から生成し、 55°C で終夜ハイブリッド形成する。スライドをKodak NTB2TM核トラックエマルジョンに浸漬して4週間露出する。

【0227】

$^3\ ^3\text{P}$ -リボプローブ合成

$6.0\ \mu\text{l}$ (125mCi)の $^3\ ^3\text{P}$ -UTP(Amersham BF 1002, $\text{SA}<2000\ \text{Ci}/\text{mmol}$)をスピード真空乾燥させた。乾燥 $^3\ ^3\text{P}$ -UTPを含む各管に以下の成分を添加した：

$2.0\ \mu\text{l}$ の5x転写バッファー

$1.0\ \mu\text{l}$ のDTT(100mM)

$2.0\ \mu\text{l}$ のNTP混合物(2.5mM: 各 $10\ \mu\text{l}$ の10mM GTP, CTP及びATP+ $10\ \mu\text{l}$ の H_2O)

$1.0\ \mu\text{l}$ のUTP(50 μM)

$1.0\ \mu\text{l}$ のRNAsin

$1.0\ \mu\text{l}$ のDNAテンプレート(1 μg)

$1.0\ \mu\text{l}$ の H_2O

$1.0\ \mu\text{l}$ のRNAポリメラーゼ(PCR産物についてT3=AS, T7=S, 通常)

管を 37°C で1時間インキュベートし、 $1.0\ \mu\text{l}$ のRQ1 DNaseを添加し、次いで 37°C で15分間インキュベートした。 $90\ \mu\text{l}$ のTE(10mMトリスpH7.6/1mMのEDTA pH8.0)を添加し、混合物をDE81紙にピペットした。残りの溶液をMICROCON-50限外濾過ユニットに負荷し、プログラム10を用いてスピンさせた(6分間)。濾過ユニットを第2の管に変換し、プログラム2を用いてスピンさせた(3分間)。最終回収スピンの後、 $100\ \mu\text{l}$ のTEを添加し、次に $1\ \mu\text{l}$ の最終生成物をDE81紙にピペットし6mlのBIOFLUOR IITMで数えた。

プローブをTBE/尿素ゲル上で走らせた。 $1\text{-}3\ \mu\text{l}$ のプローブ又は $5\ \mu\text{l}$ のRNA Marker IIを $3\ \mu\text{l}$ の負荷バッファーに添加した。加熱ブロック上で 95°C 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(SARANTMブランド)、 -70°C 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。

【0228】

$^3\ ^3\text{P}$ -ハイブリッド形成

A. 凍結切片の前処理

スライドを冷凍機から取り出し、アルミニウムトレイに配置して室温で5分間解凍した。トレイを 55°C 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、 $0.5\times\text{SSC}$ で5分間室温で洗浄した($25\text{ml } 20\times\text{SSC} + 975\text{ml } \text{SQ } \text{H}_2\text{O}$)。 $0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のプロテイナーゼK中、 37°C 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 $10\text{mg}/\text{ml}$ ストック $12.5\ \mu\text{l}$)、切片を $0.5\times\text{SSC}$ で10分間室温で洗浄した。切片を、70%、95%、100%エタノール中、各2分間脱水した。

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、 $\text{SQ } \text{H}_2\text{O}$ 中に配置し、 $2\times\text{SSC}$ で室温において各々5分間2回リンスした。切片を $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のプロテイナーゼK(250ml のRNase無しRNaseバッファー中 $10\text{mg}/\text{ml}$ を $500\ \mu\text{l}$ ； 37°C 、15分間)ーヒト胚組織又は $8\times$ プロテイナーゼK(250ml のRNaseバッファー中 $100\ \mu\text{l}$ 、 37°C 、30分間)ーホルマリン組織で脱タンパクした。続く $0.5\times\text{SSC}$ 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($4\times\text{SSC}$ 、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 $50\ \mu\text{l}$ のハイブリッド形成バッファー(3.75g デキストラン硫酸+ $6\text{ml } \text{SQ } \text{H}_2\text{O}$)で被覆し、ボルテックスし、キャップを外して2分間マイクロ波で加熱した。氷上で冷却した後、 18.75ml のホルムアミド、 3.75ml の $20\times\text{SSC}$ 及び 9ml の $\text{SQ } \text{H}_2\text{O}$ を添加し、組織を良くボルテックスし、 42°C で1-4時間インキュベートした。

D. ハイブリッド形成：

スライド当たり 1.0×10^6 cpmのプロープ及び $1.0 \mu\text{l}$ の t R N A (50mg/mlストック)を 95°C で3分間加熱した。スライドを氷上で冷却し、スライド当たり $48 \mu\text{l}$ のハイブリッド形成バッファーを添加した。ボルテックスの後、 $50 \mu\text{l}$ の ^3H 混合物をスライド上のプレハイブリッド $50 \mu\text{l}$ に添加した。スライドを 55°C で終夜インキュベートした。

E. 洗浄：

洗浄は、 $2\times\text{SSC}$ 、EDTAで 2×10 分間、室温で実施し(400mlの $20\times\text{SSC}+16\text{ml}$ の 0.25M EDTA、 $V_f=4\text{L}$)、次いでRNAse A処理を 37°C で30分間行った(250ml RNAse バッファー中10mg/mlを $500 \mu\text{l}=20 \mu\text{g/ml}$)。スライドを 2×10 分間、 $2\times\text{SSC}$ 、EDTAで室温において洗浄した。緊縮性洗浄条件は次の通り： 55°C で2時間、 $0.1\times\text{SSC}$ 、EDTA (20 mlの $20\times\text{SSC}+16\text{ml}$ のEDTA、 $V_f=4\text{L}$)。 10

【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ITS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'-TGAATTAACCTCACTAAAGCAGTGCAATGCAGGGGACTA-3' (配列番号：70) 20

(2) DNA 29101-1122 (PRO200)

p1：

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCGGCGGAATCCAACCTGAGTAG-3' (配列番号：71)

p2：

5'-CTATGAAATTAACCTCACTAAAGGGAGCGGCTATCCTCCTGTGCTC-3' (配列番号：72)

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

p1：

5'-CTATGAAATTAACCTCACTAAAGGGAGCGGCTATCCTCCTGTGCTC-3' (配列番号：73)

p2：

5'-CTATGAAATTAACCTCACTAAAGGGATCTCCAGCCGCCCTTCTC-3' (配列番号：74) 30

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

p1：

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCAGCAAAAGAAGCGGTGGTG-3' (配列番号：75)

p2：

5'-CTATGAAATTAACCTCACTAAAGGGATTGAGCAGCCAGAGACTT-3' (配列番号：76)

p3：

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCATTCCGCTTGCACAGTGTCG-3' (配列番号：77)

p4：

5'-CTATGAAATTAACCTCACTAAAGGGACCACCACTCGCAGACCCACAG-3' (配列番号：78) 40

【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ITS分析を実施した。これらの分析からの結果は次の通りである：

(1) DNA 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 50

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、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

10

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(E12-E16週)は以下を含む：胎盤、臍帯、肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、肺、心臓、大血管、食道、胃、小腸、脾臓、胸腺、膵臓、脳、眼、脊髄、体壁、骨盤及び下肢。

20

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。

(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。

30

【0 2 3 2】

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。

40

(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、

50

PRO356、PRO535、PRO819、PRO1002、PRO1308、PRO1304、PRO183、PRO202、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882又はPRO1710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。

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。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遺伝子から誘導された放射標識プローブのフィルターへのハイブリッド形成は、50%ホルムアミド、5x SSC、0.1% SDS、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、2xデンハード液、及び10%デキストラン硫酸の溶液中で42℃で20時間実施した。フィルターの洗浄は、0.1x SSC及び0.1% SDS水溶液中で、42℃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；Bolivar等，Gene，2:95(1977)参照)であり、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性についての遺伝子を含む。ベクターは、制限酵素で消化され脱リン酸される。PCR増幅した配列は、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、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(Thimmappa等, Cell, 31:543 (1982))と混合し、500 µlの1mMトリス-HCl、0.1mMのEDTA、0.227MのCaCl₂に溶解させた。この混合物に、滴状の、500 µlの50mMのHEPES (pH 7.35)、280mMのNaCl、1.5mMのNaPO₄を添加し、25°Cで10分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、293細胞に加えて37°Cで約4時間定着させた。培養培地を吸引し、2mlのPBS中20%グリセロールを30秒間添加した。293細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートした。

形質移入の約24時間後、培養培地を除去し、培養培地(のみ)又は200 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、PR

10

20

30

40

50

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、PRO1304、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

10
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-[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。

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。

20

【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

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。

30

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、

40

50

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ー配列とともにクローニングすることができる。

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

10

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。

20

【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(PharMingen)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

30

40

50

キュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilley等, Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, (Oxford: Oxford University Press (1994))に記載されているように実施した。

【0238】

次いで、発現されたポリ-Hisタグ-[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、300mMNaCl、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A₂₈₀のベースラインまで負荷バッファーで洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー(50mMのリン酸塩; 300mMのNaCl、10%のグリセロール、pH6.0)で洗浄した。A₂₈₀のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で0から500mMのイミダゾール勾配で展開した。1mlの分画を回収し、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ(Qiagen)に複合した Ni^{2+} -NTAでのウェスタンブロットで分析した。溶離したHis₁₀-タグ-[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(イムノアドヘシン)として発現され、そこではタンパク質細胞外領域がヒンジ、CH2及びCH3ドメイン及び／又はポリ-Hisタグ形態を含むIgG1定常領域配列に融合している。

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、1mlの上清の25mLのヒスチジンタグタンパク質用の Ni^{2+} -NTAビー

10

20

30

40

50

ズ(QIAGEN)又はI g Gタグタンパク質用のプロテインAセファロースCL-4Bビーズ(Pharmacia)へのバッチ結合、次いでクマシーブルー染色により周知の濃度のタンパク質標準と比較するSDS-PAGE分析により測定した。

【0240】

第1のウイルス増幅上清をESF-921培地(Expression System LLC)で成長させたSf9細胞のスピナー培地(500ml)の約0.1のMOIでの感染に使用した。細胞は28℃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(0.5~3L)を、遠心分離により細胞を除去し0.22ミクロンフィルターを通して濾過することにより回収した。ポリ-Hisタグ作成物については、タンパク質製物を Ni^{2+} -NTAカラム(Qiagen)を用いて精製した。精製前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのNaCl及び5mMイミダゾールを含む20mMのHepes, pH7.4バッファーで平衡化した6mlの Ni^{2+} -NTAカラムに4-5ml/分の流速で4℃においてポンプ供給した。負荷後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのHepes、0.14MのNaCl及び4%のマニトールを含む貯蔵バッファー、pH6.8中で25mlのG25 Superfine(Pharmacia)カラムを用いて脱塩し、-80℃で貯蔵した。

タンパク質のイムノアドヘシン(Fc含有)作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、20mMのリン酸ナトリウムバッファー、pH6.8で平衡化した5mlのプロテインAカラム(Pharmacia)に負荷した。負荷後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、100mMのクエン酸、pH3.5で溶離した。溶離したタンパク質は、1mlの画分を275mLの1Mトリスバッファー、pH9を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Hisタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。タンパク質の均一性はSDSポリアクリルアミドゲル(PAGE)電気泳動及びエドマン(Edman)分解によるN-末端アミノ酸配列決定により評価できる。

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(Stratagene)等の適当な系で増幅されても、又はバキュロウイルス発現ベクターの含まれるエピトープタグの上流(5'-)に融合させてもよい。このようなエピトープタグは、ポリ-Hisタグ及び免疫グロブリンタグ(IgGのFc領域等)を含む。種々のプラスミドを用いることができ、pIE-1(Novagen)等の市販のプラスミドから誘導されたプラスミドを含む。pIE-1及びpIE-2ベクターは、安定に形質転換された昆虫細胞におけるバキュロウイルスie1プロモーターからの組換えタンパク質の構成的発現のために設計される。このプラスミドは複数のクロ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(pb.PH.IgG)のFc領域又は8ヒスチジン(pb.PH.His)タグ下流(3'-)を含むことができる。好ましくは、ベクター作成物は確認のために配列決定される。

High-5細胞は、27℃、CO₂無し、pen/strep無しの条件下で50%の集密度まで成長させた。150mmプレート各々について、30µgの配列を含むpIE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 JRH Biosciences #14401-78P(注:

10

20

30

40

50

この媒質は光感受性))と混合し、別の管において、100 μ lのセルフェクチン(CellFECTIN(Gibco BRL #10362-010))(ボルテックスで混合))を1mlのE x-細胞培地と混合した。2つの溶液を混合し、室温で15分間インキュベーションした。8mlのE x-細胞培地を2mlのDNA／セルフェクチン混合物に添加し、E x-細胞培地で1回洗浄したhigh-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E x-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E x-細胞培地を添加し、細胞を28℃で3日間インキュベートした。上清を回収して、バキュロウイルス発現ベクターでの配列の発現を、1mlの上清の25mLのヒスチジンタグタンパク質用のNi²⁺-NTAビーズ(QIAGEN)又はIgGタグタンパク質用のプロテインAセファロースCL-4Bビーズ(Pharmacia)へのバッチ結合、次いでクマシーブルー染色により周知の濃度のタンパク質標準と比較するSDS-PAGE分析により測定した。

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-His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(Qiagen)を用いて精製した。精製前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのNaCl及び5mMイミダゾールを含む20mMのHepes, pH7.4バッファーで平衡化した6mlのNi²⁺-NTAカラムに4-5ml/分の流速で48℃においてポンプ供給した。負荷後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのHepes、0.14MのNaCl及び4%のマニトールを含む貯蔵バッファー、pH6.8中で25mlのG25 Superfine(Pharmacia)を用いて脱塩し、-80℃で貯蔵した。

20

タンパク質のイムノアドヘシン(Fc含有)作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、20mMのリン酸ナトリウムバッファー、pH6.8で平衡化した5mlのプロテインAカラム(Pharmacia)にポンプ供給した。負荷後、100mMのクエン酸、pH3.5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、pH9を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Hisタグタンパク質について上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(Edman)分解によるN-末端アミノ酸配列決定及び所望又は必要に応じて他の分析手法により評価できる。

30

PRO175、PRO183、PRO198、PRO200、PRO356、PRO364、PRO535、PRO819、PRO861、PRO877、PRO879、PRO882、PRO1002、PRO1304及びPRO1308は、上述した方法により、high5細胞で発現した。

【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

40

この実施例は、PRO175、PRO200、PRO198、PRO364、PRO356、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、PRO8

50

77、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ることができる。

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MPL-TDMアジュバント(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで10から12日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗-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)、ACTT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Balb/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

10

20

30

40

50

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。

【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

これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存培養物が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテク社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、何れが最初に来ようとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号886OG638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

本出願の譲受人は、寄託した材料の培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと速やかに取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの材料の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に変形することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

【図面の簡単な説明】

【Fig 1】 天然配列PRO175cDNAのヌクレオチド配列(配列番号：1)を示す図であり、配列番号：1は、ここで「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

10

20

30

40

50

列(配列番号：4)を示す図である。

【F i g 5】 天然配列 P R O 1 9 8 c D N A 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「D N A 3 3 4 5 7 - 1 0 7 8」と命名されるクローンである。

【F i g 6】 F i g 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。

【F i g 7】 天然配列 P R O 3 6 4 c D N A 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「D N A 4 7 3 6 5 - 1 2 0 6」と命名されるクローンである。

【F i g 8】 F i g 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。 10

【F i g 9】 天然配列 P R O 3 5 6 c D N A 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「D N A 4 7 4 7 0 - 1 1 3 0 - P 1」と命名されるクローンである。

【F i g 1 0】 F i g 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。

【F i g 1 1】 天然配列 P R O 5 3 5 c D N A 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「D N A 4 9 1 4 3 - 1 4 2 9」と命名されるクローンである。

【F i g 1 2】 F i g 1 1 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。 20

【F i g 1 3】 天然配列 P R O 8 1 9 c D N A 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「D N A 5 7 6 9 5 - 1 3 4 0」と命名されるクローンである。

【F i g 1 4】 F i g 1 3 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。

【F i g 1 5】 天然配列 P R O 1 0 0 2 c D N A 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「D N A 5 9 2 0 8 - 1 3 7 3」と命名されるクローンである。

【F i g 1 6】 F i g 1 5 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。 30

【F i g 1 7】 天然配列 P R O 1 3 0 8 c D N A 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「D N A 6 2 3 0 6 - 1 5 7 0」と命名されるクローンである。

【F i g 1 8】 F i g 1 7 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。

【F i g 1 9】 天然配列 P R O 1 3 0 4 c D N A 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「D N A 6 5 4 0 6 - 1 5 6 7」と命名されるクローンである。

【F i g 2 0】 F i g 1 9 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。 40

【F i g 2 1】 天然配列 P R O 1 8 3 c D N A のヌクレオチド配列(配列番号：21)を示す図であり、配列番号：21は、ここで「D N A 2 8 4 9 8」と命名されるクローンである。

【F i g 2 2】 F i g 2 1 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。

【F i g 2 3】 天然配列 P R O 2 0 2 c D N A 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「D N A 3 0 8 6 9」と命名されるクローンである。

【F i g 2 4】 F i g 2 3 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。 50

ノ酸配列(配列番号：24)を示す図である。

【F i g 2 5】 天然配列 P R O 8 6 1 c D N A 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「D N A 5 0 7 9 8」と命名されるクローンである。

【F i g 2 6】 F i g 2 5 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。

【F i g 2 7】 天然配列 P R O 8 7 7 c D N A 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「D N A 5 8 1 2 0」と命名されるクローンである。

【F i g 2 8】 F i g 2 7 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。

10

【F i g 2 9】 天然配列 P R O 8 7 9 c D N A 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「D N A 5 8 1 2 2」と命名されるクローンである。

【F i g 3 0】 F i g 2 9 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。

【F i g 3 1】 天然配列 P R O 8 8 2 c D N A 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「D N A 5 8 1 2 5」と命名されるクローンである。

【F i g 3 2】 F i g 3 1 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。

20

【F i g 3 3】 天然配列 P R O 1 7 1 0 c D N A 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「D N A 8 2 3 3 1」と命名されるクローンである。

【F i g 3 4】 F i g 3 3 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)とプロオキシトシンのプロポリペプチドアミノ酸配列(配列番号：79)を示す図である。

【図 1】

CAGCTCTCATTTTCCAAAAATGGTGTGTGAGCCACTTGGAAAAATATGSCCTTTAAGCCATTCAAGAACTCAA
GGAGCTCAGAGATCACTCGAGCTGGCTGCTTGTGTCAAATATATGTGCTTACTTTCTTCTGCTCTT
CAGTTGGCTTAATCTTTATTTTCTCCAAATTAGAGACTGCTGAAGGAGCCCTGTATGGCTAAATTGGAGCACT
TAACCTCCAAAATGGCAATGGCATCTCTCTGAACTCTGTCGTGAATAGGTTGCTGACTGGAGGCTGAGGAG
ATACCTCAGAAATGGCTTATATTAATTTATGGCAGTGGCTCCCAATGCAAACTACAATGATGTAGCTCCT
TTTGGAGTGGCGCTGTATAAAAACAAGACATGATACAACCTCTAAACAACAATCTAAATTCCAAATG
TAGGAGGGACTTATGAATTGCAATGTTGGGGACACCATAGACTTGTATTTCAACTCTGAGCATCAGGTTCTA
AAA
ATAAATACATACATCGGGGTATCATTTTACTAGCAAAATCCCAATTCACTCTCCAGAGACTTGATTGTATCTC
CTCATTCOCCTTCAGCACATATAGAGGTGCGAGTGGGTGGATTGGAGGGAGAGAATTTCAATTTCTAGATGT
TTGTCTGTCTACAAAATCAACAAACAGAACTCCTCTGCACGTGAATTTTCACTATCATCGCTACTCTG
AAAGAGACTCAGGGGAGAGGCCAAAGACTTTTGGTGGATCTGCAGAAATACCTTCAATTAATCCATGATAAAA
ACAAAATATGGATGACAGAGACATGTGCTTTTCAAGAACTCTTATCTAATTTCTGAAHTCATGAGTGGGAA
AAATGGAGTCTTATTTCCATGGAAAGTTTACCTGGTATGCAAAAGGATCTGGGGCAGTAGCCCTGGCTTGT
TCTCAATCTCTGGGCTGCTGTAATTCATTTCTCTCATACTCCCACTCTCTGAGAGCCCTCCCAATAAAAA
GTAGACTGATAGGATGGCCACAGATATGCTTACCATACCTACTTTAGATATGGTGGTTAGAAAGATAAA
GAACAATCTGAGAACTTGTGAATAGAGGTACAAGTGGCATAAAAATGGAATGTACGCTATCTGGAATTTTC
TCTTGGTTTTATCTTCTCAGGATGCGAGGTGCTTTAAAAAGCCTTATCAAAGAGCATCTCCGCAACCCCTC
ACGTAGAGCTTTGTGAGAGACTACTGTGTGGTGTGTGTCTTAAACATTTGCTAATTTGTAAGAAGAGGTAAAC
CATFACATACTATGAGTTTATCCCGAGATGGTATATCATCTACGGATATGCTCATGTAATGATTTAGT
ATTTTAGCTAGCTTTCCACAGTTTGGCAAGTCTCTTGTCAAAACAGTTAGCAATCTCATAGAGTTAATGTG
GGCAGGCAATTGGGGGAAAAATTTAGTATGAGAATGTGATAGCATAGCATAGCCAACTTTCTCTCAACTCA
TAGGACAAGTGACTACAAGAGGCAATGGGTAGTCCCTGATTCGACTGTCTGACCTTTAGAATTTGTATT
TCTGCTATCTGTTTATAAGACTCTAAACACTTAGCAGATCTCACTTTTCAGGAAGCATATTTCCCTTTTAGGCC
AAGGTGACAGAGTGAAGCTACACAGATCTTCTTACAGAGCACTTTTCTTTTCTTCTGCTGCTGA
ATCAGGGAGATCCAGAGTACTGTTTCAGGCAAAATCCCAACAATTCOCCTTTCACTTTCGAGGCCCCAT
CTTAGTCAAAATGTCTTAATCTTCAAAATAAATAAGTACATAATTCAAAATTTTGGAAATCTTAAATTAGC
TACTTTCNGGTTGCTTTGTGAAGAGNATATAATGATTTACATTTGTAACAATTTAAATATTTATGGATAT
TGTGAAAGACTGCATTTATGTAAATAATATTTACATGTAAAGCT

【図 2】

MCLSHLENNPLSHSRITQGAQRSSWLKWLFCISIVMLLFLCSFSWLIFLIFLQLETAKEPCMAKFGPLPSKQWM
ASSEPCPVNKBWMLLELQNGLYLLYGQVAPHMYNDVAPFVRLYKNKDIQTLTNKSIQNVGGTGYEL
HVGDTDLINSEHQVLKNNYFWGILLANPQFIS

シグナルペプチド:	アミノ酸 1-25
膜貫通ドメイン:	アミノ酸 26-51
細胞外ドメイン:	アミノ酸 52-177
N-結合型グリコシル化部位:	アミノ酸 129-133; 161-165
N-ミリスチル化部位:	アミノ酸 18-24

【図 3】

CGGACGCTGGGCGGAGCGGTGGCGGAGCGGTGGCGGAGCGGTGGGCTGGTTCAGGTCCAGGTTTTCGT
TTGATCTCTTTCAAACCTGGAGACACAGAGAAGGGCTTAGGAAAAAGTTTGGAGTGGGATTTATGTGGAA
ACTACCTCTGGCATTTCTCTGCTCGAGAGCAGGCTCGGCGCTCTCAACCTCGAGCTGAGCTCTCCGCTGGGCT
GCTGAAGAAGGAGTGGAGGTCTGCTGCTTCCAAATGTCGCTGGCTGAGTGGAGCTCTACCCCTCGAGCA
ATGAGCCCTCTTCGGGCTCTCTCGCTGACATCTGCGCTGGCGGCGAGAGCAGGGGACTCAGGCGGAATC
CAACTGAGTAGTAATTTCCAGTTTTCAGCAACAAGGACAGGACGGGTACAAGATCTCCAGGATTTAGGA
GAATTTATCATGTGTCTACTAATGGAGATTTACAGGCCCAAGGTTCTCCTCATCTATCTATCCAGAAATAG
GATCTGGTATGGAGATTAGTAGCAGTAGAGGAAAAATGTATGGTACAACATTTACGTTTGTATGAAAGATTGG
GCTTGAAGACCCAGAGAATGACATATGCAAGTATGATTTTGTAGAGTTGAGGACAGCCAGTGGATGGAATCA
TATTAAGGCTGGCTGTGGTGGTCTGGTACTGTACAGGAAGAAAGCTTTCTAAAGAAATCAATTAAGGATA
AGAATTTGTACTGATGAATATTTCTCTTGAACCGAGGTTCTCGCATCCAATGACCAATGTGATGCCACA
ATTCAAGAAGCTGTGAGTCTCTCAGTGTCTACCCCTCTGAGTTTGGCATGGACCTGCTTAATTAATGGTA
TAATGCTCTTTAGTACTCTGGAAGACCTTATTCGATATCTTGAACAGAGAGATGGCACTTGGACTTAGAA
GATCTATATAGGCCAATCTGGCACTCTTGGCAAGGCTTTTGGTTTGGGAAGAAATCCAGAGTGGTGGA
TCTGACCTTTCTAACAGAGAGGATGAATTAATGAGTCTGCACACCTGATCACTGATCTGCTCATAGGG
AAACACTTAAGAGAGACCGATACATTTTCTGGCGAGGTTCTCTGCTGTAAACCGCTGTGGTGGAACTGT
GCGTGTGTCTCCACAATGCCAATGAATGTCAATGTGTCCCAACGAAGTTACTAAAAAATACACAGAGGT
CCTTCAGTTGAGACCAAAAGACCGGTGTCAGGGGATTGCACAAACTACACCGACGCTGGCCTGGAGCACCT
ATGAGAGTGTGACTGTGTGTGTCAGAGGGGACACAGGAGGAGTAGCCGCTACACACAGGCTCTTGCC
AGAGCTGTGCACTGCACTGGCTGATTCTATTAGAGAAGCTAGCGTTATCTCAATCTTCAGTTGT
TTCCTTCAGGACCTTTTCACTCTAGGATTTACGCTGCATTTGAAAGGGAGACATCAACAGATTAAG
AGTGTGTGACAGCTCTTTGAGAGGGGCTTAAGGACAGGAGAAAGGCTCTTCATATCTGGAAAGAAAT
TTAAATGTGTATTAATAGATCACAGCTAGTTTACAGATTCACATGTACGTATTTCCACTAGCTGGGTCT
TGATATTCAGTTCTTTTCAGTACCGCTTAGGGTAAATGTGACAGGAGAAAAAGCTGTGCAAGTGAGACCT
GATTTCTGCTGGCTTGCTTAATCTAAAGCTCCATGTCTGGGCTTAAATCGTATAAATATTTGATTTT
TTTTTTTTTGTGCTATATTCACATATGTAAACAGAACATTTCTATGATCAACAACTGGTTTAAAAA
AGATATGTTCTTAACAGACTCTACTTTTCTGCTCATCTGATAGAGAGACTGAGTTTTCATATTTCTTAT
AAAATTTCTGCCATTAGAAGAGAGAACTACATTCATGTTTGGAAAGATAAATCTGAAGAGAGAGTG
GCTTATCTCACTTTATGATAACTGAGTTTATTTGTTTCTATGTTACATTTTATATCTCTCTTTTGA
CATATAACTGTTGGCTTTCTTAATCTTGTAAATATATCTATTTTACCAAGGTATTTAATATTTCTTT
TTATGACACTTAGATCAACTATTTTATGCTTGGTAAATTTTCTTAACACAATTTGTTATAGCCAGAGGAA
CAAGATGATATAAAATATTTGTTCTCTGACAAAAACATGATTTCTATTTCTGATGGCTCTAGGTTA
CATTAATCTGCTATTTTAAAAAATCTGAATGAGATGAATTTGCTAAATGTCGAAAGCTTTTGAATAAT
AAATTTATCATATCTTCCATTCCTGTTATTGGAGATGAATAAAGAGCAACTTTGATGAAGTAGACATTCAG
ATCCAGCACTTAACTAATCTTCTTTTGGGGAATCTGAGCTAGCTCAGATAAAGAACATAAAGCACTT
GAAAAGACTTGGCAGCTCTTCACTGAAGAGCTGCTGTGCTGTGTCAGTAGGAACATCTTATTTATTTGTA
TGTGTGGTTTGTATTTATCTTAACTGAGTTCCTCACTGATTAAGATAGATAGGATTTGATTTGTA
AGTATGCTTCTTAACAGACTCTTAAAGGAAATGAGATGAGTAAATGATGAGTAAATATTTGTTG
CTAAATATCTTAATATGTCCTCAGTTATGTGTGACTATTTGAATCAAAATGTTATGATCACTCAAT
AAGAGAGATGGCTATTTTGGGGAAGAAATTAAGAAAAAAGGTTTAGGAGATGAGGAGGTT
GCTGGGCGC

【図 4】

シグナル配列:	アミノ酸 1-14
N-グリコシル化部位:	アミノ酸 25-29; 55-59; 254-258
N-ミリスチル化部位:	アミノ酸 15-21; 117-123; 127-133; 281-287; 282-288; 319-325
アミド化部位:	アミノ酸 229-233

NSLFLGLLLTSALAGQPGQCTQAESNLSSKFPQFSNKEQNGVQDPOHERITTVTNGHSINSPRPHTTYPNT
VFLVRLVAVEENVUWILTFDERFGLDEPDDICKVDFVEVEPESDGTILGRWCSSVTPVKQISXGNQIRI
RFLVDEYFSEPGFCIHYNIMVQFTEAVSPVLPPSALLPLDLNNHATFSTLEDLIRYLEPERWOLE
DLRYPFWOLLGKAFVFGKRSRVVDNLLETVRLYSCTRPNSFSIREELKRPDITFPWGCILLVRCGCGNC
ACCLHNCNECCQVPSKVTYKXHEVLRLPKPTGVRGLHKSITDVALEHHEEDCPGRCGSGTGG

【図 5】

CGGACGCTGGGCGCCTGGTGGGCGCAGCAAGTAGATGCTACTGTGGATCTGCCCTCCCTCTGGCTCTCTC
CTCTTGGGGGGCTCGCTCTCTGAAGACCCAGGACACCCAGCTGCCAGGAGCCAGGGAATCGAAGC
CAGCAAGATTGTCTCTCGCCAGTTGTCTCGGAGGCTCAGGAAGTCTCGGGGAGAGGGAGGCCAGAGTCT
CTAAGGGCCACTGGACACACAGGCAAGATGGGCCCCAGGGGTGAGCAGGGCCAGAAATCTGCGGGAG
CTGTGGACAGGGCCACTCTGAGGCGGTGATCACTTGTGCTTACCTGAGGCGCAGGGGCTCTCCCAAT
CTTTGTGACATGACACAGGAGGGGGCGGCTGGCTGTGTTCAGAGGGCGCAGGATGGTTCTGTGGATT
TCTCTCGCTCTTTGGTCTCTCAGAGCAGGTTTGGGAACCAAGAGTCTGAATTTCTGGCTGGGAAATGAG
AATTTGCACAGCTTACTTCCAGGGTAACCTGGGAGCTGCGGGTAGAGCTGGAAGACTTTAATGTTAAACCG
TACTTTCCGCCACTATGCGAGCTTCCGCTCTCTCTGCTGAGGTAGAGCACTTACCAGCTGTGCACTGGCGAAGT
TCTGACAGGCTCTCAGGAGCTCTTGAGCTCTCAGAGTGGAGGCTCTTACACATATGAGCTGTAC
CAGATTTCAGGCAACAGCACTGTGCGAGTATTTGTCACGCTGCTGGTGTGATGCACTCTGTAAACGATC
AAATCTCAATGGTGTGCTATGATGTTCTGAGGCTGCGGCCACAATAATGAGCATGACTGGCGCTCAGGCC
GTGGTGTGGGCGCCACTCAGCAGGTTTGGAGATGCTTCTGATAGGAGCTTGGCAGGCCATGCGCTT
ATCTCTCTGTACAGCTTCCGAGATGTCAGCACTTGCCTTTGCGCAACCACTCTGTTGCTGTCTCCACA
TTTAAAAATAAATCATTTTAGCCCTTTCA

【図 6】

MDLLWLPLSLMILLLGGPACLKTQZHPSPGPRELEASKVVLPSFCGAPGSPGKAGPQGPQPPGPKM
GPKDGPGRNRCRLLSQATLSGWYHLCLPEGRALPVFCMDTGGGWLVFQRRQDGSVDFRWSWSYRAG
FGNGSEFWLGNENHLQLLOGWLRVLELDNGNRTFAHYATFRLLEVDHYQLALGKFSFEGTADSL
LHSGRPFTTYDADHDSNSNCVIVHGAWYASCYRNLNRYAVSEAAAHRYGIDWASGRGVGHPRVRL
MMLR

シグナル ペプチド:	アミノ酸 1-16
N-グリコシル化部位:	アミノ酸 178-182
グリコシモノグリカン付着部位:	アミノ酸 272-276
チロシンキナーゼリン酸化部位:	アミノ酸 188-197
N-ミリスチル化部位:	アミノ酸 16-22; 89-95; 144-150; 267-273
フィブリノーゲンヘクター及びガン鎖C末端ドメインシグネチャー:	アミノ酸 242-255

【図 7】

CACGCACTTCACTGGGTGCGGATTTCTAGGCTATGAACGTTCCAGCACTCTCGGGCAGGGCGGGTGAAG
GAGCGGACCGGGGCTGTCCAACTGGCTGGGCTTTGAAACCCGACCTGGGCAAGCGCGGCGTGG
GGCGCTTTGGGGCTCTGTGCGCTGTGGCGTCTGAGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCT
CCCGGGTGGCGGCTGGCGCTCTGCTCTGGGAGGAGGAGCGAGCGCGGCTGCTCGGCGTTACACAGC
GCGCTGCTGGCGGATTTACCGGGCGAGGAGTGTCTGTCGAGTGGGATGCAATGTGTGTCCAGCTGAAAT
TCCACTGCGGAGACGCTTCTGTCAGCACTGCGGCGACACACCTTTGTCCCCAGGCGAGGGGGTACAGCT
CAGGGGAAATTCAGTTTGGCTTCCAGTGTATGCACTGTGCTCGGGGAGCTTCTCGGGGGGACAGGAAG
GCACTGCAAACTTGGAGACTGCACTGCACTGCGGTTTCTCACTGTGTTCCCTGGGAGCAAGACCA
AGCTGTGTCTCGGCTTCCAGGCTTCCCGCGGCGAGCGGCTGGGTGGCTGACCGCTGCTCTCGCGCGTG
GCGGCTGCTCTCTCTCTGACTCTGGCGCGAGCTTGGACTGCATCTCGGCGCTGAGGAGTCAAGTGCAT
GTGGCGCCGAGAGACGAGCTGCTGCTGGAGGTGCGCGCTGACCGCAAGAGCGCAGAAGCTGCCACTGT
CCGAGGAAGAGCGGGGCGAGCATCGGCAAGAGAGAGGGGCGGCTGGGAGACTGTGGGTGTGAGCGCTGT
CGCTCTCCGGGGCCACGAGCGGAGCGAGCCCTCCCAAGAGCTCTCCAGGAGCTCTCCAGGCGCGAGGGCT
GTCTGTGGAGCGGGCGCTCTCCCTTGGCAGCAGAGTGGGTGAGAGAGGTGGAGTACCAAGCGCGCT
GGAGCTGAGGCT

【図 8】

MAQHGAMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLTGTCTDARCCRVHUTTCRRDYPGEGCCSEWD
CMCVQDFPHCGDCCCTCRHPHCPFGGQVGSQKXPSFGQICDASGTFSGGHEGHCKPWDCITQFGLTV
FPNKTHNAVCPGSPPAELGMLTVLLVAACVLLTSAQLGLRIWLRSCQWPRFTGLLEVPFST
DARSCQPFKEERGERSAEEKRGLDMLV

シグナル配列:	アミノ酸 1-25
潜在的膜貫通ドメイン:	アミノ酸 162-180
N-グリコシル化部位:	アミノ酸 146-150
N-ミリスチル化部位:	アミノ酸 5-11; 8-14; 25-31; 30-36; 33-39; 118-124; 122-128; 156-162
原核生物膜リポタンバク質脂質結合部位:	アミノ酸 166-177
ロシンジッパーパターン:	アミノ酸 171-193

【図 9】

GAAAGCTATAGGCTACCCATTACGCTCCCTGTGACAGACTCAAGCTTTAGAGAAAGGCTAGCAAAAGACGAA
GAAAGAGAGAGAAACACAAGATGGCGAGGCCCTCAGAGTGAAGAGCTTAAGGTTCACTGACGCTGCTGCG
CTTTCAGAGACTCAGCTGGCATCTCCAGACTCCCTGAGGAAGAGGCTTCTCACCACCAACCAAAAA
C
AAGCTGAAAAAGCCTCTCTCAGCTGTGACCTGGCTCTGCAATTTTCACTCGTGGCTTTGTGACGACCCACG
GTGGCTGCAAGAGCTCTTAAGCAACAAGACACGACGACAGCTCAAGCGGCGCACTGCTGTGAGG
AGGTGAAGGAGCTCAAGGCCAAGTTGCCAATCTAGCAGCTCTGCTGAGTGAATGAAACAAGAGCAGGAG
AGGCACTGGGTGAGCTGTGTCATGAGTGTGATGGAGCTGAGAGGAGCAAGCAAGAGCGGCTGAGGCT
CAGCAGTCTGAGAGCAAGTACTCCGAGATGAACACCAAAATGACATTAATGACAGCTGAGGACGACAG
CGCTCAGTCACTCTCCAGAGTGCATACAGAGCTCTTCCCTCTTACCAAGAGATACCGCATTTCT
GGAGTGTATAAGCTTCTCTGATGACTCTCTGGGCGAGCCCTGAACCTGGAGGTCTGTGACATGTGAGAC
TCTAGGCGGAGGCTGGACCATCATCCAGAGACGAAAAAGTGGCTTGTCTCTTACCGGGACTGGAAGC
AGTCAAGCAGGGCTTTGGCAGCATCCGTGGGAGCTTCTGGCTGGGGAACGAACATCTCACCGGCTCTC
AGACAGCAGCAACCGGCTGCTGTGAGAGTGGAGGAGCTGGGAGGGCACTTGGCTGAGCTGAGTATAGCA
CTTGTGTTTGGGCAATGAATCAGAGCTATCGCTCTTCTGGGGAATCAGCATGCAATGTGGGGAAGC
AGCCCTTCCAGATCATACACACAGCCTTACAGCAACAAGCAAGCAATGACAACTGCTTGGACAG
TGTGACAGCTCCGCAAAAGTGGCTACTGTTCAACTGTGTCAGACACTCCAATCTCAATGAGGTGTACTA
CGCGCTGGGTGAGCAATAAGCATCTGGATGGCATCTGTTAGGTGGCTGAGTGTACTACCTCTCC
TCAAGCGGTGGAGATGAAATTCGCCCGCAAGAGACTTCAAGCTTAAAGAGGCTGCGGTGGAGCAAGGA
TACAGAACTGAGACACCTGGAGCTGGATGAGGCGAGTAGAGGAGAGAGAGAGGTATTAGAAAGGTTAG
GACTGAAAGAGCTGAGTGAATTTGATTTCTTAAACAGTGAATTTCTGAGCTTACATTTCTGAGCTTACAT
AAGTGTCTACAGTAAACAGGATGAATTTAAACCACTGGGTCTGCGCATACTCTTCTCAAGGTGGTA
GACTGAGTGGGCTCTCTCGCCAGATCTCTGACATGACAGTACTGTTCTTTCTACATGATTTCTGCTG
TGAAGAAATATAATTTGAGATGTTTATCTATTTTCTCTACGGCTTAGGCTGTGAGGCGAAAAACACA
AATTCCTTTGCTAAAAAGAACATAATTTTGTATTCTAAGAGTAGGGCTTTGAGTGTATAGAGAAAGGA
CTCAAGGAGCGAGGTAAGTGAATTTCTTAACTTTTAAACAGTGAATTTCTGAGCTTACATTTCTGAGCT
TGTTTTAAACACAAAATTTCTCGGCTGGAATGACCCAGGCTGGACTTGGGGGAGGAAATCTCGGCGCA
CTGCATCTGGCGATCAGACTGTGAGCACTGCGCTGCTGCTGCTCATGTACAGCACTGAGGAAGATA
AGACAGCAGGAGGAGTGGACAGAGTCTCTCATGGATGGGCGCAAAACCTGCTTAAATATTCATAGTTA
ATACAGCTATATCTATTTTATTTTACTTTGTGAAGAAACAGCTCAGAGGAGCTTTTAAATTTTGTCTG
TAGAAAGTGTGAAACCTGAAGTAGAGTGTGTATAGTTAATAATGATGCTTAATAGCATCTTCACT

CTCAAAATAAATAATTTGGGTTTGTGTTTTTAAACATTCAGCTTTCTTTCTTCTCAATAAACAATCTCA
AAATCTG

シグナル配列: アミノ酸 1-22

【図 3 2】

MSRREGSLEDPTDSSVSLLPHEAKIRQTHSLAHLTKYAEQLLQETVQLQGDPTGLPSFSPPRLPVAGL
SAPAPSHAGLPVHERLRDAAALPPLLDVYCRRAELNPAPRLLRLEDAARQARALGAAVEALLAA
LGAANRGFRAEPPAATASAASATGVFFAKVLGLRVCGLYREWLSRTEGDLGQLLFGGSA

N-ミリスチル化部位: アミノ酸 166-172;174-180

ロシシシジッパーパターン: アミノ酸 37-59

【図 3 3】

CCCAGCGCACCCGACCAATGGCCCGCCCCAGCCTCGCTTGCTGTCTGCTCGGCTCCTGGCGCTGACCTCC
GCCTGCTACATCCAGAACTGCCCCCTGGGAGGCCAAGAGGGCGCGCCGGACCTCGACGTGCGCAAGTGCTCCT
CCCCCTGGGGCCCCGGGGCAAAGGCCGCTGCTTCGGGCCCAATATCTGCTGCGCGGAAGAGCTGGGCTGCT
TCGTGGGCACCCGGAAGCGCTGCGCTGCCAGGAGAGAATACCTGCGCTCGCCCTGCCAGTCCGGCCAG
AAGCGCTCGGGAGCGGGGCCGCTGCGCGGCTTTGGGCTCTGCTGACGCCGGAGCGCTGCCACGCCGA
CCCTGCTGCGACGCGGAAGCCACCTTCTCCAGCGCTGAAACTTGATGGCTCCGACACCCCTCGAAGCGC
GCCACTCGCTTCCCCATAGCCACCCAGAAATGGTAAAAATAAAATAAGCAGGTTTTTCTCTCT

【図 3 4】

成熟オキシトシン:
CYIQNCPLGGKRAAPDLVRKCLPCGPGGKRCFSPNICCAEELGCFVGTAEALRCQEENYLPSPCQSGQK
ACGSGGRCAVLGLCCSPDGCHADPACDAEATFSQR

プロオキシトシン:
MAGPSLACLLGLLALTSACYIQNCPLGGKRAAPDLVRKCLPCGPGGKRCFSPNICCAEELGCFVGTAE
ALRCQEENYLPSPCQSGQKACGSGGRCAVLGLCCSPDGCHADPACDAEATFSQR

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 17/02	(2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
C 0 7 K 14/47	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 16/18	(2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/46	(2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 9/99	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 9/99	
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/577	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
C 1 2 R 1/91	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	
		C 1 2 P 21/02	C
		C 1 2 R 1:91	

- (31)優先権主張番号 60/144,758
 (32)優先日 平成11年7月20日(1999.7.20)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/145,698
 (32)優先日 平成11年7月26日(1999.7.26)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/146,222
 (32)優先日 平成11年7月28日(1999.7.28)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 US9920111
 (32)優先日 平成11年9月1日(1999.9.1)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 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)

前置審査

- (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
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 262
7
- (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59
3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 111
0
- (72)発明者 ワタナベ, コリン, ケー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94556, モラガ, コーリス ドライブ 128
- (72)発明者 ウィリアムズ, ピー., ミッキー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94019, ハーフ ムーン ベイ, アルト アヴェニュー
509
- (72)発明者 ウッド, ウィリアム, アイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, ヒルズバラ, サウスダウン コート 35

審査官 斎藤 真由美

- (56)参考文献 国際公開第99/025834 (WO, A1)
国際公開第98/007880 (WO, A1)
Genome Res., Vol.6, No.9, 1996年, Vol.6, No.9, p.791-806

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90
C12N 1/00-9/99
C12P 21/00-08
C07K 14/00-19/00
C12Q 1/00-3/10
G01N 33/00-98
A61K 31/00-48/00
A61P 1/00-43/00
PubMed、MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq
UniProt/GeneSeq

专利名称(译)	促进或抑制血管生成和心血管化		
公开(公告)号	JP4297317B2	公开(公告)日	2009-07-15
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		
当前申请(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	C12N15/09 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P17/02 A61P27/02 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/21 C12N9/99 C12N5/10 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577 C12P21/08 C12R1/91 A61K38/17 C07K14/52 C12N1/19 C12N7/00 C12N15/11 C12N15/12 C12N15/86		
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	C12N15/00.ZNA.A 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 C12N1/21 C12N9/99 C12N5		

/00.B C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/577.B
C12P21/08 C12R1/91

审查员(译) 斋藤真由美

优先权 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 JP2004506595A

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。

■ ■ ■ ■

MAQHGMGAFAFALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLTGTGDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWD
CMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVOSQKFSFGFCIDCASQTFSGGHEGCKPWTDTCTQFGFLTV
FPCNKTHNAVCVPGSPPAEPLCWLTVVLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLEVPVPSTE
DARSCQFPFEERGERSAEEKGRGLDLMV

シグナル配列:	アミノ酸 1-25
潜在的膜貫通ドメイン:	アミノ酸 162-180
N-グリコシル化部位:	アミノ酸 146-150
N-ミリスチル化部位:	アミノ酸 5-11;8-14;25-31;30-36; 33-39;118-124;122-128;156-162
原核生物膜リボタンパク質脂質結合部位:	アミノ酸 166-177
ロイシンジッパーパターン:	アミノ酸 171-193