

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号
特表2004-520003
(P2004-520003A)

(43) 公表日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	E 4 B O 6 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395	T 4 B O 6 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 537 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2001-553947 (P2001-553947)	(71) 出願人 596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・9408 0-4990・サウス・サン・フランシス コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(86) (22) 出願日 平成12年2月11日 (2000.2.11)	
(85) 翻訳文提出日 平成13年9月10日 (2001.9.10)	
(86) 国際出願番号 PCT/US2000/003565	
(87) 国際公開番号 W02001/053486	
(87) 国際公開日 平成13年7月26日 (2001.7.26)	
(31) 優先権主張番号 PCT/US99/05028	(74) 代理人 100109726 弁理士 園田 吉隆
(32) 優先日 平成11年3月8日 (1999.3.8)	(74) 代理人 100101199 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. アメリカ合衆国 カリフォルニア 944 02, サン マテオ, テリータウン スト リート 1456
(31) 優先権主張番号 60/123, 972	
(32) 優先日 平成11年3月11日 (1999.3.11)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	
(31) 優先権主張番号 60/133, 459	
(32) 優先日 平成11年5月11日 (1999.5.11)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	
最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 腫瘍治療のための組成物及び方法

(57) 【要約】

本発明は、ヒトを含む哺乳動物における腫瘍細胞成長及び増殖の診断及び治療のための組成物及び方法に関する。本発明は、腫瘍細胞のゲノムにおいて増幅される遺伝子の同定に基づく。このような遺伝子増幅は、遺伝子産物の同じ組織型の正常細胞と比較して過剰な発現に関連し、腫瘍形成に寄与すると予測される。従って、増幅された遺伝子にコードされるタンパク質は、或る種の癌の診断及び治療（予防を含む）に有用であると考えられ、腫瘍治療の予後を予知するように作用する。

MTVIRFFPAASATKRVLPVLRVSSPRTWNPVPEPRIPAPRLFKRMSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQSGPV
QSKSPRFASNDMMVLAHGLLQLGQQLRHAERTESQLSALERRLSACGSAQCTEGSTDLPLAPESRVDPEVLH
SLQTQLKAQNERIQULPHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKLHGHVAKPARPKRLPEMAQPVDPARNV
SRILHLEFRDQQLPQNGSRQSLPEIQFGSGFFELVNCMTSELGWTYTORHDSGVDPNRPWEATKAGFODEHG
RFLWGLKRVHSTYKNSRLAVQLRDWGNALLLQFVHLGCEDTAYSLQTAQVACQLGATTVPPSGLSVFVS
WDQDHLDRDKNCAKSLSGGMMFGTCSHNLNQYFRSIPQQRQKLKGI FWKTVRGYYPLQATTMLIQMAAEAS

Transmembrane domain: Amino acids 51-70
N-glycosylation site: Amino acids 224-228
cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites:
Amino acids 46-50;118-122
N-myristoylation sites: Amino acids 50-56;129-135;341-347;
357-363
Fibrinogen beta and gamma chains C-terminal domain signature:
Amino acids 396-409

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに結合する単離された抗体。

【請求項 2】

前記ポリペプチドに特異的に結合する請求項 1 に記載の抗体。

10

【請求項 3】

前記ポリペプチドを発現する細胞の死を誘発する請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記細胞が前記ポリペプチドを同じ組織型の正常細胞に比較して過剰に発現する癌細胞である請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

モノクローナル抗体である請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

非ヒトの相補性決定領域 (CDR) 又はヒトフレームワーク領域 (FR) を含む請求項 5 に記載の抗体。 20

【請求項 7】

標識された請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 8】

抗体断片又は一本鎖抗体である請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 9】

製薬的に許容される担体と混合された請求項 1 に記載の抗体を含む物質の組成物。

【請求項 10】

前記抗体の治療的有効量を含む請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

細胞毒性又は化学治療薬をさらに含む請求項 9 に記載の組成物。 30

【請求項 12】

請求項 1 に記載の抗体をコードする単離された核酸分子。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 15】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに結合する抗体の製造方法において、請求項 14 に記載の宿主細胞を前記抗体を発現させるのに十分な条件下で培養し、細胞培地から前記抗体を回収することを含んでなる方法。 40

【請求項 16】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO 50

PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドのアンタゴニスト。

【請求項17】

前記アンタゴニストが腫瘍細胞成長を阻害する請求項16に記載のアンタゴニスト。

【請求項18】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド、又はその補体をコードする核酸配列にハイブリッド形成する単離された核酸分子。 10

【請求項19】

前記ハイブリッド形成が緊縮性ハイブリッド形成及び洗浄条件下である請求項18に記載の単離された核酸分子。

【請求項20】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを含有すると推測される試料中で前記ポリペプチドの存在を測定する方法において、当該試料を抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体に暴露し、前記抗体の前記試料中の前記ポリペプチドへの結合を測定することを含んでなる方法。 20 30

【請求項21】

前記試料が、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを含むと推測される細胞を含有する請求項20に記載の方法。 40

【請求項22】

前記細胞が癌細胞である請求項21に記載の方法。

【請求項23】

哺乳動物において腫瘍を診断する方法において、(a) 哺乳動物から得た組織細胞の試験試料中、及び(b) 同じ細胞型の知られた正常組織細胞の対照試料中におけるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含んでなり、対照試料に比較した試験試料における高いレベルが、当該試験組織細胞を得た哺乳動物における腫瘍の存在を示す方法。 10

【請求項24】

哺乳動物において腫瘍を診断する方法において、(a) 抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体を哺乳動物から得た組織細胞の試験試料と接触させ、そして(b) 前記抗体と試験試料中のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドとの間の複合体の形成を検出することを含んでなり、複合体の形成が前記哺乳動物における腫瘍の存在を示す方法。 20 30

【請求項25】

前記抗体が検出可能に標識された請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記組織細胞の試験試料が、腫瘍性細胞成長又は増殖を有すると推測される個体から得られる請求項24に記載の方法。

【請求項27】

抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体及び担体を適切な包装内に含んでなる癌診断用キット。 40

【請求項28】

前記抗体が、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206 50

、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを含有することが推測される試料中のそれらの存在をを検出するために用いられるという説明書をさらに具備する請求項27に記載のキット。

【請求項29】

腫瘍細胞の成長を阻害する方法において、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを発現する腫瘍細胞を、前記ポリペプチドの生物学的活性を阻害する薬剤の有効量に暴露することを含んでなり、それにより前記腫瘍細胞の成長が阻害される方法。 10

【請求項30】

前記腫瘍細胞が、同じ組織型の正常細胞に比較して前記ポリペプチドを過剰発現する請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記薬剤が、抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体である請求項29に記載の方法。 20

【請求項32】

前記抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体が細胞死を誘発する請求項31に記載の方法。 30

【請求項33】

前記腫瘍細胞に、放射線処理、細胞毒性薬又は化学治療薬をさらに施す請求項29に記載の方法。 40

【請求項34】

腫瘍細胞の成長を阻害する方法において、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを発現する腫瘍細胞を、前記ポリペプチドの発現を阻害する薬剤の有効量に暴 50

露することを含んでなり、それにより前記腫瘍細胞の成長が阻害される方法。

【請求項 35】

前記腫瘍細胞が、同じ組織型の正常細胞に比較して前記ポリペプチドを過剰発現する請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記薬剤が、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 ポリペプチドをコードする核酸にハイブリッド形成するアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はその補体である請求項 34 に記載の方法。 10

【請求項 37】

前記腫瘍細胞に、放射線処理、細胞毒性薬又は化学治療薬をさらに施す請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

容器；

当該容器上のラベル；及び 20

当該容器内に収容された活性剤を含有する組成物とを具備し、当該組成物が腫瘍細胞の成長を阻害するのに有効であり、容器上のラベルが当該組成物は前記腫瘍細胞中で同じ組織型の正常細胞に比較して PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 ポリペプチドの過剰発現を特徴とする状態の治療に有効であることを表示する製造品。 30

【請求項 39】

前記活性剤が、前記 PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 ポリペプチドの生物学的活性及び／又は発現を阻害する請求項 38 に記載の製造品。

【請求項 40】 40

前記活性剤が抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316 又は抗-PRO4980 抗体である請求項 39 に記載の製造品。

【請求項 41】 50

前記活性剤が、アンチセンスオリゴヌクレオチドである請求項 39 に記載の製造品。

【請求項 42】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 ポリペプチドの生物学的又は免疫学的活性を阻害する化合物を同定する方法において、候補化合物を前記ポリペプチドと、2つの成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間に接触させ、前記ポリペプチドの生物学的又は免疫学的活性が阻害されるか否かを測定することを含んでなる方法。 10

【請求項 43】

前記候補化合物が、抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316 又は抗-PRO4980 抗体である請求項 42 に記載の方法。 20

【請求項 44】

前記候補化合物又は前記 PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 ポリペプチドが固体支持体に固定化される請求項 42 に記載の方法。 30

【請求項 45】

非固定化成分が検出可能に標識される請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 ポリペプチドの活性を阻害する化合物を同定する方法において、(a) 細胞とスクリーニングすべき候補化合物とを、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 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、そして (b) 前記細胞性反応の誘 40 50

発を測定して試験化合物が有効なアンタゴニストか否かを決定することを含んでなり、前記細胞性反応の誘発を欠くことが前記化合物が有効なアンタゴニストであることを示す方法。

【請求項 47】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを発現する細胞で前記ポリペプチドの発現を阻害する化合物を同定する方法において、前記細胞を化合物と接触させ、前記ポリペプチドの発現が阻害されるか否かを測定することを含んでなる方法。

【請求項 48】

前記候補化合物がアンチセンスオリゴヌクレオチドである請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6)、Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18 (配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig 24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32)、Fig 34 (配列番号: 34)、Fig 36 (配列番号: 36)、Fig 38 (配列番号: 38)、Fig 40 (配列番号: 40)、Fig 42 (配列番号: 42)、Fig 44 (配列番号: 44)、Fig 46 (配列番号: 46)、Fig 48 (配列番号: 48)、Fig 50 (配列番号: 50)、Fig 52 (配列番号: 52)、Fig 54 (配列番号: 54)、Fig 56 (配列番号: 56)、Fig 58 (配列番号: 58)、Fig 60 (配列番号: 60)、Fig 62 (配列番号: 62)、Fig 64 (配列番号: 64)、Fig 66 (配列番号: 66)、Fig 68 (配列番号: 68) 及び Fig 70 (配列番号: 70) に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と少なくとも 80% の核酸配列同一性を持つ単離された核酸。

【請求項 50】

Fig 1 (配列番号: 1)、Fig 3 (配列番号: 3)、Fig 5 (配列番号: 5)、Fig 7 (配列番号: 7)、Fig 9 (配列番号: 9)、Fig 11 (配列番号: 11)、Fig 13 (配列番号: 13)、Fig 15 (配列番号: 15)、Fig 17 (配列番号: 17)、Fig 19 (配列番号: 19)、Fig 21 (配列番号: 21)、Fig 23 (配列番号: 23)、Fig 25 (配列番号: 25)、Fig 27 (配列番号: 27)、Fig 29 (配列番号: 29)、Fig 31 (配列番号: 31)、Fig 33 (配列番号: 33)、Fig 35 (配列番号: 35)、Fig 37 (配列番号: 37)、Fig 39 (配列番号: 39)、Fig 41 (配列番号: 41)、Fig 43 (配列番号: 43)、Fig 45 (配列番号: 45)、Fig 47 (配列番号: 47)、Fig 49 (配列番号: 49)、Fig 51 (配列番号: 51)、Fig 53 (配列番号: 53)、Fig 55 (配列番号: 55)、Fig 57 (配列番号: 57)、Fig 59 (配列番号: 59)、Fig 61 (配列番号: 61)、Fig 63 (配列番号: 63)、Fig 65 (配列番号: 65)、Fig 67 (配列番号: 67) 及び Fig 69 (配列番号: 69) に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 80% の核酸配列同一性を持つ単離された核酸。

【請求項 51】

Fig 1 (配列番号: 1)、Fig 3 (配列番号: 3)、Fig 5 (配列番号: 5)、Fig 7 (配列番号: 7)、Fig 9 (配列番号: 9)、Fig 11 (配列番号: 11)、

Fig 13 (配列番号: 13)、Fig 15 (配列番号: 15)、Fig 17 (配列番号: 17)、Fig 19 (配列番号: 19)、Fig 21 (配列番号: 21)、Fig 23 (配列番号: 23)、Fig 25 (配列番号: 25)、Fig 27 (配列番号: 27)、Fig 29 (配列番号: 29)、Fig 31 (配列番号: 31)、Fig 33 (配列番号: 33)、Fig 35 (配列番号: 35)、Fig 37 (配列番号: 37)、Fig 39 (配列番号: 39)、Fig 41 (配列番号: 41)、Fig 43 (配列番号: 43)、Fig 45 (配列番号: 45)、Fig 47 (配列番号: 47)、Fig 49 (配列番号: 49)、Fig 51 (配列番号: 51)、Fig 53 (配列番号: 53)、Fig 55 (配列番号: 55)、Fig 57 (配列番号: 57)、Fig 59 (配列番号: 59)、Fig 61 (配列番号: 61)、Fig 63 (配列番号: 63)、Fig 65 (配列番号: 65)、Fig 67 (配列番号: 67) 及び Fig 69 (配列番号: 69) に示すヌクレオチド配列の全長コード化配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 80% の核酸配列同一性を持つ単離された核酸。

【請求項 52】

ATCC 登録番号 209284、209358、203376、209250、209508、209379、209397、209786、209482、209490、203312、55820、203096、203155、203465、PTA-255、PTA-618、PTA-545、PTA-256、203538、203661、203835 又は PTA-43 の下で寄託された DNA の全長コード化配列と少なくとも 80% の核酸配列同一性を持つ単離された核酸。

【請求項 53】

請求項 49 から 52 のいずれか一項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 54】

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 53 に記載のベクター。

【請求項 55】

請求項 53 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 56】

前記細胞が CHO 細胞である請求項 55 に記載の宿主細胞。

【請求項 57】

前記細胞が大腸菌である請求項 55 に記載の宿主細胞。

【請求項 58】

前記細胞が酵母菌細胞である請求項 55 に記載の宿主細胞。

【請求項 59】

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 55 に記載の宿主細胞。

【請求項 60】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 ポリペプチドの製造方法において、請求項 55 に記載の宿主細胞を前記ポリペプチドを発現させるのに十分な条件下で培養し、細胞培地から前記ポリペプチドを回収することを含んでなる方法。

【請求項 61】

Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6)、Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18 (配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig

24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32)、Fig 34 (配列番号: 34)、Fig 36 (配列番号: 36)、Fig 38 (配列番号: 38)、Fig 40 (配列番号: 40)、Fig 42 (配列番号: 42)、Fig 44 (配列番号: 44)、Fig 46 (配列番号: 46)、Fig 48 (配列番号: 48)、Fig 50 (配列番号: 50)、Fig 52 (配列番号: 52)、Fig 54 (配列番号: 54)、Fig 56 (配列番号: 56)、Fig 58 (配列番号: 58)、Fig 60 (配列番号: 60)、Fig 62 (配列番号: 62)、Fig 64 (配列番号: 64)、Fig 66 (配列番号: 66)、Fig 68 (配列番号: 68) 及び Fig 70 (配列番号: 70) に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を持つ単離されたポリペプチド。 10

【請求項62】

Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6)、Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18 (配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig 24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32)、Fig 34 (配列番号: 34)、Fig 36 (配列番号: 36)、Fig 38 (配列番号: 38)、Fig 40 (配列番号: 40)、Fig 42 (配列番号: 42)、Fig 44 (配列番号: 44)、Fig 46 (配列番号: 46)、Fig 48 (配列番号: 48)、Fig 50 (配列番号: 50)、Fig 52 (配列番号: 52)、Fig 54 (配列番号: 54)、Fig 56 (配列番号: 56)、Fig 58 (配列番号: 58)、Fig 60 (配列番号: 60)、Fig 62 (配列番号: 62)、Fig 64 (配列番号: 64)、Fig 66 (配列番号: 66)、Fig 68 (配列番号: 68) 及び Fig 70 (配列番号: 70) に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較した場合、少なくとも80%ポジティブのスコアをつけられる単離されたポリペプチド。 20

【請求項63】

ATCC登録番号209284、209358、203376、209250、209508、209379、209397、209786、209482、209490、203312、55820、203096、203155、203465、PTA-255、PTA-618、PTA-545、PTA-256、203538、203661、203835又はPTA-43の下で寄託されたDNAの全長コード化配列によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を持つ単離されたポリペプチド。 30

【請求項64】

異種アミノ酸配列に結合した請求項61から63のいずれか一項に記載のポリペプチドを含んでなるキメラ分子。

【請求項65】

異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列である請求項64に記載のキメラ分子。 40

【請求項66】

異種アミノ酸配列が免疫グロブリンのFc領域である請求項64に記載のキメラ分子。

【請求項67】

請求項61から63のいずれか一項に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項68】

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

【請求項69】

(a) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6)、Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12) 50

: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18 (配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig 24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32)、Fig 34 (配列番号: 34)、Fig 36 (配列番号: 36)、Fig 38 (配列番号: 38)、Fig 40 (配列番号: 40)、Fig 42 (配列番号: 42)、Fig 44 (配列番号: 44)、Fig 46 (配列番号: 46)、Fig 48 (配列番号: 48)、Fig 50 (配列番号: 50)、Fig 52 (配列番号: 52)、Fig 54 (配列番号: 54)、Fig 56 (配列番号: 56)、Fig 58 (配列番号: 58)、Fig 60 (配列番号: 60)、Fig 62 (配列番号: 62)、Fig 64 (配列番号: 64)、Fig 66 (配列番号: 66)、Fig 68 (配列番号: 68) 又は Fig 70 (配列番号: 70) に示すポリペプチドであって付随するシグナルペプチドを欠くものをコードするヌクレオチド配列;

(b) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6)、Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18 (配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig 24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32)、Fig 34 (配列番号: 34)、Fig 36 (配列番号: 36)、Fig 38 (配列番号: 38)、Fig 40 (配列番号: 40)、Fig 42 (配列番号: 42)、Fig 44 (配列番号: 44)、Fig 46 (配列番号: 46)、Fig 48 (配列番号: 48)、Fig 50 (配列番号: 50)、Fig 52 (配列番号: 52)、Fig 54 (配列番号: 54)、Fig 56 (配列番号: 56)、Fig 58 (配列番号: 58)、Fig 60 (配列番号: 60)、Fig 62 (配列番号: 62)、Fig 64 (配列番号: 64)、Fig 66 (配列番号: 66)、Fig 68 (配列番号: 68) 又は Fig 70 (配列番号: 70) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであってそれに付随するシグナルペプチドを持つものをコードするヌクレオチド配列; 又は

(c) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6)、Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18 (配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig 24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32)、Fig 34 (配列番号: 34)、Fig 36 (配列番号: 36)、Fig 38 (配列番号: 38)、Fig 40 (配列番号: 40)、Fig 42 (配列番号: 42)、Fig 44 (配列番号: 44)、Fig 46 (配列番号: 46)、Fig 48 (配列番号: 48)、Fig 50 (配列番号: 50)、Fig 52 (配列番号: 52)、Fig 54 (配列番号: 54)、Fig 56 (配列番号: 56)、Fig 58 (配列番号: 58)、Fig 60 (配列番号: 60)、Fig 62 (配列番号: 62)、Fig 64 (配列番号: 64)、Fig 66 (配列番号: 66)、Fig 68 (配列番号: 68) 又は Fig 70 (配列番号: 70) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであってそれに付随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持つ単離された核酸。

【請求項 70】

(a) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6)、Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18 (配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig 24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)

: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32)、Fig 34 (配列番号: 34)、Fig 36 (配列番号: 36)、Fig 38 (配列番号: 38)、Fig 40 (配列番号: 40)、Fig 42 (配列番号: 42)、Fig 44 (配列番号: 44)、Fig 46 (配列番号: 46)、Fig 48 (配列番号: 48)、Fig 50 (配列番号: 50)、Fig 52 (配列番号: 52)、Fig 54 (配列番号: 54)、Fig 56 (配列番号: 56)、Fig 58 (配列番号: 58)、Fig 60 (配列番号: 60)、Fig 62 (配列番号: 62)、Fig 64 (配列番号: 64)、Fig 66 (配列番号: 66)、Fig 68 (配列番号: 68) 又は Fig 70 (配列番号: 70) に示すポリペプチドであって付随するシグナルペプチドを欠くもの;

(b) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6) 10
 Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18 (配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig 24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32)、Fig 34 (配列番号: 34)、Fig 36 (配列番号: 36)、Fig 38 (配列番号: 38)、Fig 40 (配列番号: 40)、Fig 42 (配列番号: 42)、Fig 44 (配列番号: 44)、Fig 46 (配列番号: 46)、Fig 48 (配列番号: 48)、Fig 50 (配列番号: 50)、Fig 52 (配列番号: 52)、Fig 54 (配列番号: 54)、Fig 56 (配列番号: 56)、Fig 58 (配列番号: 58)、Fig 60 (配列番号: 60) 20
 Fig 62 (配列番号: 62)、Fig 64 (配列番号: 64)、Fig 66 (配列番号: 66)、Fig 68 (配列番号: 68) 又は Fig 70 (配列番号: 70) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであってそれに付随するシグナルペプチドを持つもの; 又は

(c) Fig 2 (配列番号: 2)、Fig 4 (配列番号: 4)、Fig 6 (配列番号: 6)
 Fig 8 (配列番号: 8)、Fig 10 (配列番号: 10)、Fig 12 (配列番号: 12)、Fig 14 (配列番号: 14)、Fig 16 (配列番号: 16)、Fig 18 (配列番号: 18)、Fig 20 (配列番号: 20)、Fig 22 (配列番号: 22)、Fig 24 (配列番号: 24)、Fig 26 (配列番号: 26)、Fig 28 (配列番号: 28)、Fig 30 (配列番号: 30)、Fig 32 (配列番号: 32)、Fig 34 30
 (配列番号: 34)、Fig 36 (配列番号: 36)、Fig 38 (配列番号: 38)、Fig 40 (配列番号: 40)、Fig 42 (配列番号: 42)、Fig 44 (配列番号: 44)、Fig 46 (配列番号: 46)、Fig 48 (配列番号: 48)、Fig 50 (配列番号: 50)、Fig 52 (配列番号: 52)、Fig 54 (配列番号: 54)、Fig 56 (配列番号: 56)、Fig 58 (配列番号: 58)、Fig 60 (配列番号: 60)、Fig 62 (配列番号: 62)、Fig 64 (配列番号: 64)、Fig 66 (配列番号: 66)、Fig 68 (配列番号: 68) 又は Fig 70 (配列番号: 70) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであってそれに付随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持つ単離されたポリペプチド。 40

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、腫瘍の診断及び治療のための組成物及び方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

悪性腫瘍 (癌) は、米国において心臓疾患に続き第 2 の主要な死亡原因である (Borin g 等, C A C a n c e r J . C l i n . , 43: 7 [1993])。

癌は、正常な組織から誘導されて腫瘍実体を形成する異常な、又は腫瘍形成性の細胞数の増加、これらの腫瘍形成性腫瘍細胞による隣接組織の侵襲、及び最終的に血液やリンパ系 50

を介して局所のリンパ節及び離間部位に拡散（転移）する悪性細胞の生成を特徴とする。癌性状態においては、正常細胞が成長しない条件下で細胞が増殖する。癌自体は、異なる侵襲及び攻撃性の程度で特徴付けられる広範な種々の形態で顕現する。遺伝子発現の交互変化は制御不能な細胞成長及び脱分化に強く関連しており、全ての癌に共通する特徴である。或る種の良く研究されたゲノムが、通常は腫瘍抑制遺伝子と呼ばれ、正常には悪性細胞成長又は或る種の優性遺伝子、例えば悪性成長を促進する用に作用するオンコジーンの過剰発現を防止するように作用する劣性遺伝子発現の現象を示すことが見出された。これらの遺伝子変化は、凝集して十分な腫瘍形成性フェノタイプを示す形質の幾つかが移入される原因であることが明らかとなった（Hunter, Cell 64: 1129 [1991]; Bishop, Cell 64: 235-248 [1991]）。

【0003】

癌細胞における遺伝子（例えばオンコジーン）過剰発現の良く知られたメカニズムは遺伝子増幅である。これは、祖先細胞の染色体において特定遺伝子の多重コピーが生成されるプロセスである。このプロセスは、遺伝子を含む染色体の領域の計画性のない複製、次いで複製されたセグメントが染色体へ戻る再組換えを含む（Alitalo等, Adv. Cancer Res. 47: 235-281 [1986]）。遺伝子増幅に平行する遺伝子の過剰発現は、即ち作成されるコピーの数に比例すると考えられている。成長因子及び成長因子レセプターをコードするプロトオンコジーンは、乳癌を含む、様々なヒトの悪性腫瘍の原因に重要な役割を担っていることが確認されている。例えば、表皮成長因子レセプター（EGFR）に関連した185-kdの膜貫通糖タンパク質レセプター（p185^{HER2}、HER2）をコードするヒトErbb2遺伝子（erbb2、her2としても知られている、又はc-erbB-2）は、ヒトの乳癌の約25%~30%で過剰発現されていることが見出されている（Slamon等, Science 235: 177-182 [1987]; Slamon等, Science 244: 707-712 [1989]）。

【0004】

プロトオンコジーンの遺伝子増幅は、典型的には癌のより悪性の形態に含まれる事象であり、臨床的結果の予言者として作用しうることが報告されている（Schwab等, Genes Chromosome Cancer 1, 181-193 [1990]; Alitalo等, 上掲）。即ち、erbb2の過剰発現は、特に腋窩のリンパ節を含む一次疾患を持つ患者において、不完全な予後の前兆と共通して見なされており（Slamon等, [1987]及び[1989], 上掲; Ravdin及びChamness, Gene 159: 19-27 [1995]; 及びHynes及びStern, Biochem Biophys Acta 1198: 165-184 [1994]）、ホルモン療法及びCMF（シクロホスファミド、メトトレキサート、及びフルオロウラシル）を含む化学治療薬に対する感受性又は耐性と関連付けられていた（Baselga等, Oncology 11 (3 Suppl 1): 43-48 [1997]）。しかしながら、erbb2過剰発現と不完全な予後との関連にも関わらず、HER2-ポジティブな患者のタキサンでの処理に臨床的に反応する可能性は、HER2-ネガティブ患者の3倍も大きかった（上掲）。組換えヒト化抗-Erbb2（抗-HER2）モノクローナル抗体（マウス抗-Erbb2抗体4D5のヒト化型、rhumaB HER2又はHerceptin（商品名）と呼ばれる）は、広範な従来の抗癌治療を受けたErbb2を過剰発現する転移性乳癌を持つ患者で臨床的に活性である。（Baselga等, J. Clin. Oncol. 14: 737-744 [1996]）。

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

【0005】

（発明の概要）

1. 実施態様

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

一実施態様では、本発明は、ここでPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドと命名されるポリペプチドに結合する単離された抗体に関する。一態様では、単離された抗体は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに特異的に結合する。他の態様では、これらの抗体は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを発現する細胞の死を誘発する。多くの場合、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを発現する細胞は、当該ポリペプチドを同じ組織型の正常細胞と比較して過剰に発現する腫瘍細胞である。さらに他の態様では、抗体はモノクローナル抗体であり、それは好ましくは非ヒトの相補性決定領域（CDR）及びヒトフレームワーク領域（FR）残基を有する。抗体は、標識されていても固体支持体上に固定化されていてもよい。さらに他の態様では、抗体は抗体断片、一本鎖抗体、又はヒト化抗体であって、好ましくはPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに特異的に結合する。

【0006】

他の実施態様では、本発明は、製薬的に許容される担体と混合された、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269

、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合する抗体を含む物質の組成物に関する。一態様では、この物質の組成物は治療的有効量の抗体を含有する。他の態様では、この組成物は、更なる活性成分を含有し、それらは、例えば更なる抗体又は細胞毒性又は化学治療薬であってよい。好ましくは、この組成物は無菌である。

さらなる実施態様では、本発明は、抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体をコードする単離された核酸分子、及びそのような核酸分子を含むベクター及び組換え宿主細胞に関する。

またさらなる実施態様では、本発明は抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体の製造方法に関し、当該方法は、その抗体をコードする核酸分子で形質転換した宿主細胞を当該抗体を発現させるのに十分な条件下で培養し、細胞培地から抗体を回収することを含んでなる。

さらに本発明は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの生物学的及び／又は免疫学的機能又は活性の一又は複数を阻害するPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドのアンタゴニストに関する。

【0007】

さらなる実施態様では、本発明は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO

202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド、又はその補体をコードする核酸配列にハイブリッド形成する単離された核酸分子に関する。単離された核酸分子は、好ましくはDNAであり、ハイブリッド形成は好ましくは緊縮性ハイブリッド形成及び洗浄条件下で起こる。このような核酸分子は、ここで同定される増幅された遺伝子のアンチセンス分子として作用でき、また翻って各増幅遺伝子の転写及び／又は翻訳の変調において、又は増幅反応におけるアンチセンスプライマーとしての用途が見出される。さらに、このような配列は、リボザイム (r i b o z y m e) 及び／又は三重螺旋配列の一部として使用することができ、それは翻って増幅遺伝子の調節

10

他の実施態様では、本発明は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを含有すると推測される試料中でPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの存在を測定する方法を提供し、当該方法は、当該試料を抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体に暴露し、当該抗体の試料中のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドへの結合を測定することを含んでなる。他の実施態様では、本発明は、細胞中でのPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの存在を測定する方法を提供し、当該方法は、当該細胞を抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO

20

30

40

50

232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体に接触させ、抗体の細胞への結合を測定することを含んでなる。

【0008】

さらに他の実施態様では、本発明は、哺乳動物において腫瘍を診断する方法に関し、(a) 哺乳動物から得た組織細胞の試験試料中、及び(b) 同じ細胞型の知られた正常組織細胞の対照試料中におけるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含んでなり、対照試料に比較した試験試料における高いレベルが、当該試験組織細胞を得た哺乳動物における腫瘍の存在を示す。

他の実施態様では、本発明は、哺乳動物において腫瘍を診断する方法に関し、(a) 抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体を哺乳動物から得た組織細胞の試験試料と接触させ、そして(b) 抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体と試験試料中のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドとの間の複合体の形成を検出することを含んでなり、複合体の形成が前記哺乳動物における腫瘍の存在を示す。測定は定性的でも定量的でもよく、同じ細胞型の知られた正常組織細胞の対照試料における複合体形成の監視と比較して実施してもよい。試験試料中の複合体形成量の増加が、試験試料を得た哺乳動物における腫瘍の存在を示す。抗体は、好ましくは検出可能な標識を担持する。複合体形成は、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、又はこの分野で公知の他の技術によって監視できる。

10

20

30

40

50

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

【0009】

他の実施態様では、本発明は、抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体及び担体（例えばバッファー）を適切な包装内に含んでなる癌診断用キットに関する。このキットは、好ましくは当該抗体が、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を含有することが推測される試料中のそれらの存在を検出するために用いられるという説明書を具備する。

さらに他の実施態様では、本発明は腫瘍細胞の成長を阻害する方法に関し、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを発現する腫瘍細胞を、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの生物学的及び／又は免疫学的活性及び／又は発現を阻害する薬剤の有効量に暴露することを含んでなり、それにより当該腫瘍細胞の成長が阻害される。この薬剤は、好ましくは抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体、小さな有機及び無機分子、ペプチド、リンペプチド、アンチセンス又はリボザイム分子、又は三重螺旋分子である。特別な態様では、薬剤、例えば抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗

－PRO773、抗－PRO861、抗－PRO1216、抗－PRO1686、抗－PRO1800、抗－PRO3562、抗－PRO9850、抗－PRO539、抗－PRO4316又は抗－PRO4980抗体は細胞死を誘発する。さらなる態様では、腫瘍細胞には、放射線処理、細胞毒性薬又は化学治療薬がさらに施される。

【0010】

さらなる実施態様では、本発明は、

容器；

当該容器上のラベル；及び

当該容器内に収容された活性剤を含有する組成物とを具備し、当該組成物が腫瘍細胞の成長を阻害するのに有効であり、容器上のラベルが当該組成物は前記腫瘍細胞中で同じ組織型の正常細胞に比較してPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの過剰発現を特徴とする状態の治療に有効であることを表示する製造品に関する。特別な態様では、組成物中の活性剤は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの活性及び／又は発現を阻害する薬剤である。好ましい態様では、活性剤は抗－PRO197、抗－PRO207、抗－PRO226、抗－PRO232、抗－PRO243、抗－PRO256、抗－PRO269、抗－PRO274、抗－PRO304、抗－PRO339、抗－PRO1558、抗－PRO779、抗－PRO1185、抗－PRO1245、抗－PRO1759、抗－PRO5775、抗－PRO7133、抗－PRO7168、抗－PRO5725、抗－PRO202、抗－PRO773、抗－PRO861、抗－PRO1216、抗－PRO1686、抗－PRO1800、抗－PRO3562、抗－PRO9850、抗－PRO539、抗－PRO4316又は抗－PRO4980抗体又はアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0011】

また本発明は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの生物学的又は免疫学的活性を阻害する化合物を同定する方法を提供し、候補化合物をPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドと、2つの成分が相互作用するのに十分な条件下

10

20

30

40

50

及び時間で接触させ、前記PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの生物学的及び／又は免疫学的活性が阻害されるか否かを測定することを含んでなる。特別な態様では、候補化合物又はPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドのいずれかが固体支持体上に固定化される。他の態様では、非固定化成分が検出可能な標識を担持している。好ましい態様では、この方法は、(a)細胞とスクリーニングすべき候補化合物とを、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ、そして(b)前記細胞性反応の誘発を測定して試験化合物が有効なアンタゴニストか否かを決定することを含んでなる。

他の実施態様では、本発明はPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを発現する細胞で前記ポリペプチドの発現を阻害する化合物を同定する方法を提供し、当該方法は、細胞を候補化合物と接触させ、前記PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの発現が阻害されるか否かを測定することを含んでなる。好ましい態様では、この方法は、(a)細胞とスクリーニングすべき候補化合物とを、PRO197、PR

PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの発現に適した条件下で接触させ、(b)前記ポリペプチド発現の阻害を測定する工程を具備する。

【0012】

B. さらに実施態様

10

本発明の他の実施態様では、当該発明は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードする核酸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他の断片を持つPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の補体に対して、少なくとも約80%の配列同一性、好ましくは少なくとも約81%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約82%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約83%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約84%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約85%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約86%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約87%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約88%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約89%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約91%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約92%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約93%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約94%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約95%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約96%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約97%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約98%の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

20

30

40

【0013】

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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドcDNAコード化配列、ここに開示するシグナルペプ

50

チドを欠くPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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%の配列同一性、好ましくは少なくとも約81%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約82%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約83%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約84%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約85%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約86%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約87%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約88%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約89%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約91%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約92%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約93%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約94%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約95%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約96%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約97%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約98%の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0014】

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%の配列同一性、好ましくは少なくとも約81%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約82%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約83%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約84%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約85%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約86%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約87%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約88%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約89%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約91%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約92%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約93%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約94%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約95%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約96%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約97%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約98%の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約99%の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。

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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、P

PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考慮される。

【0015】

他の実施態様はPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドコード化配列の断片、又はその補体に向けられ、それらは、例えば、場合によっては抗PRO197、抗PRO207、抗PRO226、抗PRO232、抗PRO243、抗PRO256、抗PRO269、抗PRO274、抗PRO304、抗PRO339、抗PRO1558、抗PRO779、抗PRO1185、抗PRO1245、抗PRO1759、抗PRO5775、抗PRO7133、抗PRO7168、抗PRO5725、抗PRO202、抗PRO206、抗PRO264、抗PRO313、抗PRO342、抗PRO542、抗PRO773、抗PRO861、抗PRO1216、抗PRO1686、抗PRO1800、抗PRO3562、抗PRO9850、抗PRO539、抗PRO4316又は抗PRO4980抗体に対する結合部位を含むポリペプチドをコードしてもよいPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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、好ましくは少なくとも約30ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約40ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約50ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約60ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約70ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約80ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約90ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約100ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約110ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約120ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約130ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約140ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約150ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約160ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約170ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約180ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約190ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約200ヌ

クレオチド長、より好ましくは少なくとも約250ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約300ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約350ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約400ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約450ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約500ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約600ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約700ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約800ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約900ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約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。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、多くの良く知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを用いてPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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、日常的な手法で同定してもよい。このようなPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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-PRO655、抗-PRO364又は抗-PRO344抗体に対する結合部位を含むPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド断片によってコードされるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245

、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド断片、好ましくは抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体に対する結合部位を含むPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド断片も考慮される。

10

20

【0016】

他の実施態様では、本発明は、上記で特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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを提供する。

30

或る態様では、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同定された他の断片を持つPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに対して少なくとも約80%の配列同一性、好ましくは少なくとも約81%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約82%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約83%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約84%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約85%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約86%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約87%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約88%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約89%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約91%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約92%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約93%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約94%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約95%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約96%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約97%の配列同一性、より好

40

50

ましくは少なくとも約 98% の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離された PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 ポリペプチドに関する。

【0017】

10

さらなる態様では、本発明は、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アミノ酸配列に対して少なくとも約 80% の配列同一性、好ましくは少なくとも約 81% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 82% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 83% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 84% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 85% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 86% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 87% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 88% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 89% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 90% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 91% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 92% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 93% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 94% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 95% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 96% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 97% の配列同一性、より好ましくは少なくとも約 98% の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離された PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 ポリペ

20

30

【0018】

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同定された他の断片を持つ PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 ポリペプチドと比較したときに、少なくとも約 80% ポジティブ、好ましくは少なくとも約 81% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 82% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 83% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 84% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 85% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 86% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 87% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 88% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 89% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 90% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 91% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 92% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 93% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 94% ポジティブ、

40

50

より好ましくは少なくとも約 95% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 96% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 97% ポジティブ、より好ましくは少なくとも約 98% ポジティブ、そして、より好ましくは少なくとも約 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 PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 ポリペプチドに関する。 10

【0019】

特別な実施態様では、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 PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 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 PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、培養培地から PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 ポリペプチドを回収することを含む。 20 30

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインの欠失した又は膜貫通ドメインが不活性化された、単離された PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316 又は PRO4980 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 PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PR 40 50

PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、培養培地からPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを回収することを含む。 10

【0020】

さらに他の実施態様では、本発明は、ここで同定される天然PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドのアゴニストに関する。特別な実施態様では、アゴニストは抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体又は小分子である。 20

さらなる実施態様では、本発明は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドのアゴニストを同定する方法に関し、それは、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを候補分子と接触させ、前記PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO49 30 40 50

80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、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドは天然PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドである。

【0021】

さらに他の実施態様では、本発明は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド、又はここに記載するPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドのアンタゴニスト、又は抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980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、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド、又は上記したようなそのアンタゴニスト、又は抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、

抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体の、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド、そのアンタゴニスト又は抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980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。

【0022】

本発明の他の実施態様では、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、又はバキュウロウイルス感染昆虫細胞であってよい。ここに記載する任意のポリペプチドの製造方法がさらに提供され、それは、宿主細胞を所望のポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培地から所望のポリペプチドを回収することを含む。

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。

【0023】

(好適な実施態様の詳細な説明)

I. 定義

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

ここで用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍形成細胞成長及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳

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

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

癌の「病理」は、患者の良好な生存を危うくさせる全ての現象を含む。これは、限定されるものではないが、異常又は制御不能な細胞成長、転移、隣接細胞の正常機能の阻害、サイトカイン又は他の分泌生成物の異常レベルでの放出、炎症又は免疫反応の抑制又は悪化などを含む。

【0024】

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

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

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

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

【0025】

「化学治療薬」は、癌の治療に有用な化合物である。化学治療薬の例は、アドリアマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（「Ara-C」）、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン、タキソイド、例えばパクリタキセル（Taxol（商品名）、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ）及びドキシセタキセル（Taxotere（商品名）、Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France）、トキソテール、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イフォスファミド、マイトマイシンC、マイトキサントロン、ビンクリスチン、ビノレルビン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラマイシン（米国特許第4,675,187号）、5-FU、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、アクチノマイシンD、VP-16、クロランブシル、メルファラン、及び他の関連するナイトロジェンマスタードを含む。また、この定義に含まれるの

は、タモキシフェン及びオナプリストンなどの腫瘍へのホルモン作用を調節又は阻害するように作用するホルモン様薬剤である。

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、細胞、特にここで同定される任意の遺伝子を過剰発現する癌細胞の成長を、インビトロ又はインビボで阻害する化合物又は組成物を意味する。即ち、成長阻害剤は、S相でそのような遺伝子を過剰発現する細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期を（S相以外の位置で）阻害する薬剤、例えばG1停止又はM相停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM相ブロッカーは、ビンカス（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキソール、及びトポII、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。G1停止させるこれらの薬剤は、S相停止にも溢流し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びara-Cである。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特にp13に見出すことができる。

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

【0026】

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

この出願で用いられる用語「プロドラッグ」は、親薬剤に比較して腫瘍細胞に対する細胞毒性が低く、酵素的に活性化又はより活性な親形態に変換される製薬的活性物質の前駆体又は誘導体形態を意味する。例えば、Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」, Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting, Belfast (1986), 及びStella等, 「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」

、Directed Drug delivery, Borchardt等(編), pp. 147-267, Human Press (1985) 参照。本発明のプロドラッグは、これらに限られないが、ホスファート含有プロドラッグ、チオホスファート含有プロドラッグ、スルファート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸変性プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、 β -ラクタム含有プロドラッグ、任意に置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ又は任意に置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、より活性のある細胞毒のない薬剤に転換可能な5-フルオロシトシン及び他の5-フルオロウリジンプロドラッグを含む。限定するものではないが、本発明で使用するプロドラッグ形態に誘導体化可能な細胞毒性薬の例には、前記の化学療法剤が含まれるが、これらに限られない。

10

【0027】

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

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

20

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

PROアンタゴニストの「細胞毒性量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞をインビトロ又はインビボで破壊できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のためのPROアンタゴニストの「細胞毒性量」は、経験的に日常的手法で決定できる。

30

【0028】

ここで使用される際の「PROポリペプチド」及び「PRO」という用語は、直後に数値符号がある場合に種々のポリペプチドを指し、完全な符号（例えば、PRO/数字）は、ここに記載する特定のポリペプチド配列を意味する。ここで使用される「PRO/数字ポリペプチド」及び「PRO/数字」であって、「数字」がここで使用される実際の数値符号として与えられる用語は、天然配列ポリペプチド及び変異体（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、組換え又は合成方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、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、図において太字又は下線で示した。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位置1としてここに命名されるメチオニン残基で始まるように示されているが、図面におけるアミノ酸位置1の上流又

40

50

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。

PROポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ECD」は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しないPROポリペプチドの形態を意味する。通常、PROポリペプチドECDは、それらの膜貫通及び／又は細胞質ドメインを1%未満、好ましくはそのようなドメインを0.5%未満しか持たない。本発明のPROポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインのいずれかの末端から約5アミノ酸を越えない可能性が高い。従って、PROポリペプチド細胞外ドメインは、場合によっては、実施例又は明細書で同定されるように膜貫通ドメイン及び／又は細胞外ドメインの境界のいずれかの側から約5を越えないアミノ酸を含んでもよく、シグナルペプチドを伴う又は伴わない、それらのポリペプチド及びそれらをコードする核酸は、本発明で考慮される。

10

【0029】

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

20

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

30

40

50

体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、より多くは少なくとも約20アミノ酸長、より多くは少なくとも約30アミノ酸長、より多くは少なくとも約40アミノ酸長、より多くは少なくとも約50アミノ酸長、より多くは少なくとも約60アミノ酸長、より多くは少なくとも約70アミノ酸長、より多くは少なくとも約80アミノ酸長、より多くは少なくとも約90アミノ酸長、より多くは少なくとも約100アミノ酸長、より多くは少なくとも約150アミノ酸長、より多くは少なくとも約200アミノ酸長、より多くは少なくとも約300アミノ酸長、又はそれ以上である。

【0030】

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日常的にUNIX（登録商標）オペレーティングシステム上での使用委のためにコンパイルされ、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使用して%アミノ酸同一性（表2A-2B）及び%核酸配列同一性（表2C-2D）を決定する後述の方法を使用するための仮説的例示を示し、「PRO」とは対象とする仮のPROポリペプチドのアミノ酸配列を意味し、「比較タンパク質」とは対象とする「PRO」ポリペプチドと比較されるポリペプチドのアミノ酸配列を意味し、「PRO-DNA」とは、対象とする仮のPRO-コード化核酸配列を意味し、「比較DNA」とは対象とする「PRO-DNA」核酸分子と比較される核酸分子のヌクレオチド配列を意味し、「X」、「Y」、及び「Z」は各々異なる仮のアミノ酸配列、そして「N」、「L」及び「V」は各々異なる仮のヌクレオチド配列を意味する。

【0031】

表1

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

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

10

20

30

40

50

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[J MPS];   /* size of jmp (gap) */
    int            x[J MPS];   /* 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         /* holds diagonals */
struct           path         /* holds path for seqs */
pp[2];

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

```

10

20

30

表1(続き)

```

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

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

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

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

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

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

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

```

10

20

main

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;
        }
    }
}

```

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

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

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

#include "nw.h"

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

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

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

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

```

10

print

20

30

表1(続き)

```

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

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

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

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

```

getmat

10

20

30

40

表1(続き)

```

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

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

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

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

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

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

```

...getmat

10

20

30

pr_align

40

表1(続き)

```

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

        more++;

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

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

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

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

```

...pr_align

10

20

30

dumpblock

40

表1(続き)

...dumpblock

```

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

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
{
    int    ix;        /* index in out[] holding seq line */

    char    nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char *pn, *px, *py;

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

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

```

10

nums

20

30

putline

40

表1(続き)

```

int          i;
register char *px;

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

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

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

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(p0[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(p1[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

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

```

...putline

stars

表1(続き)

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

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

stripname

表1(続き)

```

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

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

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

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

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

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

```

10

cleanup

20

getseq

30

40

表 1(続き)

...getseq

```

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);
}

```

10

```

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

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

```

g_calloc

20

```

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

```

30

```

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--)
                ;

```

readjmps

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;
}
}

```

表 1(続き)

```

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

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

```

writejumps

10

【 0 0 3 2 】

表 2A

20

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

% アミノ酸配列同一性 =

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

5 ÷ 15 = 33.3%

30

表 2B

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

% アミノ酸配列同一性 =

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

5 ÷ 10 = 50%

40

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

10

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

表 2D

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

% 核酸配列同一性 =

20

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

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

【0033】

ここに定義されるPROポリペプチドに対してここで同定されている「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、PRO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、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが以下の表1に与えられている配列比較プログラムALIGN-2を用いて

ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、以下の表1に示したソースコードは米国著作権庁、Washington D. C. , 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、South San Francisco, Californiaから好適に入手可能であり、また以下の表1に与えたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標)V4.0D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。

30

40

50

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。この方法を用いた%アミノ酸配列同一性の計算の例として、表2Aと2B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。

10

【0034】

特に断らない限り、ここで用いられる全ての%アミノ酸配列同一性値は、上記したようにして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、配列比較コンピュータプログラムNCBI-BLAST-2 (Altschul等, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードできる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask=可、鎖=全て、予測される発生=10、最小低複合長=15/5、マルチパス値=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。

20

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。

30

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検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン=1、オーバーラップフラクション=0.125、ワード閾値 (T)=11、及びスコアリングマトリクス=BLOSUM62。ここでの目的のために、%アミノ酸配列同一性値は、(a)天然PROポリペプチドから誘導された配列を有する対象とするPROポリペプチドのアミノ酸配列と、対象とする比較アミノ酸配列（即ち、対象とする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)対象とする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が対象とする比較アミノ酸配列であり、アミノ酸配列Bが対象とするPROポリペプチドのアミノ酸配列である。

40

【0035】

50

「PRO変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO変異体核酸配列」とは、下記に定義されるように、活性PROポリペプチドをコードする核酸分子であり、ここに開示する全長天然配列PROポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた全長天然配列PROポリペプチド配列、シグナルペプチド有無のここに開示するPROポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する全長PROポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有する。通常は、PRO変異体ポリペプチドヌクレオチドは、ここに開示する全長天然配列PROポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた全長天然配列PROポリペプチド配列、シグナルペプチド有無のここに開示するPROポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する全長PROポリペプチドの他の任意の断片をコードする核酸配列と、少なくとも約80%の核酸配列同一性、好ましくは少なくとも約81%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約82%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約83%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約84%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約85%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約86%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約87%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約88%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約89%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約91%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約92%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約93%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約94%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約95%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約96%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約97%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。

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、より多くは少なくとも約60ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約90ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約120ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約150ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約180ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約210ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約240ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約270ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約300ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約450ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約600ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約900ヌクレオチド長、又はそれ以上である。

【0036】

ここで同定されるPROコード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、PROポリペプチドコード化核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアライ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を通して公的に入手可能であり、またFig 2A-P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(登録商標)オペレーティングシステム、好

ましくはデジタルUNIX（登録商標）V4.0D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。

【0037】

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

分率 W/Z の100倍

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

特に断らない限りは、ここでの全ての%核酸配列同一性値は上記のようにALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%核酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2 (Altschul等, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードできる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask=可、鎖=全て、予測される発生=10、最小低複合長=15/5、マルチパス値=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。

【0038】

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

分率 W/Z の100倍

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

さらに、%核酸配列同一性値は、WU-BLAST-2コンピュータプログラム (Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて決定してもよい。殆どのWU-BLAST-2検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン=1、オーバーラップフラクション=0.125、ワード閾値(T)=11、及びスコアリングマトリクス=BLOSUM62。ここでの目的のために、%核酸配列同一性値は、(a)天然配列PROポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有する対象とするPROポリペプチドコード化配列の核酸配列と、対象とする比較核酸分子（即ち、対象とするPROポリペプチドコード化核酸分子の配列が比較される変異体ポリヌクレオチドであってもよい配列）との間の、WU-BLAST-2によって決定した一致する同一ヌクレオチドの数を、(b)対象とするPROポリペプチドコード化核酸のヌクレオチドの総数で除した商によって決定される。例えば、「核酸配列Bに対して少なくとも80%の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が対象とする比較核酸配列であり、核酸配列Bが対象とするPROポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

【0039】

他の実施態様では、PRO変異体ポリペプチドヌクレオチドは、活性PROポリペプチドをコードし、好ましくは緊縮性ハイブリッド形成及び洗浄条件下で、Fig 2（配列番号：2）、Fig 4（配列番号：4）、Fig 6（配列番号：6）、Fig 8（配列番号：8）、Fig 10（配列番号：10）、Fig 12（配列番号：12）、Fig 14（配列番号：14）、Fig 16（配列番号：16）、Fig 18（配列番号：18）、Fig 20（配列番号：20）、Fig 22（配列番号：22）、Fig 24（配列番号：24）、Fig 26（配列番号：26）、Fig 28（配列番号：28）、Fig 30（配列番号：30）、Fig 32（配列番号：32）、Fig 34（配列番号：34）、Fig 36（配列番号：36）、Fig 38（配列番号：38）、Fig 40（配列番号：40）、Fig 42（配列番号：42）、Fig 44（配列番号：44）、Fig 46（配列番号：46）、Fig 48（配列番号：48）、Fig 50（配列番号：50）、Fig 52（配列番号：52）、Fig 54（配列番号：54）、Fig 56（配列番号：56）、Fig 58（配列番号：58）、Fig 60（配列番号：60）、Fig 62（配列番号：62）、Fig 64（配列番号：64）、Fig 66（配列番号：66）、Fig 68（配列番号：68）及びFig 70（配列番号：70）に各々示す全長PROポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリッド形成する核酸分子である。PRO変異体ポリペプチドは、PRO変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

【0040】

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特性を有するものも含む。対象とす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、対象とするアミノ酸残基と同一であるか、又は対象とするアミノ酸残基の（下記の表3で特定するように）好ましい置換とされるものである。

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

分率 X/Y の100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのアラインメントによってポジティブであるとのスコアのアミノ酸残基の数であり、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。

【0041】

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために使用するときには、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたポリペプチドを意味する。好ましくは、単離されたポリペプチドは、それに天然に付随する全ての成分を伴わない。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による均一性まで精製される。単離されたポリペプチドには、PROポリペプチド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タンパク質が含まれる。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」核酸は、同定され、PROコード化核酸分子又は抗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、単離された核酸は、それに天然に付随する全ての成分を伴わない。単離されたPROコード化核酸分子又は抗PROコード化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。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ポリペプチドを通常発現する又は抗PRO抗体を発現する細胞に含まれるPRO核酸分子及び抗PRO核酸分子を含む。

10

【0042】

「コントロール配列」という表現は、特定の宿主生物において作用可能に結合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読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

20

【0043】

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、例えば、単一の抗PRO197、抗PRO207、抗PRO226、抗PRO232、抗PRO243、抗PRO256、抗PRO269、抗PRO274、抗PRO304、抗PRO339、抗PRO1558、抗PRO779、抗PRO1185、抗PRO1245、抗PRO1759、抗PRO5775、抗PRO7133、抗PRO7168、抗PRO5725、抗PRO202、抗PRO206、抗PRO264、抗PRO313、抗PRO342、抗PRO542、抗PRO773、抗PRO861、抗PRO1216、抗PRO1686、抗PRO1800、抗PRO3562、抗PRO9850、抗PRO539、抗PRO4316又は抗PRO4980モノクローナル抗体（アンタゴニスト、及び中和抗体を含む）、多エピトープ特異性を持つ抗PRO197、抗PRO207、抗PRO226、抗PRO232、抗PRO243、抗PRO256、抗PRO269、抗PRO274、抗PRO304、抗PRO339、抗PRO1558、抗PRO779、抗PRO1185、抗PRO1245、抗PRO1759、抗PRO5775、抗PRO7133、抗PRO7168、抗PRO5725、抗PRO202、抗PRO206、抗PRO264、抗PRO313、抗PRO342、抗PRO542、抗PRO773、抗PRO861、抗PRO1216、抗PRO1686、抗PRO1800、抗PRO3562、抗PRO9850、抗PRO539、抗PRO4316又は抗PRO4980抗体組成物、一本鎖の抗PRO197、抗PRO207、抗PRO226、抗PRO232、抗PRO243、抗PRO256、抗PRO269、抗PRO274、抗PRO304、抗PRO339、抗PRO15

30

40

50

58、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体、及び抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体の断片を包含している（下記参照）。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、すなわち、構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である集団から得られる抗体を称する。

【0044】

ハイブリッド形成反応の「緊縮性」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度は低くなる。ハイブリッド形成は、一般的に、相補的鎖がその融点に近いがそれより低い環境に存在する場合における変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリッド形成可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をより緊縮性にするが、低い温度は緊縮性を低下させる。さらに、緊縮性は塩濃度に逆比例する。ハイブリッド形成反応の緊縮性の更なる詳細及び説明は、Ausubel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デンハート液、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は、20%ホルムアミド、5xSSC (150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム (pH7.6)、5xデンハート液、10%デキストラン硫酸、及び20mg

／m L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1 x SSC中37-50℃でのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識するであろう。

【0045】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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、又は幾つかの他の試薬によって同定できるエピトープを提供するに十分な数の残基を有しているが、その長さは対象とするPROポリペプチドの活性を阻害しないよう充分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8～約50のアミノ酸残基（好ましくは約10～約20の残基）を有する。

【0046】

ここで意図している「活性な」及び「活性」とは、天然又は天然発生のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの生物学的及び／又は免疫学的活性／特性を保持するPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの形態を意味し、「生物学的」活性とは、天然又は天然発生のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドによって生ずる（阻害性又は刺激性の）生物学的機能であって、天然又は天然発生のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドが有する抗原性エピトープに対

して抗体を生成する能力を除くものを意味し、「免疫学的」活性とは、天然又は天然発生のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドが有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力を意味する。

【0047】

10

ここに開示されるスクリーニングアッセイによって同定できる抗体又は他のアンタゴニスト分子（例えば、有機又は無機小分子、ペプチド等）の文脈における「生物学的活性」は、それらの分子がここに同定される増幅された遺伝子にコードされるペプチドと結合又は複合体形成する能力、又はコード化ポリペプチドと他の細胞性タンパク質との相互作用を妨害する能力、又はPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの転写又は翻訳を妨害する能力を指す。好ましい生物学的活性は、標的細胞の成長阻害である。他の好ましい生物学的活性は、標的腫瘍細胞の死をもたらす細胞毒性活性である。

20

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの文脈における「生物学的活性」という用語は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドが腫瘍形成細胞成長又は制御されない細胞成長を誘発する能力を意味する。

30

【0048】

「免疫学的活性」という語は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの少なくとも1つのエピトープとの免疫学的交差反応性を意味する。

40

ここで用いられる「免疫学的交差反応性」とは、候補ポリペプチドが、この活性を持つPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO

50

779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの定性的生物学的活性を、周知の活性なPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに対して生じたポリクローナル抗血清と競合的に阻害できることを意味する。そのような抗血清は、例えばヤギ又はウサギに、完全フロイントアジュバント中の周知の活性類似物を皮下注射し、次いで不完全フロイント中で腹膜内又は皮下に追加免疫することにより従来の方法で調製される。免疫学的交差反応性は好ましくは「特異的」であり、これは同定される免疫学的交差反応性分子（例えば抗体）の対応するPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに対する結合親和性が、その分子の他の任意の知られた天然ポリペプチドに対する結合親和性より有意に高い（好ましくは少なくとも約2倍、より好ましくは少なくとも約4倍、さらにより好ましくは少なくとも約8倍、最も好ましくは少なくとも約10倍高い）ことを意味する。

10

20

30

40

50

【0049】

「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のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの生物学的活性又はその転写又は翻訳を全体的又は部分的に阻止、阻害、又は中和する任意の分子を含む。好適なアンタゴニスト分子は特に、アンタゴニスト抗体又は抗体断片、断片、ペプチド、有機小分子、アンチセンス核酸などを含む。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドのアンタゴニストの同定方法は、候補アンタゴニスト分子と接触させ、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO

342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに通常付随する一又は複数の生物学的活性の変化を測定することを含みうる。

「小分子」は、ここで約500ダルトン未満の分子量を有すると定義される。

【0050】

「抗体」(Abs)及び「免疫グロブリン」(Igs)は同じ構造的特徴を持つ糖タンパク質である。抗体は特定の抗原に対する特異性を示すが、免疫グロブリンは抗体及び抗原特異性を持たない他の抗体様分子の両方を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えば、リンパ系によって低レベルで、ミエローマによって向上したレベルで生産される。「抗体」という用語は最も広い意味で使用され、限定されることなく、無傷のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷の抗体から形成される多重特異的抗体(例えば二重特異的抗体)、及びそれらが所望の生物学的活性を有している限り抗体断片を包含する。

「天然抗体」及び「天然免疫グロブリン」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖からなる、約150,000ダルトンの異種四量体糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は、異なった免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の中で変化する。また各重鎖と軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド架橋を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン(V_H)を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)を、他端に定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

【0051】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域又は相補性決定領域(CDRs)と呼ばれる3つ又は4つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク(FR)領域と呼ばれる。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、CDRにより連結された β -シート配置を主にとる4つ又5つのFR領域をそれぞれ含んでいる。各鎖のCDRは、FRにより近接して結合せしめられ、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat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毒性活性への抗体の関与を示す。

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

10

20

30

40

50

【0052】

「抗体断片」は、未変性の抗体の一部、好ましくは未変性の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、F a b、F a b'、F (a b')₂、及びF v断片；ダイアボディ (d i a b o d y)；直鎖状抗体 (Z a p a t a等, P r o t e i n E n g. 8 (10) : 1057-1062 [1995])；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成される多重特異的抗体を含む。

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

「F v」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、緊密に非共有的に結合した1つの重鎖と1つの軽鎖の二量体からなる。この配置では、V_H - V_L二量体の表面における抗原結合部位を決定するために各可変領域の3つのC D Rが相互作用する。正確には、6つのC D Rが抗体に抗原結合特異性を与える。しかし、単一の可変ドメイン（又は抗原特異的な3つのC D Rしか含まないF vの半分）でさえも抗原を認識し結合する能力を持つが、結合部位全体よりは親和性が低い。

また、F a b断片は軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン (C H 1) も含む。F a b断片は、抗体ヒンジ領域からの1つ又は複数のシステインを含む重鎖C H 1ドメインのカルボキシル末端における数個の残基の付加によりF a b断片と相違する。F a b' - S Hは、ここにおいて、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を持つF a b'の記号である。F (a b')₂抗体断片は、元々、それらの間にヒンジシステインを持つF a b'断片の対として生成された。抗体断片の他の化学的結合も知られている。任意の種からの抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ (κ) 及びラムダ (λ) と呼ばれる1つ又は2つの明らかに異なる型に分類できる。

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、免疫グロブリンは異なるクラスに分けられる。免疫グロブリンの5つの主要なクラス：I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g Mがあり、これらの幾つかは、更にサブクラス（アイソタイプ）、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A及びI g A 2に分けられる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、各々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三次元配置は良く知られている。

【0053】

ここで用いられる「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団、即ち、集団を構成する個々の抗体が少量で存在する自然に起こりうる突然変異以外は同一である集団から得られる抗体を意味する。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に向けられている。さらに、典型的に異なる決定基（エピトープ）に対して向けられた異なる抗体を含む従来の（ポリクローナル）抗体とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して向けられている。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養によって合成され、他の免疫グロブリンに汚染されない点において有利である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体集団から得られ、任意の特定の方法による抗体の生産を必要とするとは解釈されない抗体の特徴を示す。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、K o h l e r等,

N a t u r e, 256 : 495 [1975]によって最初に記載されたハイブリドーマ法により作成してもよいし、組換えDNA法（例えば、米国特許第4, 816, 567号参照）により作成してもよい。また「モノクローナル抗体」はファージ抗体ライブラリから、例えば、C l a c k s o n等, N a t u r e, 352 : 624-628 [1991]及びM a r k s等, J. M o l. B i o l., 222 : 581-597 (1991)に記載された技術を用いて単離してもよい。

ここで、モノクローナル抗体は特に、「キメラ」抗体（免疫グロブリン）を含み、それは

、重鎖又は軽鎖の一部が特定の種から誘導された又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又は相同であるが、鎖の残りの部分は他の種から誘導された又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又は相同である抗体、並びにそれらが所望のお生物学的活性を示す限りにおいてそれらの抗体の断片である（米国特許第4, 816, 567号；Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 [1984]）。

【0054】

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小配列を含有する特定のキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はそれらの断片（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ あるいは抗体の他の抗原結合性配列）である。大部分において、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であって、そのレシピエントの相補性決定領域（CDR）が、マウス、ラット、ヤギなどのヒト以外の種のCDR（ドナー抗体）に由来する所望の特異性、親和性及び容量を持つ残基で置換されている。ある場合は、ヒト免疫グロブリンのFvFR枠残基が対応する非ヒト残基で置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、輸入されるCDR又は枠配列にも見られない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに精密かつ最適化するために施される。一般にヒト化抗体は、CDR領域の全て又は実質上全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全て又は実質上全てがヒト免疫グロブリン共通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部を含有するであろう。また、最適なヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部も含有するであろう。さらなる詳細については、Jones等, Nature 321: 522-525 (1986)；Reichmann等, Nature 332: 323-329 (1988)；Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)を参照のこと。ヒト化抗体は、抗体の抗原結合領域が、関心のある抗原でマカクザルを免疫化することにより生産された抗体から由来するプリマタイズしたPRIMATIZED（商品名）抗体を含む。

【0055】

「一本鎖Fv」又は「sFv」抗体断片は、抗体のV_H及びV_Lドメインを含む抗体断片を含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、FvポリペプチドはV_H及びV_Lドメイン間にポリペプチドリッカーを更に含み、それはsFvが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。sFvの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖（V_H-V_L）内で軽鎖可変ドメイン（V_L）に重鎖可変ドメイン（V_H）が結合している。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成を可能にするリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディーは、例えば、EP404097；WO93/11161；及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)に更に詳細に記載されている。

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他の非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、（1）ローリー（Lowry）法によって決定した場合95重量%以上の、最も好ましくは99重量%の抗体まで、（2）スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは（3）クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた

還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

【0056】

「標識」という語は、ここで用いられる場合、抗体に直接的又は間接的に結合して「標識化」抗体を生成する検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自身によって検出可能でもよく（例えば、放射性同位体標識又は蛍光標識）、あるいは、酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的変換を触媒してもよい。検出可能な標識を提供しうる放射性ヌクレオチドは、例えば、I-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、Re-186、At-211、Cu-67、Bi-212、及びPd-109を含む。

10

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

「リポソーム」は、哺乳動物への薬物（PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド又はそれらに対する抗体、場合によっては化学治療薬）の送達に有用な、脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤を含む種々の型の小さな小胞である。リポソームの成分は、通常は生物学的メンバーの脂質配列に類似した2層構造に配列される。

20

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

30

【0057】

II. 本発明の組成物と方法

40

A. 全長PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド

本発明は、本出願でPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PR

50

PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドと命名されるポリペプチドをコードする新規に同定され単離された核酸配列を提供する。特に下記の実施例でさらに詳細に説明するように、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードするcDNAが同定され単離された。別々の発現ラウンドで生成されたタンパク質には異なるPRO番号が与えられるが、UNQ番号は全ての与えられたDNA及びコード化タンパク質に独特であり、変わることはないことを記しておく。しかしながら、単純化のために、本明細書において、ここに開示した全長天然核酸分子にコードされるタンパク質並びに上記のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の定義に含まれるさらなる天然相同体及び変異体は、それらの起源又は調製形式に関わらず、「PRO197」、「PRO207」、「PRO226」、「PRO232」、「PRO243」、「PRO256」、「PRO269」、「PRO274」、「PRO304」、「PRO339」、「PRO1558」、「PRO779」、「PRO1185」、「PRO1245」、「PRO1759」、「PRO5775」、「PRO7133」、「PRO7168」、「PRO5725」、「PRO202」、「PRO206」、「PRO264」、「PRO313」、「PRO342」、「PRO542」、「PRO773」、「PRO861」、「PRO1216」、「PRO1686」、「PRO1800」、「PRO3562」、「PRO9850」、「PRO539」、「PRO4316」又は「PRO4980」と呼称する。

下記の実施例に開示するように、周知のクローン：DNA30869、DNA34405、DNA36995、DNA43320、DNA38649、DNA56505、DNA48303、DNA50798、DNA66489、DNA80896、DNA96791、及びDNA58725以外は、cDNAクローンがATCCに寄託されている。これらのクローンの正確なヌクレオチド配列は、この分野で日常的な方法を用いて寄託されたクローンを配列決定することにより容易に決定することができる。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。ここに記載したPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。

【0058】

B. PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980変異体

ここに記載した全長天然配列PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドポリペプチドに加えて、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980変異体も調製できると考えられる。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980変異体は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の翻訳後プロセスを

変えうることを理解するであろう。

【0059】

天然全長配列PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980又はここに記載したPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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技術及び指針の任意のものをを用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980と比較してPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980のアミノ酸配列が変化する、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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による。いずれのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO12

45、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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タンパク質によって提示された活性について試験することにより決定される。

【0060】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド断片がここに提供される。このような断片は、例えば、全長天然タンパク質と比較した際に、N-末端又はC-末端で切断されてもよく、又は内部残基を欠いていてもよい。或る種の断片は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの所望の生物学的活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980断片は、多くの従来技術の任意のものによって調製してよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法は、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基によって決定される部位のタンパク質を切断することが知られた酵素でタンパク質を処理することにより、あるいは適当な制限酵素でDNAを消化して所望の断片を単離することによるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980断片の生成を含む。さらに他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により、所望のポリペプチド断片をコードするDNA断片を単離し増幅することを含む。DNA断片の所望の末端を決定するオリゴヌクレオチドは、PCRの5'及び3'プライマーで用いられる。好ましくは、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO24

3、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド断片は、天然のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドと少なくとも1つの生物学的及び／又は免疫学的活性を共有する。

【0061】

特別の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換と題して表3に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表3に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より置換的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

表3

元の残基

例示的置換

好ましい置換

Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

ポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の実質的な修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b)標的部位の電荷又は疎水性、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。

【0062】

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（ 10
非保存）部位に導入されうる。

変異は、オリゴヌクレオチド媒介（部位特異的）突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びPCR突然変異誘発 [Carter等, Nucl. Acids Res., 13 : 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10 : 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [Wells等, Gene, 34 : 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発 [Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317 : 415 (1986)]等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができ、又は他の知られた技術をクローニングしたDNAに実施してPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO 20
339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980変異体DNAを作成することもできる。

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham 30
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 & amp; 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。

【0063】

C. PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO 40
256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の修飾

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO26 50

4、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一型は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの選択された側鎖又はN-又はC-末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることである。二官能性試薬での誘導体化が、例えばPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を水不溶性支持体マトリクスあるいは抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980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。

【0064】

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。

本発明の範囲内に含まれるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、ここで意図されるのは、天然配列PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980に見られる1又は複数の炭水化物部分の欠失（存在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び／又は酵素的手段によるグリコシル化の削除のいずれかによる）、及び／又は天然配列PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980に存在しない1又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。さらに、この文節は、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含む。

【0065】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴ってもよい。この変更は、例えば、1又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980（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。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPR

PRO4980 アミノ酸配列は、場合によっては、DNAレベルでの変化、特に、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることを通して変更されてもよい。

10

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。このような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に発行されたWO 87/05330、及びApplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

20

【0066】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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。

30

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の共有結合的修飾の他の型は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PR

40

50

PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つへの、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。

また、本発明のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。

10

20

【0067】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗ー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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980との融合を含む。エピトープタグは、一般的にはPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980のアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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、抗ータグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、

30

40

50

PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン (poly-His) 又はポリ-ヒスチジン-グリシン (poly-His-gly) タグ; flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Field等, Mol. Cell Biol., 8:2159-2165 (1988)]; c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; 及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD) タグ及びその抗体 [Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)] を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; KT3エピトープペプチド [Martin等, Science, 255:192-194 (1992)]; α -チューブリンエピトープペプチド [Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; 及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)] を含む。

【0068】

それに換わる実施態様では、キメラ分子はPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合を含んでもよい。キメラ分子の二価形態(「イムノアドヘシン」とも呼ばれる)については、そのような融合体はIgG分子のFc領域であり得る。Ig融合体は、好ましくはIg分子内の少なくとも1つの可変領域に換えてPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの可溶化(膜貫通ドメイン欠失又は不活性化)形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、IgG分子のヒンジ、CH2及びCH3、又はヒンジ、CH1、CH2及びCH3領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5,428,130号を参照のこと。

【0069】

D. PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの調製
以下の説明は、主として、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339

9、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を生産する方法に関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いてPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を調製することができると考えられる。例えば、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を生産してもよい。

【0070】

a. PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO

256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードするDNAの単離PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードするDNAは、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980mRNAを保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたcDNAライブラリから得ることができる。従って、ヒトPRO197、ヒトPRO207、ヒトPRO226、ヒトPRO232、ヒトPRO243、ヒトPRO256、ヒトPRO269、ヒトPRO274、ヒトPRO304、ヒトPRO339、ヒトPRO1558、ヒトPRO779、ヒトPRO1185、ヒトPRO1245、ヒトPRO1759、ヒトPRO5775、ヒトPRO7133、ヒトPRO7168、ヒトPRO5725、ヒトPRO202、ヒトPRO206、ヒトPRO264、ヒトPRO313、ヒトPRO342、ヒトPRO542、ヒトPRO773、ヒトPRO861、ヒトPRO1216、ヒトPRO1686、ヒトPRO1800、ヒトPRO3562、ヒトPRO9850、ヒトPRO539、ヒトPRO4316又はヒトPRO4980DNAは、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製されたcDNAライブラリから簡便に得ることができる。またPRO197-、PRO207-、PRO226-、PRO232-、PRO243-、PRO256-、PRO269-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO206-、PRO264-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO773-、PRO861-、PRO1216-、PRO1686-、PRO1800-、PRO3562-、PRO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO4980-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリから又は既知の合成方法（例えば、自動化核酸合成）により得ることもできる。

【0071】

ライブラリは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ（PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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のスクリーニングは、例えばSambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードする遺伝子を単離する他の方法はPCR法を使用するものである[Sambrook等, 上掲; Dieffenbach等, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

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

このようなライブラリスクリーニング法において同定された配列は、Genbank等の公共データベース又は個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内又は全長に渡っての(アミノ酸又は核酸レベルのいずれかでの)配列同一性は、この分野で知られた、そしてここに記載した方法を用いて決定することができる。

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

【0072】

b. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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Sambrook等, 上掲に見出すことができる。

原核生物細胞形質移入及び真核生物細胞形質移入の方法、例えば、CaCl₂、CaPO

4、リボソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲の Sambrook 等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トウメファシエンスによる感染が、Shaw 等, Gene, 23:315 (1983) 及び 1989 年 6 月 29 日公開の WO 89/05859 に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham 及び van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978) のリン酸カルシウム沈降法が好ましい。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第 4,399,216 号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van solingen 等, J. Bact., 130:946 (1977) 及び Hsiao 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979) の方法に従って実施される。しかしながら、DNA を細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown 等, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) 及び Mansour 等, Nature, 336:348-352 (1988) を参照のこと。

【0073】

ここに記載のベクターに DNA をクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌 K12 株 MM294 (ATCC 31,446)；大腸菌 X1776 (ATCC 31,537)；大腸菌株 W3110 (ATCC 27,325) 及び K5772 (ATCC 53,635) である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、E. coli、エンテロバクター、エルビニア (Erwinia)、クレブシエラ (Klebsiella)、プロテウス (Proteus)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス (Serratia marcescans)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバシリスブチリス (B. subtilis) 及びバシリリチェニフォルミス (B. licheniformis) (例えば、1989 年 4 月 12 日発行の DD 266,710 に記載されたバシリリチェニフォルミス 41P)、シュードモナス、例えば緑膿筋及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株 W3110 は、組換え DNA 生産発行のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株 W3110 は、細胞に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異をするように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型 tonA を有する大腸菌 W3110 株 1A2；完全な遺伝子型 tonA ptr3 を有する大腸菌 W3110 株 9E4；完全な遺伝子型 tonA prt3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r を有する大腸菌 W3110 株 27C7 (ATCC 55,244)；完全な遺伝子型 tonA ptr3 phoA E15 (algF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r を有する大腸菌 W3110 株 37D6；非カナマイシン耐性 degP 欠失変異を持つ 37D6 株である大腸菌 W3110 株 40B4；及び 1990 年 8 月 7 日発行の米国特許第 4,946,783 号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えば PCR 又は他の核酸ポリメラーゼポリメラーゼ反応が好ましい。

【0074】

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、PRO197-、PRO2

07-、PRO226-、PRO232-、PRO243-、PRO256-、PRO2
 69-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO
 779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-
 、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO2
 06-、PRO264-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO7
 73-、PRO861-、PRO1216-、PRO1686-、PRO1800-、P
 RO3562-、PRO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO49
 80-コード化ベクターのための適切なクロ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、シズサッカ
 ロミセスプロンプ (*Schizosaccharomyces prombe*) (Bea 10
 ch及びNurse, Nature, 290: 140 [1981]; 1985年5
 月2日発行のEP 139, 383); クルベロミセスホスト (*Kluveromyce
 s hosts*) (米国特許第4, 943, 529号; Fleer等, Bio/Tec
 hnology, 9: 968-975 (1991))、例えばケーラクチス (*K. l
 actis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvenco
 urt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. bulga
 ricus*) (ATCC 16, 045)、ケーウィケラミイ (*K. wickerami
 i*) (ATCC 24, 178)、ケーワルチイ (*K. waltii*) (ATCC 56
 , 500)、ケードロソフィラルム (*K. drosophilum*) (ATCC 3 20
 6, 906; Van den Berg等, Bio/Technology, 8: 13
 5 (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 18
 3, 070; Sheekrishna等, J. Basic Microbiol, 2
 8: 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. Ac
 ad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]); シュワニオマ
 イセス (*schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス
 (*occidentalis*) (1990年10月31日発行のEP 394, 538) 30
 ; 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 (*Toly
 pocladium*) (1991年1月10日発行のWO 91/00357); 及びコ
 ウジ菌、例えば偽巢性コウジ菌 (Ballance等, Biochem. Biophy
 s. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilbu
 rn等, Gene, 26: 205-221 [1983]; Yelton等, Pro
 c. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [198
 4]) 及びクロカビ (Kelly及びHynes, EMBO J., 4: 475-47
 9 [1985]) が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック (*methylotr
 opic*) 酵母は、これらに限られないが、ハンセンラ (*Hansenula*)、カンジ
 ダ、クloeckera (*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
 Methylotrrophs, 269 (1982) に記載されている。
 グリコシル化PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243
 、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1
 558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO57
 75、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206
 、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO8
 61、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO98 50

50、PRO539、PRO4316又はPRO4980の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエS2及びスポドスペラSf9等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)及びCOS細胞を含む。より詳細な例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); チャイニーズハムスター卵巣細胞/DHFR(CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)) ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065); 及びマウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL 51)を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

【0075】

c. 複製可能なベクターの選択及び使用

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードする核酸(例えば、cDNA又はゲノムDNA)は、クローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980は直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるPRO197-、PRO207-、PRO226-、PRO232-、PRO243-、PRO256-、PRO269-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO206-、PRO264-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO773-、PRO861-、PRO1216-、PRO1686-、PRO1800-、PRO3562-、PRO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO4980-コード化DNAの一部である。シグナル配列は、例え

ばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、l p pあるいは熱安定性エンテロトキシン I I リーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インペルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（酵母菌属（*Saccharomyces*）及びクルイベロマイシス（*Kluyveromyces*） α 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5, 010, 182号に記載されている）、又は酸ホスファターゼリーダー、白体（*C. albicans*）グルコアミラーゼリーダー（1990年4月4日発行のEP 362179）、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。

10

【0076】

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

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、（a）アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、（b）栄養要求性欠陥を補い、又は（c）例えばバシリに対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。哺乳動物細胞に適切な選べるマーカーの例は、DHFRあるいはチミジンキナーゼのように、PRO197-、PRO207-、PRO226-、PRO232-、PRO243-、PRO256-、PRO269-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO206-、PRO264-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO773-、PRO861-、PRO1216-、PRO1686-、PRO1800-、PRO3562-、PRO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO4980-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、Ur laub 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）〕。

20

30

40

【0077】

発現及びクローニングベクターは、通常、PRO197-、PRO207-、PRO226-、PRO232-、PRO243-、PRO256-、PRO269-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO206-、PRO264-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO773-、PRO861-、PRO1216-、PRO1686-、PRO1800-、PRO3562-、P

50

RO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO4980-コード化核酸配列に作用可能に結合し、mRNA合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識される好適なプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは β -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 [Cahng等, Nature, 275:615 (1978); Goeddel等, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36, 776]、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーター [deBoer等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]を含む。細菌系で使用するプロモーターもまたPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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 [Hitzman等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)]又は他の糖分解酵素 [Hess等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1987)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

【0078】

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。

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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。

【0079】

より高等の真核生物によるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、

PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン）。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー（100-270塩基対）、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオ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、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980コード化配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

また真核生物宿主細胞（酵母、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、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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、Getthing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。

【0080】

d. 遺伝子増幅／発現の検出

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

10

20

30

40

50

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

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び／又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980DNA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。

【0081】

e. ポリペプチドの精製

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-X100)又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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。

【0082】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO

7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の性質に依存する。

【0083】

E. PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードする遺伝子の腫瘍組織及び細胞系における増幅

本発明はある種の癌細胞で増幅される遺伝子の同定及び特徴付けに基づいている。

原核及び真核生物のゲノムは、2つの一見して矛盾する要件を受ける。一方は、遺伝情報としてのDNAのその最初の形態での保存及び繁殖であり、複数の世代を通して安定な遺伝を確保する。他方では、細胞又は生物が最近の環境変化を採用しなければならない。適応メカニズムは遺伝子物質の質的又は量的改変を含みうる。質的改変は、コード化配列が変化して構造的又は機能的に異なるタンパク質を生ずるDNA変異を含む。遺伝子増幅は量的改変であり、それにより実際の完全なコード化配列、即ち遺伝子の数が増加し、転写に利用できるテンプレート数の増加、翻訳可能な転写物の数の増加、及び最終的には増幅された遺伝子にコードされるタンパク質の量の増加をもたらす。

遺伝子増幅の現象及びそこに存在するメカニズムは、幾つかの原核及び真核生物細胞培養系でインビトロ実験されている。遺伝子増幅の最も特徴づけられた例は、種々の濃度の細胞毒性薬メトトレキセート(MTX)を含有する培地での真核生物細胞の培養を含む。MTXは葉酸類似物であり酵素デヒドロフォレートレダクターゼ(DHFR)のブロックに

よりDNA合成を妨害する。低濃度のMTXに最初に曝露すると殆どの細胞（> 99.9%）が死亡する。少量の細胞は生き残り、多量のDHFR-RNA及びタンパク質を生産することによりMTX濃度を増加させても成長できる。この過剰生産の基礎は単一のDHFR遺伝子の増幅である。遺伝子のさらなるコピーは、小さく過剰な染色体（二重微小）の形態で染色体外コピーとして、又は一体化染色体コピーとして見られる。

【0084】

遺伝子増幅は、細胞毒性薬（細菌に対する抗生物質及び真核生物に対する化学治療薬）への耐性の進行及び腫瘍形成性形質転換において最も普通に起こる。自発的事象としての又はウイルス又は化学／環境侵襲による真核生物の形質転換は典型的にその細胞の遺伝物質における変化を伴う。ヒト悪性収容で観察される最も通常の遺伝的变化はp53タンパク質の突然変異である。p53は、定常（G1）から複製（S）相への細胞の転移を制御し、DNA損傷の存在下でこの転移を防止する。言い換えれば、p53変異不全の主な結果の一つは、DNA損傷の蓄積及び成長、即ち遺伝的变化である。腫瘍形成細胞における遺伝的变化の通常の型は、点変異に加えて、増幅及び全体、構造的改変、例えば転位置である。

DNA配列の増幅は、DHFR実験系で例示したように特定の機能的要件を示す。従って、悪性におけるある種のオンコジーンを増幅は悪性形質転換及び形質転換フェノタイプの維持のプロセスにおけるこれらの遺伝子の原因となる役割を示す。この仮説が最近の研究で支持されている。例えば、bcl-2タンパク質はある型の非ホジキンリンパ腫において増幅されることが見いだされた。このタンパク質はアポトーシスを阻害して腫瘍形成細胞の蓄積を進行させる。成長因子レセプターの遺伝子ファミリーのメンバーが種々の型の癌で増幅されることが見いだされ、これらのレセプターの過剰発現が、腫瘍細胞の制限された量の利用可能な成長因子に対する感受性を低下させる。例としては、アンドロゲン欠乏治療の間の再発前立腺癌におけるアンドロゲンレセプターの増幅、及び乳癌における成長因子レセプター相同体ERB2の増幅を含む。最近、細胞間シグナル伝達及び細胞周期進行に含まれる遺伝子が悪性形質転換の間に増幅を受けうる。これは、種々の上皮及びリンパ腫瘍形成におけるbcl-1及びras遺伝子の増幅によって例示される。

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

【0085】

増幅されたゲノム配列を示すのに幾つかの異なる技術を使用できる。癌細胞から調製した染色体展開の古典的な細胞発生分析は、転位置、欠失及び変換といった全体構造変化を同定するには十分である。増幅ゲノム領域は、それらが高いコピー数を含むか染色体外物質として存在する場合にのみ可視化される。細胞発生は特定の腫瘍形成を持つ特定の染色体変化の一貫した関係を示すための第1の技術だが、管理可能なDNA配列の同定及び単離には不十分である。より最近に開発された技術の競合ゲノムハイブリッド形成（CGH）は腫瘍形成におけるゲノム増幅の広範な現象を例示する。腫瘍及び正常DNAは正常細胞の分裂中期に同時にハイブリッド形成し、腫瘍に高頻度で存在するDNA配列についての画像分析で全ゲノムをスクリーニングする（WO 93/18,186; Gray等, Radiation Res. 137: 275-289 [1994]）。スクリーニング法として、このタイプの分析は、種々のヒト腫瘍における再発アンプリコン（増幅DNAの伸展）の多数を明らかにした。CGHは古典的細胞発生分析よりDNAの増幅伸展の同定において感度が高いが、それは標準的な遺伝子技術によりアンプリコン内のコード化配列の迅速な同定及び単離ができない。

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

10

20

30

40

50

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

【0086】

本発明により、このような遺伝子は定量的PCR (S. Gelmini等, Clin, Chem. 43: 752 [1997]) により、乳、肺、結腸、前立腺、脳、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、精巣、卵巣、子宮など、腫瘍、又は腫瘍細胞系を含む種々の一次腫瘍からのDNAを健常ドナーからのプールしたDNAと比較することにより同定される。定量的PCRは、Taqman装置 (ABI) を用いて実施された。遺伝子特異的プライマー及び蛍光発生プローブは、DNAのコード化配列に基づいて設計される。

ヒト肺癌細胞系は、A549 (SRCC768)、Calu-1 (SRCC769)、Calu-6 (SRCC770)、H157 (SRCC771)、H441 (SRCC772)、H460 (SRCC773)、SKMES-1 (SRCC774)、SW900 (SRCC775)、H522 (SRCC832)、及びH810 (SRCC833)、を含み、全てATCCから入手可能である。原発ヒト肺腫瘍細胞は通常は腺癌、扁平上皮細胞癌、大細胞癌、非小細胞癌、小細胞癌、及び気管支肺胞癌から誘導され、例えば、SRCC724 (「AdenoCa」と略記される腺癌) (LT1)、SRCC725 (「SqCCa」と略記される扁平上皮細胞癌) (LT1a)、SRCC726 (腺癌) (LT2)、SRCC727 (腺癌) (LT3)、SRCC728 (腺癌) (LT4)、SRCC729 (扁平上皮細胞癌) (LT6)、SRCC730 (腺／扁平上皮細胞癌) (LT7)、SRCC731 (腺癌) (LT9)、SRCC732 (扁平上皮細胞癌) (LT10)、SRCC733 (扁平上皮細胞癌) (LT11)、SRCC734 (腺癌) (LT12)、SRCC735 (腺／扁平上皮細胞癌) (LT13)、SRCC736 (扁平上皮細胞癌) (LT15)、SRCC737 (扁平上皮細胞癌) (LT16)、SRCC738 (扁平上皮細胞癌) (LT17)、SRCC739 (扁平上皮細胞癌) (LT18)、SRCC740 (扁平上皮細胞癌) (LT19)、SRCC741 (肺細胞癌、「LCCa」と略記) (LT21)、SRCC811 (腺癌) (LT22)、SRCC285 (腺癌) (LT8)、SRCC886 (腺癌) (LT25)、SRCC887 (扁平上皮細胞癌) (LT26)、SRCC888 (腺-BAC癌) (LT27)、SRCC889 (扁平上皮細胞癌) (LT28)、SRCC890 (扁平上皮細胞癌) (LT29)、SRCC891 (腺癌) (LT30)、SRCC892 (扁平上皮細胞癌) (LT31)、SRCC894 (腺癌) (LT33) を含む。また、SRCC1125 [HF-000631]、SRCC1127 [HF-000641]、SRCC1129 [HF-000643]、SRCC1133 [HF-000840]、SRCC1135 [HF-000842]、SRCC1227 [HF-001291]、SRCC1229 [HF-001293]、SRCC1230 [HF-001294]、SRCC1231 [HF-001295]、SRCC1232 [HF-001296]、SRCC1233 [HF-001297]、SRCC1235 [HF-001299]、及びSRCC1236 [HF-001300] と称されるヒト肺腫瘍も含まれる。

【0087】

大腸癌細胞系は、例えば、ATCC細胞系SW480 (腺癌、SRCC776)、SW620 (結腸腺癌のリンパ節転移、SRCC777)、Colo320 (癌、SRCC778)、HT29 (腺癌、SRCC779)、HM7 (ATCC大腸腺癌細胞系LS174Tの高ムチン産生変異体、SRCC780、Robert Warren博士, UCSFから得た)、CaWiDr (腺癌、SRCC781)、HCT116 (癌、SRCC782)、SKCO1 (腺癌、SRCC783)、SW403 (腺癌、SRCC784)、LS174T (癌、SRCC785)、Colo205 (癌、SRCC828)、HCT15 (癌、SRCC829)、HCC2998 (癌、SRCC830)、及びKM12 (癌、SRCC831) を含む。原発大腸腫瘍は、CT2 (SRCC742)、CT3 (SRCC

C743)、CT8 (SRCC744)、CT10 (SRCC745)、CT12 (SRCC746)、CT14 (SRCC747)、CT15 (SRCC748)、CT16 (SRCC749)、CT17 (SRCC750)、CT1 (SRCC751)、CT4 (SRCC752)、CT5 (SRCC753)、CT6 (SRCC754)、CT7 (SRCC755)、CT9 (SRCC756)、CT11 (SRCC757)、CT18 (SRCC758)、CT19 (腺癌、SRCC906)、CT20 (腺癌、SRCC907)、CT21 (腺癌、SRCC908)、CT22 (腺癌、SRCC909)、CT23 (腺癌、SRCC910)、CT24 (腺癌、SRCC911)、CT25 (腺癌、SRCC912)、CT26 (腺癌、SRCC913)、CT27 (腺癌、SRCC914)、CT28 (腺癌、SRCC915)、CT29 (腺癌、SRCC916)、CT30 (腺癌、SRCC917)、CT31 (腺癌、SRCC918)、CT32 (腺癌、SRCC919)、CT33 (腺癌、SRCC920)、CT35 (腺癌、SRCC921)、及びCT36 (腺癌、SRCC922)と称される大腸腺癌を含む。また、SRCC1051 [HF-000499]、SRCC1052 [HF-000539]、SRCC1053 [HF-000575]、SRCC1054 [HF-000698]、SRCC1059 [HF-000755]、SRCC1060 [HF-000756]、SRCC1142 [HF-000762]、SRCC1144 [HF-000789]、SRCC1146 [HF-000795] 及びSRCC1148 [HF-000811]と称されるヒト大腸腫瘍中心も含まれる。

【0088】

ヒト乳癌細胞系は、例えば、HBL100 (SRCC759)、MB435s (SRCC760)、T47D (SRCC761)、MB468 (SRCC762)、MB175 (SRCC763)、MB361 (SRCC764)、BT20 (SRCC765)、MCF7 (SRCC766) 及びSKBR3 (SRCC767)、及びSRCC1057 [HF-000545]と称されるヒト乳房腫瘍中心を含む。また、SRCC1094、SRCC1095、SRCC1096、SRCC1097、SRCC1098、SRCC1099、SRCC1100及びSRCC1101と称されるヒト乳房腫瘍、及びSRC893 [LT32]と称されるヒト乳房-me t-肺-NS腫瘍も含まれる。

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

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

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

ヒト副甲状腺腫瘍はSRCC1002 [HF-000831] 及びSRCC1003 [HF-000832]を含む。

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

【0089】

F. 組織分布

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

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

あるいは、種々の組織における遺伝子発現は、遺伝子産物を直接定量化するための、組織

断片及び細胞培地又は体液の免疫組織学的染色などの免疫的方法によっても測定できる。免疫組織学的染色又は試料液のアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の動物から調製される。便利には、抗体は天然配列PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに対して、又はここに提供するDNA配列に基づく合成ペプチドに対して、又はPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド、PRO533、PRO214、PRO240、PRO211、PRO230、PRO261、PRO246又はPRO317DNA配列に融合し特異的抗体エピトープをコードする細胞外配列に対して調製される。抗体を生成する一般的技術、及びノーザンブロット及びインサイットハイブリッド形成のプロトコールは以下に提供する。

【0090】

G. 染色体マッピング

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

【0091】

H. 抗体結合実験

遺伝子増幅実験の結果は、腫瘍（癌）細胞上でのPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの発現を阻害する抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体の能力が試験される抗体結合実験によって更に確認できる。例示的な抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性、及びヘテロ抱合体抗体を含み、その調製は以下に記載する。

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

【0092】

競合的結合アッセイは、標識標準物の、限られた量の抗体との結合について試験分析物と競合する能力による。試験試料中の（腫瘍細胞で増幅された遺伝子にコードされる）標的タンパク質の量は、抗体に結合し始める標準物の量に逆比例する。結合し始める標準物の量の測定を促進するために、抗体は好ましくは競合の前又は後に固定化し、抗体に結合した標準品及び分析物が未結合で残っている標準物及び分析物から容易に分離できるようにする。 10

サンドウィッチアッセイは2つの抗体の使用を含み、各々が検出すべきタンパク質の異なる免疫原部分、又はエピトープに結合できる。サンドウィッチアッセイにおいて試験試料分析物は固体支持体上に固定化された第1の抗体に結合し、その後第2の抗体が分析物に結合し、よって不溶性の3成分複合体が形成される。例えば米国特許第4,376,110号参照。第2の抗体は検出可能部分で標識され（直接サンドウィッチアッセイ）、あるいは検出可能部分で標識された抗-免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい（間接サンドウィッチアッセイ）。例えば、サンドウィッチアッセイの一形態はELISAアッセイであり、この場合の検出可能部分は酵素である。

免疫組織学のためには、腫瘍試料は新鮮でも凍結したものでもよく、パラフィンに包埋して、例えばホルマリン等の保存剤で固定してもよい。 20

【0093】

I. 細胞ベースの腫瘍アッセイ

細胞ベースアッセイ及び腫瘍（例えば、癌）の動物モデルを用いて、遺伝子増幅アッセイに発見を確認し、ここでの遺伝子増幅と腫瘍形成細胞成長の進行及び病理との関係をさらに理解することができる。ここで同定する遺伝子産物の腫瘍又は癌の進行及び病理における役割は、ここで遺伝子を増幅すると同定された一次腫瘍細胞又は細胞系を用いて試験することができる。このような細胞は、例えば、上記した乳、大腸及び肺癌細胞及び細胞系を含む。

異なる方法では、特定の腫瘍に含まれることが知られた細胞型の細胞をこのcDNAで形質移入し、これらのcDNAの過剰成長誘発能力を分析する。適当な細胞は、例えば、B104-1-1（neuプロトオンコジーンで形質移入された安定なNIH-3T3細胞液）及びras-形質移入NIH-3T3細胞等の安定な腫瘍細胞系を含み、これらは所望の遺伝子で形質移入し、そして腫瘍形成的成長を監視できる。このような形質移入細胞系は、次いで、形質転換細胞の成長に対する細胞分裂停止又は細胞毒性活性の発揮により、又は抗体依存性細胞性細胞毒性（ADCC）の媒介により、ポリマー又はモノクローナル抗体又は抗体組成物の腫瘍形成細胞成長を阻害する能力を試験するのに使用できる。ここに同定した遺伝子のコード化配列で形質移入した細胞は、さらに、癌治療用の候補薬の同定に使用できる。 30

さらに、（下記のような）トランスジェニック動物の腫瘍から誘導された一次培地は、ここでの細胞ベースアッセイに使用できるが、安定な細胞系が好ましい。トランスジェニック動物から連続細胞系を誘導する技術はこの分野で良く知られている（Small等, Mol. Cell. Biol. 5, 642-648 [1985] 参照）。 40

【0094】

J. 動物モデル

腫瘍の進行及び原因におけるここに同定される遺伝子の役割を更に理解するために、そして抗体、及び小分子アゴニストを含む天然ポリペプチドの他のアゴニストを含む候補治療薬の有効性を試験するために、種々の良く知られた動物モデルが使用できる。これらのモデルのインビボ性質により、特にヒト患者における反応を予測できる。腫瘍及び癌（例えば、乳癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌など）の動物モデルは、非組換え及び組換え（トラン 50

スジェニック) 動物の両方を含む。非組換え動物モデルは、例えば、齧歯類、例えばマウスモデルを含む。このようなモデルは、標準的な技術、例えば、皮下注射、尾部静脈注射、脾臓移植、腹膜内移植、腎被膜下移植、又はオルトピン (orthopin) 移植、例えば大腸組織に移植された大腸癌細胞により、腫瘍細胞を同系マウスに導入することにより作成される。(1997年9月18日に発行されたPCT公報WO 97/33551 参照。)

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

10

【0095】

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

20

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

30

【0096】

乳癌の動物モデルは、例えば、神経芽腫細胞(それからneu癌遺伝子が最初に単離される)、又はneu形質移入NIH-3T3細胞をヌードマウスに移植することにより、基本的にはDrebin等, PNAS USA 83, 9129-9133 (1986)に記載されているように生成される。

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

40

動物に生じた腫瘍は、取り出してインビトロで培養することができる。インビトロ培地からの細胞は、次いで動物に継代することができる。これらの腫瘍は、さらなる試験及び薬物スクリーニングの標的として提供され得る。あるいは、継代から得られる腫瘍は単離でき、継代前細胞及び1又はそれ以上の継代後に単離した細胞のRNAを、対象とする遺伝

50

子の識別可能な発現について分析する。このような継代技術は、周知の腫瘍又は癌細胞系で実施することができる。

例えば、Met h A、CMS 4、CMS 5、CMS 2 1、及びWEHI-1 6 4がBALB/c雌マウスの線維肉腫に導入され（DeLeo等、J. Exp. Med. 146, 720 [1977]）、それは、種々の抗原の抗腫瘍活性の研究のための高度に制御可能なモデル系を提供する（Palladino等、J. Immunol. 138, 4023-4032 [1987]）。簡便には、腫瘍細胞は細胞培地中でインビトロで成長させる。動物に注射する前に、細胞系は洗浄してバッファー中に約 10×10^6 から 10×10^7 細胞/mlの細胞密度で懸濁する。次いで動物を10から100 μ lの細胞懸濁物で皮下感染し、腫瘍が現れるまで1から3週間放置する。

10

【0097】

さらに、最も完全に研究された実験的腫瘍の一つであるマウスのルイス肺（3LL）癌腫は、研究用腫瘍モデルとして用いることができる。この腫瘍モデルにおける有効性は、肺の小細胞癌腫（SCCL）と診断されたヒト患者の治療における有利な効果と相関していた。この腫瘍は、影響を受けたマウスからの腫瘍断片又は培地に残った細胞の注射に際して正常マウスに導入でき（Zupi等、Br. J. Cancer 41, suppl. 4, 309 [1980]）、証拠は、腫瘍がたった一つの細胞の注射から開始され、感染した腫瘍細胞の極めて高い集団が生存することを示している。この腫瘍モデルに関する更なる情報については、Zacharski, Haemostasis 16, 300-320 [1986]を参照のこと。

20

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

30

【0098】

組換え（トランスジェニック）動物モデルは、ここに同定された遺伝子のコード部分を、トランスジェニック動物作成のための標準的技術を用いて、対象とする動物のゲノムに導入することにより加工できる。トランスジェニック動物は、「導入遺伝子」又は動物自体又は動物の祖先に出生前段階（例えば胚段階）でゲノムに導入された遺伝物質を有するものである。トランスジェニック操作の標的として提供できる動物は、限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、及び非ヒト霊長類、例えばヒヒ、チンパンジー及びサルを含む。これらの動物に導入遺伝子を導入するのにこの分野で知られた技術は、全核マイクロインジェクション（Hoppe及びWanger, 米国特許第4, 873, 191号）；胚系列へのレトロウイルス媒介遺伝子転移（例えば、Van der Putten等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]）；胚性肝細胞での遺伝子標的化（Thompson等, Cell 56, 313-321 [1989]）；胚のエレクトロポレーション（Lo, Mol. Cell. Biol. 3, 1803-1814 [1983]）；精子媒介遺伝子転移（Lavitrano等, Cell 57, 717-73 [1989]）を含む。概説のためには、例えば、米国特許第4, 736, 866号を参照のこと。

40

50

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

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

10

【0099】

あるいは、動物の胚性細胞に導入されたPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードする変更ゲノムDNAと、そのポリペプチドをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、ここに同定するPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードする欠陥又は変更遺伝子を有する「ノックアウト」動物を作成することができる。例えば、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードするcDNAは、確立された技術に従い、当該ポリペプチドをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。特にPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部を欠失したり、組み込みを監視するために使用する選択可能なマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングDNA（5'と3'末端の両方）を数キロベース含む[例えば、相同的組換えベクターについてはThomas and Capecci, Cell, 51: 503 (1987)を参照のこと]。ベクターは胚性幹細胞に（例えばエレクトロポレーションによって）導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する[例えば、Li等, Cell, 69: 915 (

20

30

40

50

1992) 参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入され、集合キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152 参照]。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、「ノックアウト」動物を作ると言われる。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドが不在であることによるある種の病理的状态及び病理的状态の進行に対して防御する能力によって特徴付けられる。

【0100】

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

さらに、他の自発的動物腫瘍、例えばイヌ、ネコ、及びヒトの線維肉腫、腺癌、リンパ腫、クロンドローマ(chondroma)、平滑筋肉腫も試験できる。これらのイヌ及びネコでの乳腺癌は、その発現及び挙動がヒトのものに極めて類似しているのも、好ましいモデルである。しかし、このモデルの使用は動物におけるこの型の腫瘍の発生比率によって制限される。

【0101】

K. 候補薬についてのスクリーニングアッセイ

候補薬のスクリーニングアッセイは、ここで同定される遺伝子にコードされるポリペプチドと結合又は抱合する化合物、あるいはコード化ポリペプチドと他の細胞性タンパク質との相互作用を阻害する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、特に小分子候補薬の同定に適したものにする、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングに従うアッセイを含む。小分子とは、合成有機又は無機化合物を含むと考え、それらは、ペプチド、好ましくは可溶性ペプチド、(ポリ)ペプチド-免疫グロブリン融合体、特に、限定されないが、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びそれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。アッセイは、種々の形式で実施で

き、この分野で良く特徴付けられたタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ及び細胞ベースのアッセイを含む。

全てのアッセイは、それらが候補薬をここで同定される核酸にコードされるポリペプチドと、それら2成分が相互作用するのに十分な時間接触させることで共通している。

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

10

【0102】

候補化合物がここで同定される遺伝子にコードされる特定のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドと相互作用するが結合しない場合、その相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Fields及び共同研究者等[Fields及びSong, Nature (London) 340, 245-246 (1989); Chien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、Chevray及びNathans[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)]に開示されているように監視することができる。酵母菌GAL4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-lacZリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、β-ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット(MATCHMAKER(商品名))は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

20

30

40

【0103】

ここで同定されるPRO197-、PRO207-、PRO226-、PRO232-、

50

PRO243-、PRO256-、PRO269-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO206-、PRO264-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO773-、PRO861-、PRO1216-、PRO1686-、PRO1800-、PRO3562-、PRO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO4980-コード化配列と他の細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験することができる：通常は、増幅された遺伝子の生成物及び細胞内又は外成分を含む反応混合物を、条件下で2つの生成物が相互作用及び結合する時間に渡って調製する。試験化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物有り又は無しで実施する。さらに、第3の反応混合物にプラシーボを添加してポジティブ対照としてもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は外成分との結合（複合体形成）は上記のように監視する。対照反応において複合体が形成され、試験化合物を含む反応混合物ではしないことは、試験化合物が試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を妨害することを示す。

10

【0104】

アンタゴニストを検定するために、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを、特定の活性についてスクリーニングする化合物とともに細胞に添加してもよく、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド存在下で対象とする活性を阻害する当該化合物の能力が、当該化合物がPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド及び潜在的アンタゴニストを、膜結合PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、

20

30

40

50

PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドレセプター又は組換えレセプターと、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド分子の数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパンニング及びFACSソーティングにより同定できる。Coligan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、そこではポリアデニル化RNAがPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このRNAから生成されたcDNAライブラリがプールに分配され、COS細胞又は他のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに反応性でない細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を標識したPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに暴露する。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PR

PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的プロテインキナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフ分析を施す。ポジティブプールを同定し、相互作用サブプール化及び再スクリーニング工程を用いてサブプールを調製して再形質移入し、結果的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

【0105】

レセプター同定の代替的方法として、標識したPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをレセプター分子を発現する細胞膜又は抽出調製物に光親和性結合させることができる。架橋材料はPAGEに溶解させ、X線フィルムに暴露する。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチド断片に分離し、タンパク質マイクロ配列決定を施すことができる。マイクロ配列決定から得たアミノ酸配列は、推定レセプターをコードする遺伝子を同定するcDNAライブラリをスクリーニングする分解性オリゴヌクレオチドプローブの組の設計に用いられる。

アンタゴニストの他の検定では、レセプターを発現する哺乳動物細胞又は膜調製物を、候補化合物の存在下で標識PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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。

【0106】

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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリペプチドー及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イデオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが効果を与えず、よってPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの作用を競合的に阻害するPRO197、PRO2

07、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの変異形態であってもよい。

【0107】

他の潜在的なPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスRNA又はDNA作成物であり、例えば、アンチセンスRNA又はDNAは、標的mRNAにハイブリッド形成してタンパク質翻訳を妨害することによりmRNAの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、トリプルヘリックス形成又はアンチセンスDNA又はRNAを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法とともに、ポリペプチドヌクレオチドのDNA又はRNAへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード化部分は、約10から40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドの設計に使用される。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され（三重螺旋—Lee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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはインビボでmRNAにハイブリッド形成してmRNA分子のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドへの翻訳を阻止する（アンチセンス—Okano, *Neurochem.*, 56: 560 (1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors o*

f Gene Expression (SRS Press: Boca Raton, FL, 1988))。また上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に輸送され、アンチセンスRNA又はDNAをインビボで発現させて、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの産生を阻害することもできる。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

【0108】

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

潜在的アンタゴニストは、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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。

【0109】

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

転写阻害に用いられる三重螺旋形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介するトリプルヘリックス形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。さらなる詳細は、例えば、PCT公報、番号WO 97/33551、上掲を参照。

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

【0110】

L. 腫瘍治療のための組成物及び方法

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

例えば、アンチセンスRNA及びRNA分子は、標的mRNAにハイブリッド形成してタンパク質翻訳を防止することによりmRNAの翻訳を直接阻止する。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

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

転写阻害に用いられる三重螺旋形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介する三重螺旋形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。さらなる詳細は、例えば、PCT公報、番号WO 97/33551, 上掲を参照。

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

【0111】

M. 抗体

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

1. ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫化剤、及び所望するのであればアジュバントを、一又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫化剤又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫化剤は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫化剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に抱合させるのが有用である。このような免疫原タンパク質の例は、これらに限られないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びMPL-TDMアジュバント（モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコラート）が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

【0112】

2. モノクローナル抗体

あるいは、抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO77

3、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980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。

【0113】

免疫化剤は、典型的には断片を含むPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド、又はそのタンパク質又はその断片の融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球（「PBL」）が使用されるか、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化細胞系と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。不死化細胞系は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髓腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髓腫細胞系が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT又はHPRT) を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプチリン及びチミジンを含み（「HAT培地」）、この物質がHGPRT欠乏性細胞の増殖を阻止する。 30

好ましい不死化細胞系は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性のものである。より好ましい不死化細胞系はマウス骨髓腫系であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやヴァージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) より入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫細胞系も開示されている [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]。 40

【0114】

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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 50

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。

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを制限希釈工程によりサブクロニングし、標準的な方法で成長させることができる [Goding, 上掲]。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地及びRPMI-1640倍地が含まれる。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。 10

サブクロ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。

【0115】

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、これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成などしない骨髓腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより [U.S. Patent No. 4,816,567; 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の代わりに置換するか、本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインの代わりに置換し、キメラ性二価抗体を産生することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。 20 30

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られてる。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するようにFc領域の任意のポイントで切断される。あるいは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。一価抗体の調製にはインビトロ法がまた適している。抗体の消化による、その断片、特にFab断片の生成は、当該分野において知られている慣用的技術を使用して達成できる。 40

【0116】

3. ヒト及びヒト化抗体

抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980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 50

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

【0117】

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンター（winter）及び共同研究者〔Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536 (1988)〕の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体（米国特許第4,816,567号）である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリ〔Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1992); Marks等, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)〕を含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作成することもできる。また、Cole等及びBoerner等の技術も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる〔Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. 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は部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、及び次の科学文献：Marks等, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg等, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild等, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (

1996) ; Lonberg 及び Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995) に記載されている。

【0118】

4. 抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法 (ADEPT)

また、本発明の抗体は、プロドラッグ (例えばペプチジル化学療法剤、国際公開 81/01145 号を参照) を活性な抗癌剤に転化させるプロドラッグ活性化酵素に抗体を複合化させることにより、ADEPT において使用することができる。例えば国際公開 88/07378 及び米国特許第 4,975,278 号を参照されたい。

ADEPT に有用な免疫複合体の酵素成分には、より活性な細胞毒形態に転化するように、プロドラッグに作用し得る任意の酵素が含まれる。

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

この発明の酵素は、当該分野においてよく知られている技術、例えば上で検討したヘテロ二官能性架橋試薬を使用することにより、抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316 又は抗-PRO4980 抗体に共有的に結合させることができる。あるいは、本発明の抗体の少なくとも結合領域を本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部位に結合せしめてなる融合タンパク質を、当該技術においてよく知られている組換え DNA 技術を使用して作成することができる (Neuberger 等, Nature 312:604-608 [1984])。

【0119】

5. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも 2 つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本発明の場合において、結合特異性の一方は PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO577

5、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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

【0120】

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

20

国際公開WO 96/27011号に記載された他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体のパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖（例えばチロシン又はトリプトファン）と置換される。大きな側鎖と同じ又はより小さいサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの（アラニン又はスレオニン）と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモ二量体のような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

30

【0121】

二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片（例えば、F(ab')₂ 二重特異性抗体）として調製できる。抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, Science, 229: 81 (1985)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(ab')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたFab'断片はついでチオニトロベンゾアート（TNB）誘導体に転換される。Fab'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりFab'-チオールに再転換し、他のFab'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

40

大腸菌からFab'フラグメントを直接回収でき、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体F(ab')₂分子の製造を記述している。各Fab'フラグメントは大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特

50

異性抗体は、正常なヒトT細胞及びErbB2レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

【0122】

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

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

例示的二重特異性抗体は、ここで与えられるタンパク質上の2つの異なるエピトープに結合しうる。あるいは、抗-ポリペプチドアームは、T細胞レセプター分子(例えばCD2、CD3、CD28又はB7)等の白血球上のトリガー分子、又はFcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)及びFcγRIII(CD16)等のIgGのFcレセプター(FcγR)に結合するアームに結合し、細胞防御メカニズムを特定のタンパク質発現細胞に集中するようにしてもよい。二重特異性抗体は、特定のポリペプチドを発現する細胞に対する局所的細胞毒性薬として使用してもよい。これらの抗体は、ポリペプチド結合アーム及び細胞毒性薬又はキレート化剤、例えばEOTUBE、DPTA、DOTA、又はTETAに結合するアームを有する。他の対象とする二重特異性抗体は、ポリペプチドに結合し、さらに組織因子(TF)に結合する。

【0123】

6. ヘテロ抱合体抗体

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

【0124】

7. エフェクター機能の設計

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えばガンの治療における抗体の効能を増強することが望ましい。例えば、システイン残基をFc領域に導入して、この領域における鎖間ジスルフィド結合を形成させる。このようにして産生されたホモダイマー抗体は改善されたインターナリゼーション能力及び/又は増加した補体媒介細胞死滅及び抗体依存性細胞障害活性(ADCC)を有しうる。Caron等, J. Exp. Med. 1

10

20

30

40

50

76:1191-1195 (1992) 及び Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992) を参照されたい。抗腫瘍活性が高められたホモダイマー抗体は、Wolf 等, Cancer Research 53:2560-2565 (1993) に記載されているようなヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製することもできる。あるいは二重Fc領域を有し、よって増強された補体溶解及びADCC能を有しうる抗体を設計することができる。Stevensonら, Anticancer Drug Design 3:219-230 (1989) を参照。

【0125】

8. 免疫複合体

本発明はまた、化学治療薬、毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片）などの細胞毒性薬、あるいは放射性同位体（即ち、放射性抱合）に抱合された抗体を含む免疫複合体にも関する。 10

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬は上記した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、コレラ毒素、ボツリヌス毒素、（緑膿菌からの）外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン（modeccin）A鎖、アルファーサルシン、アレウリテス・フォーディ（Aleurites fordii）タンパク質、ジアンチン（dianthin）タンパク質、フィトラカ・アメリカナ（Phytolacca americana）タンパク質（PAPI、PAPII、及びPAP-S）、モモルディカ・チャランチア（momordica charantia）インヒビター、クルシン（curcin）、クロチン（c 20
rotin）、サパオナリア・オフィシナリス（sapaonaria officinalis）インヒビター、ゲロニン（gelonin）、ミトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン（restrictocin）、フェノマイシン（phenomycin）、エノマイシン（enomycin）及びトリコテセン（tricothecene）を含む。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複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート（SPDP）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（ジメチルアジピミデートHCL等）、活性エステル（ジスクシンイミジルスベレート等）、アルデヒド（グルタルアル 30
デヒド等）、ビス-アジド化合物（ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン等）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミン等）、ジイソシアネート（トリエン2, 6-ジイソシアネート等）、及びビス-活性フッ素化合物（1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン等）を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098 (1987) に記載されたように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸（MX-DTPA）は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。WO 94/11026 参照。

他の実施態様では、腫瘍の予備標的化で使用するために、抗体は「レセプター」（ストレプトアビジン等）に抱合されてもよく、抗体-レセプター複合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合複合体を循環から除去し、次に細胞毒性薬（例えば、放射性ヌクレオチド等）に抱合された「リガンド」（例えばアビジン）を投与する。 40

【0126】

9. 免疫リボソーム

また、ここに開示する抗体は、免疫リボソームとして調製してもよい。抗体を含むリボソームは、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 50

る。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、所定サイズのフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体のFab'断片は、Martin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(ドキソルビン等)は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizon等, J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989) 参照。

10

【0127】

N. 製薬組成物

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

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

抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が通常は好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、又は組換えDNA技術によって生成できる(例えば、Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 [1993])。

20

抗体の治療用製剤は、所望される程度の純度を持つ抗体を、親油性製剤又は水性溶液の形態で、任意の製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される(Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. [1980])。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンズエトニウムクロライド；フェノール；ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど)；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物EDTA等のキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体)又はトウイーン(TWEEN)(商品名)、プルロニクス(PLURONICS)(商品名)、及びポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。

30

40

【0128】

本発明のスクリーニングアッセイで同定された非-抗体化合物は、同様の方式で、この分野で知られた標準技術を用いて製剤される。

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

50

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＜B R（例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]に開示されている。

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

【0129】

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例は、ポリエステルヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）又はポリ（ビニルアルコール））、ポリアクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸及びγ-エチル-L-グルタメート、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT（商品名）（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リ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、凝集機構がチオージスルフィド交換を通した分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

【0130】

O. 治療方法

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

本発明の抗腫瘍剤、例えば抗体は、哺乳動物、好ましくはヒトに、周知の方法、例えば、ボ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。

【0131】

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

10

20

30

40

50

療薬は、本発明の抗腫瘍剤、例えば抗体の投与に先立って、又は続いて投与してもよく、あるいはそれらと同時に投与してもよい。本発明の抗体は、タモキシフェン等の抗エストロゲン化合物又はオナプリストンなどの抗プロゲステロン（EP 616812 参照）の、それらの分子について知られた用量と組み合わせてもよい。

また、腫瘍関連抗原に対する抗体、例えば ErbB2、EGFR、ErbB3、ErbB4、又は血管内皮因子（VEGF）に結合する抗体を投与することも好ましい。ときどきは、患者にサイトカインを投与することも有利である。好ましい実施態様では、この抗癌剤は、成長阻害剤と同時に投与される。例えば、まず成長阻害剤を投与し、続いて本発明の抗癌剤を投与する。しかしながら、同時投与、又は本発明の抗癌剤を最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は現在用いられている量であるが、成長阻害剤とこの抗体との組み合わせ（相乗）効果により減少させ得る。 10

【0132】

疾患の防止又は治療のための、ここでの抗腫瘍剤の適切な用量は、上記で定義したような治療される疾患の型、疾患の重篤さ及び経過、防止又は治療目的で薬剤が投与されるか否か、従前の治療、患者の臨床履歴及び薬剤に対する反応、及び主治医の裁量に依存する。薬剤は、適切には患者に一回又は一連の治療に渡って適切に投与される。

例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $15 \text{mg}/\text{kg}$ （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日の用量は、上記の要因に応じて、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $100 \text{mg}/\text{kg}$ 又はそれ以上であろう。 20
数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。この治療の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易に監視される。

【0133】

P. 製造品

本発明の他の実施態様では、上記の疾患の診断又は治療に有用な物質を含む製造品が提供される。この製造品は容器とラベルとを含んでなる。好適な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、及び試験管を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの材料から形成されてよい。容器は、状態を診断し治療するのに有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の活性剤は通常、ここで同定される遺伝子産物の活性を妨害することのできる抗腫瘍剤、例えば抗体である。容器上又は添付されるラベルは、組成物が選択した状態の診断又は治療のために使用されることを示す。製造品はさらに、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロース溶液などの製薬的に許容されるバッファーを含む第2の容器を具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用上の指示を付けたパッケージ挿入物を含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。 30

【0134】

Q. 腫瘍の診断及び予知

或る種の腫瘍で過剰発現される成長レセプター等の細胞表面タンパク質は候補薬剤又は腫瘍（例えば、癌）治療の優れた標的であるが、同じタンパク質は腫瘍細胞で増幅された遺伝子にコードされる分泌タンパク質とともに腫瘍の診断及び予知に用途が見出される。例えば、腫瘍細胞で増幅された遺伝子のタンパク質産物に対する抗体は腫瘍診断又は予知として使用できる。 40

例えば、抗体断片を含む抗体は、増幅された遺伝子にコードされるタンパク質（「マーカ-遺伝子産物」）の発現の定性的又は定量的検出に用いることができる。抗体は、好ましくは検出可能な、例えば蛍光標識を備え、結合は光学顕微鏡、フローサイトメトリー、フルオロメトリー、又はこの分野で知られた他の技術によって監視できる。これらの技術は、増幅された遺伝子が細胞表面タンパク質、例えば成長因子をコードする場合に特に好ましい。このような結合アッセイは、上記5節に実質的に記載されたように実施される。 50

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

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

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

【0135】

10

(実施例)

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

20

特に記さない限り、本発明は上記及び以下の教科書に記載されたもののような組換えDNA技術の標準的な手法を用いた：Sambrook等，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press N. Y., 1989; 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; R. I. Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan等，Current Protocols in Immunology, 1991。

30

【0136】

40

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、Dayhoff、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）

50

）を用いて、E C Dタンパク質配列のE S T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、B L A S T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「p h r a p」（P h i l G r e e n, U n i v e r s i t y o f W a s h i n g t o n, S e a t t l e, W A）で集団化してコンセンサスD N A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、p h r a pを用いて他の同定された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。さらに、得られたコンセンサスD N A配列を、しばしば（常にではない）B L A S T又はB L A S T-2及びp h r a p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E S T配列の供給源を用いて可能な限り伸長させた。

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、P C Rにより対象とする配列を含むc D N Aライブラリを同定するため、及びP R O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産物を与えるために設計される。プローブ配列は、典型的に40-55bp長である。幾つかの場合には、コンセンサス配列が約1-1.5kbpより大きいときに付加的なオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのD N Aを、A u s u b e l等, C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y, のように、P C Rプライマー対でのP C Rによりスクリーニングした。

ポジティブライブラリを、次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて対象とする遺伝子をコードするクローンの単離するのに使用した。c D N Aクローンの単離に用いたc D N Aライブラリは、I n v i t r o g e n, S a n D i e g o, C A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。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、平滑末端でS a l Iヘミキナーゼアダプターに結合させ、N o t Iで切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター（p R K B又はp R K D等；p R K 5 BはS f i I部位を含まないp R K 5 Dの前駆体である；H o l m e s等, S c i e n c e, 253: 1278-1280（1991）参照）に、独特のX h o I及びN o t I部位において、所定の方向でクローニングした。

【0137】

実施例2

シグナルアルゴリズム分析を用いたc D N A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（S o u t h S a n F r a n c i s c o, C A）によって開発された独自の配列発見アルゴリズムを、公的（例えば、G e n B a n k）及び／又は私的（L I F E S E Q（登録商標）、I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s, I n c., P a l o A l t o, C A）データベースからのE S T s並びに集団化及び構築されたE S T断片に適用することにより同定した。シグナル配列アルゴリズムは、考慮している配列又は配列断片の5'-末端の第1の、場合によっては第2のメチオニンコドン（A T G）を取り囲むD N Aヌクレオチドの文字に基づく分泌シグナルスコアを計算する。第1のA T Gに続くヌクレオチドは、停止コドンを持たない少なくとも35の不明瞭でないアミノ酸をコードしなければならない。第1のA T Gが必要なアミノ酸を有する場合、第2のものは試験しない。何れも要件を満たさない場合、候補配列にスコアをつけなかった。E S T配列が真正のシグナル配列を含むか否かを決定するために、A T Gコドンを取り囲むD N A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。

【0138】

ヒトP R O 197をコードするc D N Aクローンの単離

PRO197は、コンピュータプログラムBLAST (Altschul等, 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。PRO197は、公知のEST配列T08223、AA122061、及びM62290と相同性を持つことが示された。全長として同定された、あるいはTIEレセプターに関連するリガンドとして記載された公知のESTは無い。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から製造者の指示に従って調製したヒト胎児肺ライブラリからPRO197をクローニングした。ライブラリを、合成オリゴヌクレオチドプローブでのハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。

10

GenBank データベースに見られるESTに基づいて、以下のようにオリゴヌクレオチド配列を使用した：

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

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

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

【0139】

cDNAクローンは、全体を同定して配列決定した。DNA22780-1078の全長ヌクレオチド配列をFig1 (配列番号：1) に示す。クローンDNA22780-1078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23-25に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置1382-1384に停止コドンを持つ (Fig1; 配列番号：1)。予測されるポリペプチド前駆体は453アミノ酸長である。全長PRO197タンパク質をFig2 (配列番号：2) に示す。

20

Fig2 (配列番号：2) に示した全長PRO197配列の解析により、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よそのものである。Fig2に示した全長PRO197配列の解析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸51～約アミノ酸70の膜貫通ドメイン；約アミノ酸224～約アミノ酸228のN-グリコシル化部位；約アミノ酸46～約アミノ酸50及び約アミノ酸118～約アミノ酸122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50～約アミノ酸56、約アミノ酸129～約アミノ酸135、約アミノ酸341～約アミノ酸347、及び約アミノ酸357～約アミノ酸363のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸396～約アミノ酸409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。

30

DNA22780-1078は、1997年9月18日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209284が付与された。寄託されたクローンは、ここに提供されるものよりむしろ実際の正しい配列を有すると理解される。

Fig2 (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) の解析により、PRO197アミノ酸配列とTIEレセプターに関連するリガンドとの間の相同性が明らかになった。略語「TIE」は、「Ig及びEGF相同ドメインを含むチロシンキナーゼ」を意味する頭文字であり、レセプターチロシンキナーゼの新たなファミリーを表すために作られたものである。

40

【0140】

実施例4

ヒトPRO207をコードするcDNAの単離

発現配列タグ (EST) DNAデータベース (LIFESeq (商品名)、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) を検索し、Apo-2リガンドと相同性を持つESTを同定した。そして、ヒト胎児腎臓cDNAライブラリーのスクリーニングがおこなわれた。ヒト胎児腎臓組織 (Clontech) から単離され

50

た mRNA が cDNA ライブラリーの調製のために使用された。この RNA は、Life Technologies, Gaithersburg, MD (Super Script Plasmid System) からの試薬及びプロトコルを用いるベクター pRK5D におけるオリゴ dT プライムした cDNA のライブラリーの作製に使用した。この方法において、二本鎖 cDNA は 1000 bp を越えるサイズに分類され、SalI / NotI 結合 cDNA を XhoI / NotI 切断ベクターにクローニングした。pRK5D は、sp6 転写開始部位、それに続く SfiI 制限酵素部位、さらに XhoI / NotI cDNA クローニング部位を持つクローニングベクターである。ライブラリーは EST に基づいて下記の合成オリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションによってスクリーニングされた：

10

5' - CCAGCCCTCTGCGCTACAAACCGCCAGATCGGGGAGTT
TATAGTCAACCCGG - 3' (配列番号：74)

cDNA クローンの全体が配列決定された。DNA 30879-1152 全長クローンは、Fig 3 (配列番号：3) に示されている。クローン DNA 30879-1152 は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 58-60 (Fig 3; 配列番号：3) 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 805-807 に見かけの停止シグナルを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は 249 アミノ酸長である。

Fig 4 (配列番号：4) に示された全長 PRO207 配列の分析により様々な重要なポリペプチドドメインの存在が明らかにされたが、それらの重要なポリペプチドドメインに対して与えられる位置は上記のように概略である。全長 PRO207 配列 (Fig 4; 配列番号：4) の分析により次のことが明らかにされた：約アミノ酸 1~約アミノ酸 40 のシグナルペプチド、約アミノ酸 139~約アミノ酸 143 の N-グリコシル化部位、約アミノ酸 27~約アミノ酸 33、約アミノ酸 29~約アミノ酸 35、約アミノ酸 36~約アミノ酸 42、約アミノ酸 45~約アミノ酸 51、約アミノ酸 118~約アミノ酸 124、約アミノ酸 121~約アミノ酸 127、約アミノ酸 125~約アミノ酸 131、約アミノ酸 128~約アミノ酸 134 の N-ミリスチル化部位、約アミノ酸 10~約アミノ酸 14、約アミノ酸 97~約アミノ酸 101 のアミド化部位、約アミノ酸 24~約アミノ酸 35 の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位。クローン DNA 30879-1152 は 1997 年 10 月 10 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 209358 が付与された。

20

30

Fig 4 (配列番号：4) に示した PRO207 の全長配列の (ALIGN-2 コンピュータプログラムを用いた) BLAST 及び FastA 配列アラインメント分析に基づく、PRO207 は TNF サイトカインファミリーの幾つかのメンバーとアミノ酸配列同一性を示し、特にヒトリンホトキシン-β (23.4%) 及びヒト CD40-リガンド (19.8%) を示す。

【0141】

実施例 5

ヒト PRO226 をコードする cDNA クローンの単離

実施例 1 に記載したように、phrap を用いて他の EST 配列に対してコンセンサス DNA 配列を構築した。EGF 様相同体をコードするこの構築されたコンセンサス配列を、ここで DNA 28744 と命名する。DNA 28744 コンセンサス配列に基づいて、1) PCR により対象とする配列を含む cDNA ライブラリーを同定するため、及び 2) PRO226 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。

40

PCR プライマー (正方向及び逆方向) を合成した：

正方向 PCR プライマー (28744, f) (OLI556)：

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

逆方向 PCR プライマー (28744, r) (OLI557)：

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

50

さらに、DNA 28744 コンセンサス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 (28744. p) (OLI556)：

5' - CCTGGCTATCAGCAGGTGGGCTCCAAAGTGTC TC GATG
TGGATGAGTGTGA - 3' (配列番号：77)

【0142】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でPCR増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、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PRO226遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリの構築のためのRNAはヒト胎児肺組織から単離した。 10

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、DNA 33460-1166 [Fig 5、配列番号：5] の全長DNA配列；及びPRO226の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA 33460-1166の全コード化配列がFig 5 (配列番号：5) に含まれる。クローンDNA 33460-1166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62-64に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置1391-1393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443アミノ酸長である。Fig 6 (配列番号：6) に示した全長PRO344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よそのものである。Fig 6に示した全長PRO344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1～約アミノ酸25のシグナルペプチド；約アミノ酸198～アミノ酸202、約アミノ酸394～約アミノ酸398のN-グリコシル化部位；約アミノ酸76～約アミノ酸82、約アミノ酸145～約アミノ酸151、約アミノ酸182～約アミノ酸188、約アミノ酸222～約アミノ酸228、約アミノ酸290～約アミノ酸296、約アミノ酸305～約アミノ酸311、約アミノ酸371～約アミノ酸377、約アミノ酸381～約アミノ酸387のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸140～約アミノ酸152、約アミノ酸177～約アミノ酸189、約アミノ酸217～約アミノ酸229及び約アミノ酸258～約アミノ酸270のアスパラギン酸及びアスパラギンヒドロキシル化部位。クローンDNA 33460-1166は1997年10月16日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209376が付与された。 20 30

Fig 6 (配列番号：6) に示したPRO226の全長配列のBLAST及びFastA配列アラインメント分析に基づく、EGF様相同体DNA 33460-1166はHTタンパク質及び／又はフィブリンとアミノ酸配列同一性を示す (各々、49%及び38%)。

【0143】

実施例 6

ヒトPRO232をコードするcDNAクローンの単離

実施例1に記載したように、phrapを用いて他のEST配列に対してコンセンサスDNA配列を構築した。この構築されたコンセンサス配列を、ここでDNA 30935と命名し、ポリペプチドは1又は複数の幹細胞抗原と類似性を示した。DNA 30935コンセンサス配列に基づいて、1) PCRにより対象とする配列を含むcDNAライブラリを同定するため、及び2) PRO232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。 40

PCRプライマー (正方向及び逆方向) を合成した：

正方向PCRプライマー：

5' - TGC TGT GCT ACT C C T G C A A A G C C C - 3' (配列番号：78)

逆方向PCRプライマー：

5' - T G C A C A A G T C G G T G T C A C A G C A C G - 3' (配列番号：79) 50

さらに、DNA 30935 コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリッド形成プローブ：

5' - A G C A A C G A G G A C T G C C T G C A G G T G G A G A A C T G C A C C C A G C T G G G - 3' (配列番号：80)

【0144】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でPCR増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、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PRO232遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリの構築のためのRNAはヒト胎児腎臓組織から単離した。 10

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、DNA 34435-1140 [Fig 7、配列番号：7] の全長DNA配列；及びPRO232の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA 34435-1140の全コード化配列がFig 7 (配列番号：7) に含まれる。クローンDNA 34435-1140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359-361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119アミノ酸長である。Fig 8 (配列番号：8) に示した全長PRO344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よそのものである。Fig 8に示した全長PRO344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1～約アミノ酸16のシグナルペプチド；約アミノ酸36～アミノ酸40、約アミノ酸79～約アミノ酸83約、及びアミノ酸89～約アミノ酸93のN-グリコシル化部位；約アミノ酸61～約アミノ酸67のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸75～約アミノ酸79のアミド化部位。クローンDNA 34435-1140は1997年9月16日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209250が付与された。 20

Fig 8 (配列番号：8) に示したPRO232の全長配列の分析は、それがGallus gallusからの幹細胞表面抗原と35%配列同一性を持つことを示唆した。

【0145】

実施例7 30

ゲノム歩行によるヒトPRO243をコードするcDNAクローンの単離

序：

ヒトトロポポエチン (THPO) は、2つのドメインからなる352アミノ酸のグリコシル化ホルモンである。N末端ドメインはエリスロポエチンと50%類似性を持ち、生物学的活性を担っている。C末端領域は分泌に必要とされる。トロポポエチン (THPO) についての遺伝子はヒト染色体3q27-q28にマップされ、そこでこの遺伝子の6つのエクソンがゲノムDNAの7キロベース塩基対の橋を架けている (Gurney等, Blood 85: 981-988 (1995))。THPOの直近に位置するTHPO相同体をコードする遺伝子が存在するか否かを決定するため、この領域からのゲノムDNA断片を同定して配列決定した。THPO遺伝子座を包含する3つのP1クローン及び1つのPACクローン (Genome Systems Inc., St. Louis, MO; カタログ番号P1-2535及びPAC-6539) が単離され、140 kb領域をPCRベースのギャップ充填法と組み合わせた規則的ショットガン法 (Chen等, Genomics 17: 651-656 (1993)) を用いて配列決定した。分析により該領域がTHPOに極めて近く位置する4つの更なる遺伝子：腫瘍壊死因子レセプター1型関連タンパク質2 (TRAP2) 及び伸長開始因子ガンマ (elF4g)、塩化物物チャンネル2 (CLCN2) 及びRNAポリメラーゼIIサブユニットhRPB17を伴って遺伝子リッチであることが明らかとなった。該領域にはTHPO相同体は見出されなかったが、4つの新規な遺伝子がコンピュータ補助遺伝子検出 (GRAIL) により予測された (Xu等, Gen. Engin. 16: 241-253 (1994)), C 50

pG島の存在 (Cross, S. 及び Bird, A., Curr. Opin. Genet. & Devel. 5: 109-314 (1995), 及び公知の遺伝子との相同性 (WU-BLAST2.0により検出) (Altschul 及び Gish, Methods Enzymol. 266: 460-480 (1996))

【0146】

手法:

P1 及び PAC クローン:

最初のヒト P1 クローンはゲノム P1 ライブラリ (Genome Systems Inc., St. Louis, MO; カタログ番号 P1-2535) から、THPO ゲノム配列から設計された PCR プライマーでスクリーニングされて単離された。PCR プライマーは、この P1 クローンから誘導された末端配列から設計され、次いで P1 及び PAC ライブラリ (Genome Systems カタログ番号 P1-2535 及び PAC-6539) のスクリーニングに用い、重複クローンを同定した。 10

規則的ショットガン法:

規則的ショットガン法 (OSS) (Chen 等, Genomics 17: 651-656 (1993)) は、階層的方法での大きなゲノム DNA クローンのマッピングと配列化を含む。P1 又は PAC クローンを超音波処理し、断片をラムダベクター (λ Blue star) (Novagen, Inc., Madison, WI; カタログ番号 69242-3) にサブクローニングした。ラムダサブクローン挿入物は長範囲 PCR (Barnes, W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2216-2220 (1994)) により単離し、末端を配列決定した。ラムダ末端配列を重複させ、最初のクローンの部分的マップを作成した。重複末端配列を持つこれらのラムダクローンを同定し、インセットをプラスミドベクター (pUC9 又は pUC18) にサブクローニングし、プラスミドサブクローンの末端を配列決定し、組み立てて近接配列を生成した。この方向性を持った配列決定法は、必要な無駄を最小にし、対象とする領域をスキャンし集中するのを可能にする。 20

THPO 遺伝子座をよりよく同定し、ヘマトポエチンファミリーに関連する他の遺伝子を検索するために、4つのゲノムクローンを、ヒト P1 及び PAC ライブラリの PCR スクリーニングによりこの領域から単離した (Genome System, Inc., カタログ番号: P1-2535 及び PAC-6539)。遺伝子断片のサイズは次の通り 30
である: P1.t は 40 kb; P1.g は 70 kb; P1.u は 70 kb; 及び PAC.z は 200 kb である。200 kb ゲノム DNA 領域の約 80% を、規則的ショットガン法 (OSS) (Chen 等, Genomics 17: 651-656 (1993)) を用いて配列決定し、AutoAssembler (商品名) (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Foster City, CA, カタログ番号 903227) を用いてコンティグに構築した。これらのコンティグの予備的順序を手動分析で決定した。46 のコンティグが存在し、ギャップへの充填を用いた。表 4 はギャップの数とサイズをまとめている。

【0147】

表 4

140kb領域のギャップのまとめ

<u>ギャップのサイズ</u>	<u>数</u>
<50 bp	13
50-150 bp	7
150-300 bp	7
300-1000 bp	10
1000-5000 bp	7
> 5000 bp	2 (約 15,000bp)

10

【0148】

DNA配列決定：

ABI DYE-プライマー（商品名）化学（PE Applied Biosystems, Foster City, CA；カタログ番号：402112）を、ラムダ及びプラスミドサブクロンの末端配列決定に用いた。ABI DYE-ターミネーター（商品名）（PE Applied Biosystems, Foster City, CA；カタログ番号：403044）を、PCR産物のその各PCRプライマーでの配列決定に用いた。配列は、ABI 377装置で収集した。1 kbより大きなPCR産物について、歩行プライマーを用いた。AutoAssembler（商品名）（PE Applied Biosystems, Foster City, CA；カタログ番号：903227）でのOSS法により生成されたコンティグの配列及びギャップ充填配列決定トレースファイルを、重複及び編集のためにSequencher（商品名）（Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI）にインポートした。

PCR-ベースギャップ充填法：

各コンティグの配列決定された5'及び3'末端に基づいてプライマーを設計し、反復及び低品質配列領域を避けた。全てのプライマーを50-70%のG/C量を持つ19-24量体であるように設計した。オリゴを合成し、標準的な方法によりゲル精製した。コンティグの配向と順序は未知であったので、プライマーの順列を増幅反応において使用した。二つのPCRキットを使用した：第1に、およそ10分の伸展時間でのXL PCRキット（Perkin Elmer, Norwalk, CT；カタログ番号：N8080205）；第2に、XL PCRキットで汚れた又は複数の生成物が観察された場合にはTaqポリメラーゼPCRキット（Qiagen Inc., Valencia, CA；カタログ番号：201223）を高緊縮性条件下で使用した。それぞれの成功した反応からの主要なPCR産物は0.9%の低溶融アガロースゲルから抽出し配列決定前にGeneclean DNA Purificationキットで精製した。

【0149】

分析：

コード領域の同定及び特徴付けは以下のように実施した：第1に、反復配列をRepeatMasker（A. F. A. Smit & P. Green, http://ftp.genome.washington.edu/RM/RM_details.html）でマスクし、それを反復成分のライブラリに対してFastA方式でDNA配列スクリーニングし、マスクしたクエリー配列に戻した。マスクされていないリピートは、配列をGenBankデータベースとWUBLAST（Altschul, S. 及びGish, W., Methods Enzymol. 266: 460-480 (1996)）を用いて比較することにより同定し、手動でマスクした。

次に、ジェネンテクのタンパク質データベースに対してゲノム領域をWUBLAST2.0アルゴリズムを用いて比較することにより既知の遺伝子を明らかにし、各遺伝子についてゲノム及びcDNA配列を各々、さもないと大きく異なる配列間の局所的同一性の領域

50

【 0 1 5 0 】

分析された140kb領域に位置している既知の遺伝子のまとめ

<u>既知の遺伝子</u>	<u>マップ位置</u>
真核生物翻訳開始因子4ガンマ	3q27-qter
トロンボポエチン	3q26-q27
塩化物チャネル2	3q26-qter
TNF レセプター関連タンパク質2	過去にマップされていない
RNA ポリメラーゼ II サブユニットhRBP17	過去にマップされていない

10

最後に、新規な転写単位を多数の方法を用いて予測した。CpG島 (S. Cross 及び Bird, A., Curr. Opin. Gene. Dev. 5: 109-314 (1995)) 島をプロモーター領域を定めるために使用し、GC-リッチ、6-又は8-量体回文構造配列を認識する酵素によって切断された部位のクラスターとして同定した。CpG島には通常、遺伝子のプロモーター領域が付随している。短いゲノム領域 (10-20 kb) の GenBank に対する WUBLAST 2.0 分析は、EST に一致する。個々の EST 配列 (あるいは可能な場合は、それらの配列クロマトグラムファイル) を検索し、Sequencher で構築して理論的 cDNA 配列を与えた (ここで DNA34415 と命名)。新規のエクソンを予測するために GRAIL 2 (Apocoinc., Knoxville, TN, DECα のためのコマンドラインバージョン) を用いた。該領域の5つの既知の遺伝子は、GLAIL アルゴリズムの成功のための内部参照となった。

20

30

単離：
 コルディン（C h o r d i n）c D N A クローンを、オリゴ-d T-プライムヒト胎児肺ライブラリから単離した。ヒト胎児肺ポリA（商品名）R N A は C l o n t e c h（カタログ# 6 5 2 8-1，ロット# 4 3 7 7 7）から購入し、5 m g を使用して p L R 5 B（ジェネンテク，L I B 2 6）で c D N A ライブラリを作成した。3'-プライマー：

及び 5' リンカー :

p C G G A C G C G T G G G G C C T G C G C A C C C A G C T (配列番号: 82)

を設計して S a l I 及び N o t I 制限部位を導入した。クローンは、遺伝子の提案されたゲノムエキソンを併せて手動で「スプライシング」することにより推論した推定ヒトコルディン c D N A 配列 (D N A 3 4 4 1 5) から設計したオリゴヌクレオチドでスクリーニングした。プローブに隣接する P C R プライマーを用いて配列決定の前に c D N A クローンの同一性を確認した。

スクリーニングオリゴヌクレオチドプローブは次のものであり：

O L I 5 6 4 0 3 4 4 1 5 . p 1 :

5' - G C C G C T C C C C G A A C G G G C A G C G G C T C C T T C T C A G A A -
3' (配列番号: 83)

O L I 5 6 4 2 3 4 4 1 5 . p 2 :

40

50

5' - G G C G C A C A G C A C G C A G C G C A T C A C C C C G A A T G G C T C -
3' (配列番号: 84):

使用されたフランキングプローブは次のものであった:

O L I 5 6 3 9 3 4 4 1 5. f 1:

5' - G T G C T G C C C A T C C G T T C T G A G A A G G A - 3' (配列番号: 85)

O L I 5 6 4 3 3 4 4 1 5. r:

5' - G C A G G G T G C T C A A A C A G G A C A C - 3' (配列番号: 86) であ
った。

【0153】

DNA 35917-1207の全コード化配列がFig 9 (配列番号: 9) に含まれる。
クローンDNA 35917-1207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137-139に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置299
9-3001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954アミ
ノ酸長である。Fig 10 (配列番号: 10) に示された全長PRO243配列の分析に
より様々な重要なポリペプチドドメインの存在が明らかにされたが、それらの重要なポリ
ペプチドドメインに対して与えられる位置は上記のように概略である。Fig 10に示し
た全長PRO243配列の分析により次のことが明らかにされた: 約アミノ酸1~約アミ
ノ酸23のシグナルペプチド; 約アミノ酸217~約アミノ酸221、約アミノ酸351
~約アミノ酸355、約アミノ酸365~約アミノ酸369、及び約アミノ酸434~約
アミノ酸438のN-グリコシル化部位; 約アミノ酸145~約アミノ酸153及び約ア
ミノ酸778~約アミノ酸786のチロシンキナーゼリン酸化部位; 約アミノ酸20~約
アミノ酸26、約アミノ酸47~約アミノ酸53、約アミノ酸50~約アミノ酸56、約
アミノ酸69~約アミノ酸75、約アミノ酸73~約アミノ酸79、約アミノ酸232~
約アミノ酸238、約アミノ酸236~約アミノ酸242、約アミノ酸390~約アミノ
酸396、約アミノ酸422~約アミノ酸428、約アミノ酸479~約アミノ酸477
、約アミノ酸483~約アミノ酸489、約アミノ酸489~約アミノ酸495、約アミ
ノ酸573~約アミノ酸579、約アミノ酸576~約アミノ酸582、約アミノ酸58
0~約アミノ酸586、約アミノ酸635~約アミノ酸641、約アミノ酸670~約ア
ミノ酸676、約アミノ酸773~約アミノ酸779、約アミノ酸807~約アミノ酸8
13、約アミノ酸871~約アミノ酸877、及び約アミノ酸905~約アミノ酸911
のN-ミリスチル化部位; 約アミノ酸87~約アミノ酸91のアミド化部位; 約アミ
ノ酸165~約アミノ酸168の細胞接着配列; 約アミノ酸315~約アミノ酸337のロ
イシンジッパーパターン。クローンDNA 35917-1207は1997年9月3日に
ATCCに寄託され、ATCC寄託番号209508が付与された。Fig 10に示すP
RO243の全長タンパク質は、約101, 960の見積もり分子量及び約8.21のp
Iを持つ。

【0154】

実施例 8

ヒトPRO256をコードするcDNAクローンの単離

実施例1に記載したように、phrapを用いて他のEST配列に対してコンセンサスD
NA配列を構築した。この構築されたコンセンサス配列を、ここでDNA28725と命
名する。DNA28725コンセンサス配列に基づいて、1) PCRにより対象とする配
列を含むcDNAライブラリを同定するため、及び2) PRO256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。
PCRプライマー(正方向及び逆方向)の対を合成した:

正方向PCRプライマー:

5' - T G T C C A C C A A G C A G A C A G A A G - 3' (配列番号: 87)

逆方向PCRプライマー:

5' - A C T G G A T G G C G C C T T T C C A T G - 3' (配列番号: 88)

10

20

30

40

50

さらに、DNA 28725 コンセンサス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' - CTGACAGTGACTAGCTCAGACCCAGAGGACACGG
CCAAACGTCAACAGT - 3' (配列番号：89)

5' - GGGCTCTTTCCCAACGCTGGTACTATGACCCCAACGGAG
CAGATCTG - 3' (配列番号：90)

【0155】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でPCR増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、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PRO256遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

cDNAライブラリの構築のためのRNAはヒト胎盤組織から単離した。cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、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 (pRKB又はpRKD等；pRK5BはSfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である；Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991) 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。

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、DNA 35880-1160 [Fig 11、配列番号：11] の全長DNA配列；及びPRO256の誘導タンパク質配列が得られた。

【0156】

DNA 35880-1160の全コード化配列がFig 11 (配列番号：11) に示される。クローンDNA 35880-1160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188-190に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置1775-1777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529アミノ酸長である (Fig 12)。Fig 12 (配列番号：12) に示した全長PRO344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よそのものである。Fig 12に示した全長PRO344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1～約アミノ酸35のシグナルペプチド；約アミノ酸466～アミノ酸483の膜貫通ドメイン；約アミノ酸66～約アミノ酸70、約アミノ酸235～約アミノ酸239、及び約アミノ酸523～約アミノ酸527のN-グリコシル化部位；約アミノ酸29～約アミノ酸35、約アミノ酸43～約アミノ酸49、約アミノ酸161～約アミノ酸167、約アミノ酸212～約アミノ酸218、約アミノ酸281～約アミノ酸287、約アミノ酸282～約アミノ酸288、約アミノ酸285～約アミノ酸291、約アミノ酸310～約アミノ酸316、約アミノ酸313～約アミノ酸319、約アミノ酸422～約アミノ酸428、約アミノ酸423～約アミノ酸429、及び約アミノ酸426～約アミノ酸432のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸193～約アミノ酸199の細胞接着配列；及び約アミノ酸278～約アミノ酸298及び約アミノ酸419～約アミノ酸438の腓臓トリプシンインヒビター (Kunitz) ファミリーシグネチャー。クローンDNA 35880-1160は1997年10月16日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209379が付与された。

PRO256の全長配列の分析により、その一部がヒトビクニン (bikunin) タンパク質と有意な相同性を持つことが示唆され、それよりPRO256が新規なプロテイナーゼインヒビターであることが示された。

【0157】

実施例 9

ヒト P R O 2 6 9 をコードする c D N A クローンの単離

実施例 1 に記載したように、p h r a p を用いて他の 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。E G F 様相同体をコードするこの構築されたコンセンサス配列を、ここで D N A 3 5 7 0 5 と命名する。D N A 3 5 7 0 5 コンセンサス配列に基づいて、1) P C R により対象とする配列を含む c D N A ライブラリを同定するため、及び 2) P R O 2 6 9 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 (3 つの正方向及び 2 つの逆方向) を合成した：

正方向 P C R プライマー 1：

5' - T G G A A G G A G A T G C G A T G C C A C C T G - 3' (配列番号：91)

正方向 P C R プライマー 2：

5' - T G A C C A G T G G G G A A G G A C A G - 3' (配列番号：92)

正方向 P C R プライマー 3：

5' - A C A G A G C A G A G G G T G C C T T G - 3' (配列番号：93)

逆方向 P C R プライマー 1：

5' - T C A G G G A C A A G T G G T G T C T C T C C C - 3' (配列番号：94)

逆方向 P C R プライマー 2：

5' - T C A G G G A A G G A G T G T G C A G T T C T G - 3' (配列番号：95)

さらに、D N A 3 5 7 0 5 コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリッド形成プローブ：

5' - A C A G C T C C C G A T C T C A G T T A C T T G C A T C G C G G A C G A A A T C G G C G C T C G C T - 3' (配列番号：96)

【0158】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからの 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 2 6 9 遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。c D N A ライブラリの構築のための R N A はヒト胎児腎臓組織から単離した。

上記のように単離したクローンの D N A 配列決定により、D N A 3 8 2 6 0 - 1 1 8 0 [F i g 1 3、配列番号：13] の全長 D N A 配列；及び P R O 2 6 9 の誘導タンパク質配列が得られた。

D N A 3 8 2 6 0 - 1 1 8 0 の全コード化配列が F i g 1 3 (配列番号：13) に含まれる。クローン D N A 3 8 2 6 0 - 1 1 8 0 は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 3 1 4 - 3 1 6 に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置 1 7 8 4 - 1 7 8 6 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 4 9 0 アミノ酸長であり、約 5 1, 6 3 6 ダルトンの分子量及び約 9. 2 9 の見積もり p I を有する。F i g 1 4 (配列番号：14) に示した全長 P R O 3 4 4 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よそのものである。F i g 1 4 に示した全長 P R O 3 4 4 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 1 ~ 約アミノ酸 1 6 のシグナルペプチド；約アミノ酸 3 9 7 ~ アミノ酸 4 1 8 の膜貫通ドメイン；約アミノ酸 1 8 9 ~ 約アミノ酸 1 9 3 及び約アミノ酸 3 8 1 ~ 約アミノ酸 3 8 5 の N - グリコシル化部位；約アミノ酸 2 8 9 ~ 約アミノ酸 2 9 3 のグリコサミノグリカン結合部位；約アミノ酸 9 8 ~ 約アミノ酸 1 0 2 及び約アミノ酸 4 3 4 ~ 約アミノ酸 4 3 8 の c A M P - 及び c G M P - 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸 3 0 ~ 約アミノ酸 3 6、約アミノ酸 3 5 ~ 約アミノ酸 4 1、約アミノ酸 5 8 ~ 約アミノ酸 6 4、約アミノ酸 5 9 ~ 約アミノ酸 6 5、約アミノ酸 1 2 1 ~ 約アミノ酸 1 2 7、約アミノ酸 1 5 1 ~ 約アミノ酸 1 5 7、約アミノ酸 1 8 5 ~ 約アミノ酸 1 9 1、約アミノ酸 2 0 9 ~ 約アミノ酸 2

10

20

30

40

50

15、約アミノ酸267～約アミノ酸273、約アミノ酸350～約アミノ酸356、約アミノ酸374～約アミノ酸380、約アミノ酸453～約アミノ酸459、約アミノ酸463～約アミノ酸469、約アミノ酸477～約アミノ酸483のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸262～約アミノ酸274のアスパラギン酸アスパラギンヒドロキシル化部位。クローンDNA38260-1180は1997年10月17日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209397が付与された。

Fig 14（配列番号：14）に示したPRO269の全長配列の分析により、その一部がヒトトロポモジュリタンパク質と有意な相同性を有することが示唆され、よってPRO269は1又は複数のトロポモジュリン様ドメインをもつことが示された。

【0159】

実施例10

ヒトPRO274をコードするcDNAクローンの単離

実施例1に記載したように、phrapを用いて他のEST配列に対してコンセンサスDNA配列を構築した。この構築されたコンセンサス配列を、ここでDNA36469と命名する。次いでコンセンサスDNA配列を、BLAST及びphrapの繰り返しサイクルを用いて、上記のESTの供給源を用いてできる限り延長した。延長したアセンブリコンセンサス配列を、ここで（consen01）と命名する。また、ジェネンテックが独自に開発したESTを第2のコンセンサス構築に用い、DNA17873、DNA36157及びDNA28929と命名する。構築したDNA36469及び（consen01）コンセンサス配列に基づいて、1）PCRにより対象とする配列を含むcDNAライブラリを同定するため、及び2）PRO274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。

PCRプライマー（正方向及び逆方向）を合成した：

正方向PCRプライマー（36469．f1）：

5' - CTGATCCGGTTCCTTGCTGCCCTG - 3'（配列番号：97）

正方向PCRプライマー（36469．f2）：

5' - GCTCTGTCACTCACGCTC - 3'（配列番号：98）

正方向PCRプライマー（36469．f3）：

5' - TCATCTCTTCCCTCTCCC - 3'（配列番号：99）

正方向PCRプライマー（36469．f4）：

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

逆方向PCRプライマー（36469．r1）：

5' - GGCAAGTCCACTCCGATGATGTC - 3'（配列番号：101）

逆方向PCRプライマー（36469．r2）：

5' - GCCCTGCTGTGGTCAACAGGTCCTCCG - 3'（配列番号：102）

さらに、DNA36469及び（consen01）コンセンサス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（36469．p1）：

5' - TCGGGGAGCAGGCTTGAACCGGGGCATTGCTGCTGT
CAAGGAGG - 3'（配列番号：103）

【0160】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でPCR増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、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PRO274遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリの構築のためのRNAはヒト胎児肝臓組織（LIB229）から単離した。

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、DNA39987-1184 [Fig 15、配列番号：15]の全長DNA配列；及びPRO274の誘導タンパク質配列が得られた。

10

20

30

40

50

DNA 39987-1184の全コード化配列がFig 15（配列番号：15）に含まれる。クローンDNA 39987-1184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83-85に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置1559-1561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492アミノ酸長であり、約54,241ダルトンの分子量及び約8.21の見積もりpIを持つ。Fig 16（配列番号：16）に示した全長PRO344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よそのものである。Fig 16に示した全長PRO344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86～約アミノ酸105、約アミノ酸162～アミノ酸178、約アミノ酸327～約アミノ酸345、約アミノ酸359～約アミノ酸374、及び約アミノ酸43～約アミノ酸423の膜貫通ドメイン；約アミノ酸347～約アミノ酸351及び約アミノ酸461～約アミノ酸465のN-グリコシル化部位；約アミノ酸325～約アミノ酸329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53～約アミノ酸59、約アミノ酸94～約アミノ酸100、約アミノ酸229～約アミノ酸235、約アミノ酸267～約アミノ酸273、約アミノ酸268～約アミノ酸274、約アミノ酸358～約アミノ酸364、約アミノ酸422～約アミノ酸428、約アミノ酸425～約アミノ酸431、及び約アミノ酸431～約アミノ酸437のN-ミリスチル化部位。クローンDNA 39987-1184は1998年4月21日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209786が付与された。

Fig 16（配列番号：16）に示したPRO274の全長アミノ酸配列の分析により、その一部がFn54タンパク質と有意な相同性を有していることが示唆された。より詳細には、Dayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、PRO274アミノ酸配列と以下に示すDayhoff配列との間に配列相同性が見いだされた：MMFN54S2_1, MMFN54S1_1, CELF48C1_8, CEF38B7_6, PRP3_RAT, INL3_PIG, MTCY07A7_13, YNAX_KLEAE, A47234, 及びHME2_MOUSE。

【0161】

実施例11

ヒトPRO304をコードするcDNAクローンの単離

実施例1に記載したように、phrapを用いて他のEST配列に対してコンセンサスDNA配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでDNA35958と命名する。DNA35958コンセンサス配列に基づいて、1)PCRにより対象とする配列を含むcDNAライブラリを同定するため、及び2)PRO304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。

PCRプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向PCRプライマー1：

5'-GCGGAAGGGCAGAAATGGGACTCCAAG-3'（配列番号：104）

正方向PCRプライマー2：

5'-CAGCCCTGCCACATGTGC-3'（配列番号：105）

正方向PCRプライマー3：

5'-TACTGGGTGGTTCAGCAAC-3'（配列番号：106）

逆方向PCRプライマー1：

5'-GGCGAAGAGCAGGGTGAGACCCCG-3'（配列番号：107）

さらに、DNA35958コンセンサス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'-GCCCTCATCTCTCTGGCAAAATGCAGTTACAGCCCGGAGCCCGAC-3'（配列番号：108）

【0162】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でPCR増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、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PRO304遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリの構築のためのRNAは22週ヒト胎児脳組織(LIB153)から単離した。

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、DNA39520-1217 [Fig 17、配列番号：17]の全長DNA配列；及びPRO304の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA39520-1217の全コード化配列がFig 17 (配列番号：17)に含まれる。クローンDNA39520-1217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34-36に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置1702-1704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556アミノ酸長である。Fig 18 (配列番号：18)に示した全長PRO344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よそのものである。Fig 18に示した全長PRO344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1～約アミノ酸16のシグナルペプチド；約アミノ酸210～アミノ酸214、約アミノ酸222～約アミノ酸226、約アミノ酸286～約アミノ酸290、約アミノ酸313～約アミノ酸317、約アミノ酸443～約アミノ酸447のN-グリコシル化部位；約アミノ酸361～約アミノ酸365、約アミノ酸408～約アミノ酸412、及び約アミノ酸538～約アミノ酸542のグリコサミノグリカン接着部位；約アミノ酸2～約アミノ酸8、約アミノ酸107～約アミノ酸113、約アミノ酸195～約アミノ酸201、約アミノ酸199～約アミノ酸205、約アミノ酸217～約アミノ酸223、約アミノ酸219～約アミノ酸225、約アミノ酸248～約アミノ酸254、約アミノ酸270～約アミノ酸276、約アミノ酸284～約アミノ酸290、約アミノ酸409～約アミノ酸415、約アミノ酸410～約アミノ酸416、約アミノ酸473～約アミノ酸479、約アミノ酸482～約アミノ酸488、約アミノ酸521～約アミノ酸527、約アミノ酸533～約アミノ酸539、及び約アミノ酸549～約アミノ酸555のN-ミリスチル化部位。クローンDNA39520-1217は1997年11月21日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209482が付与された。

【0163】

実施例12

ヒトPRO339をコードするcDNAの単離

発現配列タグ(EST)DNAデータベース(LIFESEQ (商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA)を検索し、ESTを同定した。Incyteクローン及びコンセンサス配列を、4つおの正方向プライマーから形成し、2つの逆方向プライマー及び他のプライマーを形成した。ヒト胎児肝臓cDNAライブラリを、同定したESTに基づく合成オリゴヌクレオチドプローブでのハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。ヒトPRO339をコードするcDNAクローン作成のために用いたcDNAライブラリは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、Not I部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSal Iヘミキナーゼアダプターに結合させ、Not Iで切断し、ゲル電気泳動で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(pRKB又はpRKD等；pRK5BはSfi I部位を含まないpRK5Dの前駆体である；Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991) 参照)に、独特のXho I及びNot I部位において、所定の方向でクローニングした。

以下のオリゴヌクレオチドプローブを使用した：

正方向PCRプライマー1：

5' - G G G A T G C A G G T G G T G T C T C A T G G G G - 3' (配列番号: 109)

正方向PCRプライマー2:

5' - C C C T C A T G T A C C G G C T C C - 3' (配列番号: 110)

正方向PCRプライマー3:

5' - G T G T G A C A C A G C G T G G G C - 3' (配列番号: 111)

正方向PCRプライマー4:

5' - G A C C G G C A G G C T T C T G C G - 3' (配列番号: 112)

逆方向PCRプライマー1:

5' - C A G C A G C T T C A G C C A C C A G G A G T G G - 3' (配列番号: 113) 10

逆方向PCRプライマー2:

5' - C T G A G C C G T G G G C T G C A G T C T C G C - 3' (配列番号: 114)

プライマー:

5' - C C G A C T A C G A C T G G T T C T T C A T C A T G C A G G A T G A C A C A T A T G T G C - 3' (配列番号: 115)

【0164】

全長クローンDNA 43466-1225 [Fig 19、配列番号: 19] を同定し、全体を配列決定したところ、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333-335に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置2649-2651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772アミノ酸長であり、約86,226ダルトンの算定分子量を持つ。Fig 20 (配列番号: 20) に示した全長PRO339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よそのものである。Fig 20 に示した全長PRO339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1~約アミノ酸15のシグナルペプチド; 約アミノ酸489~約アミノ酸510の膜貫通ドメイン; 約アミノ酸121~約アミノ酸125及び約アミノ酸342~約アミノ酸346のN-グリコシル化部位; 約アミノ酸319~約アミノ酸323及び約アミノ酸464~約アミノ酸468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736~約アミノ酸743のチロシンキナーゼリン酸化部位; 約アミノ酸19~約アミノ酸25、約アミノ酸23~約アミノ酸29、約アミノ酸136~約アミノ酸142、約アミノ酸397~約アミノ酸403、約アミノ酸441~約アミノ酸447、約アミノ酸544~約アミノ酸550、約アミノ酸558~約アミノ酸564、約アミノ酸651~約アミノ酸657、約アミノ酸657~約アミノ酸663、及び約アミノ酸672~約アミノ酸678のN-ミリスチル化部位; 約アミノ酸14~約アミノ酸25の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位; 約アミノ酸247~約アミノ酸250の細胞接着配列。クローンDNA 43466-1225は1997年11月21日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209490が付与された。Fig 20 (配列番号: 20) に示した全長配列のBLAST及びFastA配列アラインメント分析に基づく、PRO339は線虫タンパク質及びコラーゲン様ポリマー配列並びにフリンジと配列同一性を示し、よってPRO339は発育及び組織成長に含まれることが示された。 20 30 40

【0165】

実施例13

ヒトPRO1558をコードするcDNAクローンの単離

DNA 71282-1668は、上記実施例2に示されている独自のシグナル配列発見アルゴリズムを適用する事により同定された。上記シグナル配列アルゴリズムを利用することで、LIFESEQデータベース(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, からのIncyte ESTクラスター番号86390で表されるESTクラスター配列の同定を可能ならしめた。その後、存在する相同性を同定するために、このESTクラスター配列を公的(例えば、GenBank)及 50

び／又は私的 (L I F E S E Q (登録商標), I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s, I n c., P a l o A l t o, C A) データベースを含む様々な発現配列タグ (E S T) データベースと比較した。相同性検索は、コンピュータプログラム B L A S T 又は B L A S T 2 (A l t s c h u l 等, M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 2 6 6 : 4 6 0 - 4 8 0 (1996)) を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、B L A S T 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「p h r a p」(P h i l G r e e n, U n i v e r s i t y o f W a s h i n g t o n, S e a t t l e, W a s h i n g t o n) で集団化してコンセンサス D N A 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 D N A 5 8 8 4 2 と命名する。

10

D N A 5 8 8 4 2 配列と I n c y t e E S T 番号 3 7 4 6 9 6 4 との間の配列相同性に鑑みて、I n c y t e E S T 番号 3 7 4 6 9 7 4 を購入し、c D N A 挿入物を得て配列決定した。この c D N A 挿入物の配列を F i g 2 1 (配列番号 : 2 1) に示し、ここで D N A 7 1 2 8 2 - 1 6 6 8 と命名する。

【0166】

D N A 7 1 2 8 2 - 1 6 6 8 の全コード配列は F i g 2 1 (配列番号 : 2 1) に含まれている。クローン D N A 7 1 2 8 2 - 1 6 6 8 は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 8 4 - 8 6 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 8 7 0 - 8 7 2 の停止コドンで終端する (F i g 2 1)。予測されるポリペプチド前駆体は 2 6 2 アミノ酸長である (F i g 2 2 ; 配列番号 : 2 2)。F i g 2 2 に示す全長 P R O 1 5 5 8 タンパク質は、約 2 8, 8 0 9 の見積もり分子量及び約 8. 8 0 の p I を有する。F i g 2 2 (配列番号 : 2 2) に示した全長 P R O 1 5 5 8 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よそのものである。F i g 2 2 に示した全長 P R O 1 5 5 8 配列の分析により、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 8 ~ 約アミノ酸 3 0 及び約アミノ酸 1 0 9 ~ 約アミノ酸 1 3 0 の膜貫通ドメイン ; 約アミノ酸 1 9 0 ~ 約アミノ酸 1 9 4 の N - グリコシル化部位 ; 約アミノ酸 2 3 8 ~ 約アミノ酸 2 4 7 のチロシンキナーゼリン酸化部位 ; 約アミノ酸 2 2 ~ 約アミノ酸 2 8、約アミノ酸 2 8 ~ 約アミノ酸 3 4、約アミノ酸 1 1 0 ~ 約アミノ酸 1 1 6、約アミノ酸 2 0 5 ~ 約アミノ酸 2 1 1、及び約アミノ酸 2 5 5 ~ 約アミノ酸 2 6 1 の N - ミリスチル化部位 ; 約アミノ酸 3 1 ~ 約アミノ酸 3 5 及び約アミノ酸 3 9 ~ 約アミノ酸 4 3 のアミド化部位。クローン D N A 7 1 2 8 2 - 1 6 6 8 は 1 9 9 8 年 1 0 月 6 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 3 3 1 2 が付与された。

20

30

F i g 2 2 (配列番号 : 2 2) に示した全長配列の W U - B L A S T - 2 配列アラインメント分析を用いた D a y h o f f データベース (バージョン 3 5. 4 5 S w i s s P r o t 3 5) の分析により、P R O 1 5 5 8 アミノ酸配列と以下に示す D a y h o f f 配列との間に配列相同性が見いだされた : A F 7 5 7 2 4 _ 2, M X U 2 4 6 5 7 _ 3, C A M T _ E U C G U, M S U 2 0 7 3 6 _ 1, P _ R 2 9 5 1 5, B 7 0 4 3 1, J C 4 0 0 4, C E Y 3 2 B 1 2 A _ 3, C E L F 5 3 B 3 _ 2, 及び P _ R 1 3 5 4 3。

40

【0167】

実施例 1 4

ヒト P R O 7 7 9 をコードする c D N A の単離

ヒト胎児心臓及びヒト胎児肺 l g t 1 0 バクテリオファージ c D N A ライブラリ (共に C l o n t e c h から購入) を、ヒト T N F R 1 及び C D 9 5 の細胞内ドメイン (I C D) と或る程度の相同性を示した E S T (G e n B a n k 位置 W 7 1 9 8 4) に基づく合成オリゴヌクレオチドプローブでのハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。W 7 1 9 8 4 は 5 2 3 b p の E S T であり、その - 1 読み枠は、ヒト T N F R 1 の I C D における 4 3 アミノ酸長配列と 2 7 の同一性を有する。スクリーニングに使用したオリゴヌクレオチドプローブは、各々 2 7 及び 2 5 b p 長であり、以下の配列を持つ :

50

5' - G G C G C T C T G G T G G C C C T T G C A G A A G C C - 3' (配列番号: 116)

5' - T T C G G C C G A G A A G T T G A G A A A T G T C - 3' (配列番号: 117)

【0168】

ハイブリダイゼーションは、2つのプローブの1:1混合物で終夜室温において、20%ホルムアミド、5XSSC、10%デキストラン硫酸、0.1%NaPiPO₄、0.05MNaPO₄、0.05mgサケ精子DNA、及び0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含有するバッファー中で実施し、次いで室温において6XSSCで一回、37℃において1XSSC/0.1%SDSで2回、37℃において0.5XSSC/0.1%SDSで2回、及び37℃において0.2XSSC/0.1%SDSで2回洗浄した。胎児心臓(FH20A.57)及び胎児肺(FL8A.53)ライブラリ各々からのポジティブクローン1つずつを上記の対応するプローブをプライマーとして使用したPCRにより特異性を確認した。各ポジティブクローンを含む単一のファージプラークを限外濾過により単離し、DNAをWizard lambda prep DNA精製キット(Promega)を用いて精製した。

ラムダベクターアームからEcoRIでの消化によりcDNAを切断し、ゲル精製し、予めEcoRIで消化したpRK5にサブクローニングした。次いでクローン全体を配列決定した。

【0169】

クローン(F20A.57)DNA58801-1052(下記のように、ATCC55820として寄託されたApo3クローンFH20.57とも呼ばれる)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103-105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1354-1356の停止コドンで終端する[Fig 23; 配列番号: 23]。予測されるポリペプチド前駆体は417アミノ酸長である[Fig 24; 配列番号: 24]。Fig 24に示す全長PRO779タンパク質は、約45,000の見積もり分子量及び約6.40のpIを有する。Fig 24(配列番号: 24)に示した全長PRO779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よおよそのものである。Fig 24に示した全長PRO779配列の分析により、以下の存在が明らかになった: 約アミノ酸1~約アミノ酸24のシグナルペプチド; 約アミノ酸199~約アミノ酸219の膜貫通ドメイン; 約アミノ酸67~約アミノ酸71、及び約アミノ酸106~約アミノ酸110のN-グリコシル化部位; 約アミノ酸157~約アミノ酸161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44~約アミノ酸50、約アミノ酸50~約アミノ酸56、約アミノ酸66~約アミノ酸72、約アミノ酸116~約アミノ酸122、約アミノ酸217~約アミノ酸223、約アミノ酸355~約アミノ酸361、約アミノ酸391~約アミノ酸397、及び約アミノ酸401~約アミノ酸407のN-ミリスチル化部位; 及び約アミノ酸177~約アミノ酸188の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位。クローンDNA58801-1052は1996年9月5日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号55820が付与された。

ECDは4つのシステインリッチな反復を含み、それはヒトTNFR1(4つの反復)ヒトDC95(3つの反復)及び他の周知のTNFRファミリーメンバーの対応する領域に類似している。ICDは死亡ドメイン配列を含み、それはTNFR1及びCD95に見られる死亡ドメイン及びヒトFADD/MORT1、TRADD、RIP、及びショウジョウバエリーパー等の細胞質死亡シグナル伝達タンパク質に類似している。全体及び個々の領域の両方で、PRO779(Apo3)はCD95よりTNFR1に密接に関連しており; 各アミノ酸同一性は、全体で29.3%及び22.8%、ECDにおいて28.2%及び24.7%、ICDにおいて31.6%及び18.3%、及び死亡ドメインにおいて47.5%及び20%である。

10

20

30

40

50

【0170】

実施例15

ヒトPRO1185をコードするcDNAクローンの単離

DNA62881-1515は、上記実施例2に示されている独自のシグナル配列発見アルゴリズムを適用する事により同定された。上記シグナル配列アルゴリズムを利用することで、LIFESEQデータベース（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, からのIncyte ESTクラスター番号86390で表されるESTクラスター配列の同定を可能ならしめた。その後、存在する相同性を同定するために、このESTクラスター配列を公的（例えば、GenBank）及び／又は私的（LIFESEQ（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA）データベースを含む様々な発現配列タグ（EST）データベースと比較した。相同性検索は、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DNA56426と命名する。

DNA56426配列とIncyte EST番号3284411との間の配列相同性に鑑みて、このIncyte EST番号3284411を含むクローンを（大動脈組織からのRNAで構成されたライブラリから）購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。このcDNA挿入物の配列をFig25（配列番号：25）に示し、ここでDNA62881-1515と命名する。

【0171】

DNA62881-1515の全コード配列はFig25（配列番号：25）に含まれている。クローンDNA62881-1515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4-6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598-600の停止コドンで終端する（Fig25）。予測されるポリペプチド前駆体は198アミノ酸長である（Fig26；配列番号：26）。Fig26に示す全長PRO1185タンパク質は、約22,105の見積もり分子量及び約7.73のpIを有する。Fig26（配列番号：26）に示した全長PRO1185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よそのものである。Fig26に示した全長PRO1185配列の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸1～約アミノ酸21のシグナルペプチド；約アミノ酸46～約アミノ酸52、約アミノ酸51～約アミノ酸57、及び約アミノ酸78～約アミノ酸84のN-ミリスチル化部位。クローンDNA62881-1515は1998年8月4日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203096が付与された。

Fig26（配列番号：26）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、PRO1185アミノ酸配列と以下に示すDayhoff配列との間に配列相同性が見いだされた：TUP1_YEAST, AF41382_1, MAOM_SPLTU, SPPBPHU9_1, EPCPLCFAIL_1, HSPLEC_1, YKL4_CAEEL, A44643, 及びTGU65922_1。

【0172】

実施例16

ヒトPRO1245をコードするcDNAクローンの単離

DNA64884-1527は、上記実施例2に示されている独自のシグナル配列発見アルゴリズムを適用する事により同定された。上記シグナル配列アルゴリズムを利用するこ

とで、L I F E S E Qデータベース（登録商標）， I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s， P a l o A l t o， C A，からのI n c y t e E S Tクラスター番号86390で表されるE S Tクラスター配列の同定を可能ならしめた。その後、存在する相同性を同定するために、このE S Tクラスター配列を公的（例えば、G e n B a n k）及び／又は私的（L I F E S E Q（登録商標）， I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s， I n c.， P a l o A l t o， C A）データベースを含む様々な発現配列タグ（E S T）データベースと比較した。相同性検索は、コンピュータプログラムB L A S T又はB L A S T 2（A l t s c h u l 等， M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 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、B L A S T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「p h r a p」（P h i l G r e e n， U n i v e r s i t y o f W a s h i n g t o n， S e a t t l e， W a s h i n g t o n）で集団化してコンセンサスD N A配列を構築した。構築に使用したE S Tの1つ又は複数は耳下腺癌を持つヒトの耳下（唾液）腺から作成したライブラリから誘導した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでD N A 56019と命名する。

D N A 56019配列とI n c y t e E S T番号1327836との間の配列相同性に鑑みて、I n c y t e E S T番号1327836を購入し、c D N A挿入物を得て配列決定した。このc D N A挿入物の配列をF i g 27（配列番号：27）に示し、ここでD N A 64884-1527と命名する。

【0173】

D N A 64884-1527の全コード配列はF i g 27（配列番号：27）に含まれている。クローンD N A 64884-1527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79-81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391-393の停止コドンで終端する（F i g 27）。予測されるポリペプチド前駆体は104アミノ酸長である（F i g 28；配列番号：28）。F i g 28に示す全長P R O 1245タンパク質は、約10，100の見積もり分子量及び約8.76のp Iを有する。F i g 28（配列番号：28）に示した全長P R O 1245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よそのものである。F i g 28に示した全長P R O 1245配列の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸1～約アミノ酸18のシグナルペプチド；約アミノ酸8～約アミノ酸14、約アミノ酸65～約アミノ酸71、約アミノ酸74～約アミノ酸80、及び約アミノ酸88～約アミノ酸94のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸5～約アミノ酸16の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位。クローンD N A 64884-1527は1998年8月25日にA T C Cに寄託され、A T C C寄託番号203155が付与された。

F i g 28（配列番号：28）に示した全長配列のW U-B L A S T-2配列アラインメント分析を用いたD a y h o f fデータベース（バージョン35.45 S w i s s P r o t 35）の分析により、P R O 1245アミノ酸配列と以下に示すD a y h o f f配列との間に配列相同性が見いだされた：S Y A _ T H E T H， G E N 11167， M T V 044_4， A B 011151_1， R L A J 2750_3， S N E L I P T R A _1， S 63624， C 28391， A 37907， 及びS 14064。

【0174】

実施例17

ヒトP R O 1759をコードするc D N Aクロンの単離

D N A 76531-1701は、上記実施例2に示されている独自のシグナル配列発見アルゴリズムを適用する事により同定された。上記シグナル配列アルゴリズムを利用することで、L I F E S E Qデータベース（登録商標）， I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s， P a l o A l t o， C A，からのI n c y t e E S Tクラスター番号86390で表されるE S Tクラスター配列の同定を可能ならしめた。その後、存在する相同性を同定するために、このE S Tクラスター配列を公的（例えば、G e n B a n k）及

び／又は私的 (L I F E S E Q (登録商標), I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s, I n c., P a l o A l t o, C A) データベースを含む様々な発現配列タグ (E S T) データベースと比較した。相同性検索は、コンピュータプログラム B L A S T 又は B L A S T 2 (A l t s c h u l 等, M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 2 6 6 : 4 6 0 - 4 8 0 (1 9 9 6)) を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、B L A S T スコア 7 0 (9 0 の場合もある) 又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「p h r a p」(P h i l G r e e n, U n i v e r s i t y o f W a s h i n g t o n, S e a t t l e, W a s h i n g t o n) で集団化してコンセンサス D N A 配列を構築した。構築に使用した E S T の 1 つ又は複数は、アレルギー性喘息患者のプールした好酸球から誘導した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここで D N A 5 7 3 1 3 と命名する。 10

D N A 5 7 3 1 3 配列と I n c y t e E S T 番号 2 4 3 4 2 5 5 との間の配列相同性に鑑みて、I n c y t e E S T 番号 2 4 3 4 2 5 5 を購入し、c D N A 挿入物を得て配列決定した。この c D N A 挿入物の配列を F i g 2 9 (配列番号：2 9) に示し、ここで D N A 7 6 5 3 1 - 1 7 0 1 と命名する。

【0 1 7 5】

D N A 7 6 5 3 1 - 1 7 0 1 の全コード配列は F i g 2 9 (配列番号：2 9) に含まれている。クローン D N A 7 6 5 3 1 - 1 7 0 1 は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 1 2 5 - 1 2 7 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 1 4 7 5 - 1 4 7 7 の停止コドンで終端する (F i g 2 9)。予測されるポリペプチド前駆体は 4 5 0 アミノ酸長である (F i g 3 0 ; 配列番号：3 0)。F i g 3 0 に示す全長 P R O 1 7 5 9 タンパク質は、約 4 9, 7 6 5 の見積もり分子量及び約 8. 1 4 の p I を有する。F i g 3 0 (配列番号：3 0) に示した全長 P R O 1 7 5 9 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よそのものである。F i g 3 0 に示した全長 P R O 1 7 5 9 配列の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸 1 ~ 約アミノ酸 1 8 のシグナルペプチド；約アミノ酸 4 1 ~ 約アミノ酸 5 5、約アミノ酸 7 5 ~ 約アミノ酸 9 4、約アミノ酸 1 2 7 ~ 約アミノ酸 1 4 3、約アミノ酸 1 9 1 ~ 約アミノ酸 2 1 3、約アミノ酸 2 4 9 ~ 約アミノ酸 2 7 0、約アミノ酸 2 7 8 ~ 約アミノ酸 2 9 9、約アミノ酸 3 1 4 ~ 約アミノ酸 3 3 0、約アミノ酸 3 4 3 ~ 約アミノ酸 3 5 9、約アミノ酸 3 7 9 ~ 約アミノ酸 3 9 4、及び約アミノ酸 4 1 0 ~ 約アミノ酸 4 3 0 の膜貫通ドメイン；約アミノ酸 1 0 4 ~ 約アミノ酸 1 0 8 の c A M P - 及び c A M P - 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸 1 1 ~ 約アミノ酸 1 7、約アミノ酸 1 8 ~ 約アミノ酸 2 4、約アミノ酸 8 4 ~ 約アミノ酸 9 0、約アミノ酸 9 2 ~ 約アミノ酸 9 8、約アミノ酸 1 3 7 ~ 約アミノ酸 1 4 3、約アミノ酸 1 3 8 ~ 約アミノ酸 1 4 4、約アミノ酸 2 3 8 ~ 約アミノ酸 2 4 4、約アミノ酸 2 5 3 ~ 約アミノ酸 2 5 9、約アミノ酸 2 7 8 ~ 約アミノ酸 2 8 4、及び約アミノ酸 2 8 2 ~ 約アミノ酸 2 8 8 の N - ミリスチル化部位；約アミノ酸 1 0 2 ~ 約アミノ酸 1 0 6 のアミド化部位；約アミノ酸 6 ~ 約アミノ酸 1 7 の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位。クローン D N A 7 6 5 3 1 - 1 7 0 1 は 1 9 9 8 年 1 1 月 1 7 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 3 4 6 5 が付与された。 40

F i g 3 0 (配列番号：3 0) に示した全長配列の W U - B L A S T - 2 配列アラインメント分析を用いた D a y h o f f データベース (バージョン 3 5. 4 5 S w i s s P r o t 3 5) の分析により、P R O 1 7 5 9 アミノ酸配列と以下に示す D a y h o f f 配列との間に配列相同性が見いだされた：O P D E _ P S E A E, T H 1 1 _ T R Y B B, S 6 7 6 8 4, R G T 2 _ Y E A S T, S 6 8 3 6 2, A T S U G T R P R _ 1, P _ W 1 7 8 3 6 (特許出願 W O 9 7 1 5 6 6 8 - A 2), F 6 9 5 8 7, A 4 8 0 7 6, 及び A 4 5 6 1 1。

【0 1 7 6】

実施例 1 8

ヒト P R O 5 7 7 5 をコードする c D N A クローンの単離

DNA 96869-2673は、上記実施例2に示されている独自のシグナル配列発見アルゴリズムを適用する事により同定された。上記シグナル配列アルゴリズムを利用することで、LIFESSEQデータベース（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, からのIncyte ESTクラスター番号86390で表されるESTクラスター配列の同定を可能ならしめた。その後、存在する相同性を同定するために、このESTクラスター配列を公的（例えば、GenBank）及び／又は私的（LIFESSEQ（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA）データベースを含む様々な発現配列タグ（EST）データベースと比較した。相同性検索は、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DNA 79860と命名する。

DNA 79860配列とLIFESSEQ（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CAデータベースからのクローン番号164726H1に含まれるIncyte EST配列との間の配列相同性に鑑みて、クローン番号164726H1を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。このcDNA挿入物の配列をFig 31（配列番号：31）に示し、ここでDNA 96869-2673と命名する。

【0177】

DNA 96869-2673の全コード配列はFig 31（配列番号：31）に含まれている。クローンDNA 96869-2673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193-195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1660-1662の停止コドンで終端する（Fig 31）。予測されるポリペプチド前駆体は489アミノ酸長である（Fig 32；配列番号：32）。Fig 32に示す全長PRO5775タンパク質は、約53,745の見積もり分子量及び約8.36のpIを有する。Fig 32（配列番号：32）に示した全長PRO5775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よそのものである。Fig 32に示した全長PRO5775配列の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸1～約アミノ酸29のシグナルペプチド；約アミノ酸381～約アミノ酸399の膜貫通ドメイン；約アミノ酸133～約アミノ酸137、約アミノ酸154～約アミノ酸158、約アミノ酸232～約アミノ酸236、約アミノ酸264～約アミノ酸268、約アミノ酸386～約アミノ酸390、約アミノ酸400～約アミノ酸404、約アミノ酸410～約アミノ酸414、及び約アミノ酸427～約アミノ酸431のN-グリコシル化部位；約アミノ酸58～約アミノ酸64、約アミノ酸94～約アミノ酸100、約アミノ酸131～約アミノ酸137、約アミノ酸194～約アミノ酸200、約アミノ酸251～約アミノ酸257、約アミノ酸277～約アミノ酸283、約アミノ酸281～約アミノ酸287、約アミノ酸361～約アミノ酸367、約アミノ酸399～約アミノ酸405、約アミノ酸440～約アミノ酸446、約アミノ酸448～約アミノ酸454、及び約アミノ酸478～約アミノ酸484のN-ミリスチル化部位。クローンDNA 96869-2673は1999年6月22日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-255が付与された。

Fig 32（配列番号：32）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、PRO5775アミノ酸配列と以下に示すDayhoff配列との間に配列相同性が見いだされた：U94848_12, P_W57899, CV

41KBPL__33, HSU60644__1, CVORF1L5L__3, VK04__VACCV, CVGRI90__41, VK04__VACCC, 及びAF026124__1。

【0178】

実施例19

ヒトPRO7133をコードするcDNAの単離

クローンDNA128450-2739は、CARD相同性スクリーニングにより引き出し、その配列を、伝統的な低緊縮性及びハイブリダイゼーションを用いたPRO7133の全長コード化配列のクローンを単離するためのプローブとして使用した。PRO7133についての全ORFを同定するために、SOCA-1のN-末端部分をコードするcDNA断片の分子を含むCARDドメインを使用してヒト胎児腎臓ライブラリをスクリーニングした。幾つかのポジティブクローンを取り、DNAを調製して配列決定した。

正方向プライマー：

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

逆方向プライマー：

5'-GCGGAATTTCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTCTGTTCCTCCTCCCAATGAAAGGC-3' (配列番号：119)

プローブDNA (SOCA-1) は以下のヌクレオチド配列を有していた：

5'-CGCGTACGTAAAGCTCGGAATTTCGGCTCGAGGGGAACAATGGCTACCGAGAGTACTCCCTCAGAGATCATAGAACTGGTGAAGAAACCAAGTTATGAGGGGATCAGAAACCAGCCTTTCAATTGGAGGAGGAACAGGAGAAAAAGTATAAAAAA AAAA AAAGGGCGGGCCGGCCGACTAGTGAGCTCGTCGACCCGGGAATTAAATTCCGGACCGGTACCTGCAGGCGTACCAGCTTTCCCTATAGTAGTG-3' (配列番号：120)

【0179】

DNA配列決定により、cDNAの一つがヒトSabタンパク質と有意に相同なタンパク質をコードするORFを含むこと；PRO7133ポリペプチド (ここでDNA128451-2739と命名される) [Fig33；配列番号：33] 及びそのPRO7133ポリペプチドの誘導タンパク質配列が明らかになった。

クローンDNA128451-2739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501-503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1680-1682の停止コドンで終端する (Fig33)。予測されるポリペプチド前駆体は393アミノ酸長である (Fig34；配列番号：34)。Fig34に示す全長PRO7133タンパク質は、約43, 499の見積もり分子量及び約5.75のpIを有する。Fig34 (配列番号：34) に示した全長PRO7133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よそのものである。Fig34に示した全長PRO7133配列の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸287～約アミノ酸291及び約アミノ酸375～約アミノ酸379のcAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；シグナルペプチド；約アミノ酸37～約アミノ酸43、約アミノ酸38～約アミノ酸44、約アミノ酸39～約アミノ酸45、約アミノ酸40～約アミノ酸46、約アミノ酸103～約アミノ酸109、約アミノ酸307～約アミノ酸313、約アミノ酸310～約アミノ酸316、約アミノ酸315～約アミノ酸321、約アミノ酸365～約アミノ酸371、約アミノ酸369～約アミノ酸375、約アミノ酸373～約アミノ酸379、約アミノ酸377～約アミノ酸383、約アミノ酸380～約アミノ酸386、及び約アミノ酸381～約アミノ酸387のN-ミリスチル化部位；及び約アミノ酸373～約アミノ酸377のアミド化部位。クローンDNA128451-2739は1999年8月31日にATCCに寄託され、ATCC寄託番

号 P T A - 6 1 8 が付与された。

【0180】

実施例 20

ヒト P R O 7 1 6 8 をコードする c D N A クローンの単離

D N A 1 0 2 8 4 6 - 2 7 4 2 は、上記実施例 2 に示されている独自のシグナル配列発見アルゴリズムを適用する事により同定された。上記シグナル配列アルゴリズムを利用することで、L I F E S E Q データベース（登録商標）、I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s , P a l o A l t o , C A , からの I n c y t e E S T クラスター番号 8 6 3 9 0 で表される E S T クラスター配列の同定を可能ならしめた。その後、存在する
10 相同性を同定するために、この E S T クラスター配列を公的（例えば、G e n B a n k ）
及び／又は私的（L I F E S E Q （登録商標）、I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s , I n c . , P a l o A l t o , C A ）データベースを含む様々な発現配列
タグ（E S T ）データベースと比較した。相同性検索は、コンピュータプログラム B L A S T 又は B L A S T 2 （A l t s c h u l 等、M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 2 6 6 : 4 6 0 - 4 8 0 （1996））を用いて実施した。既知のタンパク質を
コードせず、B L A S T スコア 7 0 （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「p h r a p」（P h i l G r e e n , U n i v e r s i t y o f W a s h i n g t o n , S e a t t l e , W a s h i n g t o n ）で集団化してコンセンサス
D N A 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 D N A 5 7 9 5 3
と命名する。
20

【0181】

D N A 5 7 9 5 3 配列と L I F E S E Q （登録商標）、I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s , I n c . , P a l o A l t o , C A データベースからのクローン番号 4 1 8 1 3 5 1 に含まれる I n c y t e E S T 配列との間の配列相同性に鑑みて、クローン番号 4 1 8 1 3 5 1 を購入し、c D N A 挿入物を得て配列決定した。この c D N A 挿入物の配列を F i g 3 5 （配列番号：35）に示し、ここで D N A 1 0 2 8 4 6 - 2 7 4 2 と命名する。

【0182】

D N A 1 0 2 8 4 6 - 2 7 4 2 の全コード配列は F i g 3 5 （配列番号：35）に含まれている。クローン D N A 1 0 2 8 4 6 - 2 7 4 2 は単一のオープンリーディングフレーム
30 を含み、ヌクレオチド位置 2 3 - 2 5 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 2 5 4 0 - 2 5 4 2 の停止コドンで終端する（F i g 3 5）。予測されるポリペプチド前駆体は 8 3 9 アミノ酸長である（F i g 3 6；配列番号：36）。F i g 3 6 に示す全長 P R O 7 1 6 8 タンパク質は、約 8 7 , 5 4 6 の見積もり分子量及び約 4 . 8 4 の p I を有する。F i g 3 6 （配列番号：36）に示した全長 P R O 7 1 6 8 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よそのものである。F i g 3 6 に示した全長 P R O 7 1 6 8 配列の分析により、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 6 6 3 ~ 約アミノ酸 6 8 6 の膜貫通ドメイン；約アミノ酸 4 4 ~ 約アミノ酸 4 8、約アミノ酸 1 4 0 ~ 約アミノ酸 1 4 4、約ア
40 ミノ酸 1 9 8 ~ 約アミノ酸 2 0 2、約アミノ酸 2 9 7 ~ 約アミノ酸 3 0 1、約アミノ酸 3 0 8 ~ 約アミノ酸 3 1 2、約アミノ酸 4 0 5 ~ 約アミノ酸 4 0 9、及び約アミノ酸 5 2 0 ~ 約アミノ酸 5 2 4 の N - グリコシル化部位；約アミノ酸 4 9 0 ~ 約アミノ酸 4 9 4、約アミノ酸 6 4 7 ~ 約アミノ酸 6 5 1 及び約アミノ酸 8 1 3 ~ 約アミノ酸 8 1 7 のグリコサミノグリカン接着部位；約アミノ酸 6 5 5 ~ 約アミノ酸 6 5 9 の c A M P - 及び c G M P - 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸 1 5 4 ~ 約アミノ酸 1 6 3 及び約アミノ酸 7 7 6 ~ 約アミノ酸 7 8 3 のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸 5 7 ~ 約アミノ酸 6 3、約アミノ酸 1 0 2 ~ 約アミノ酸 1 0 8、約アミノ酸 2 5 5 ~ 約アミノ酸 2 6 1、約アミノ酸 2 9 4 ~ 約アミノ酸 3 0 0、約アミノ酸 3 6 6 ~ 約アミノ酸 3 7 2、約ア
50 ミノ酸 4 2 6 ~ 約アミノ酸 4 3 2、約アミノ酸 4 4 1 ~ 約アミノ酸 4 4 7、約アミノ酸

513～約アミノ酸519、約アミノ酸517～約アミノ酸523、約アミノ酸530～約アミノ酸536、約アミノ酸548～約アミノ酸554、約アミノ酸550～約アミノ酸556、約アミノ酸581～約アミノ酸587、約アミノ酸592～約アミノ酸598、約アミノ酸610～約アミノ酸616、約アミノ酸612～約アミノ酸618、約アミノ酸623～約アミノ酸629、約アミノ酸648～約アミノ酸654、約アミノ酸666～約アミノ酸672、約アミノ酸667～約アミノ酸673、約アミノ酸762～約アミノ酸768、約アミノ酸763～約アミノ酸769、約アミノ酸780～約アミノ酸786、約アミノ酸809～約アミノ酸815、約アミノ酸821～約アミノ酸827、及び約アミノ酸833～約アミノ酸839のN-ミリスチル化部位；及び約アミノ酸112～約アミノ酸123のハドヘリン細胞外繰り返しドメイン。クローンDNA102846-2742は1999年8月17日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203312が付与された。

【0183】

Fig 36（配列番号：36）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、PRO7168アミノ酸配列と以下に示すDayhoff配列との間に配列相同性が見いだされた：CELT22D1__9, B48013, F100960__1, MUC2__HUMAN, PRP3__MOUSE, S53363, A39066, HUMSPRPA__1, AF053091__1, 及びS80905__1。

【0184】

実施例21

ヒトPRO5725をコードするcDNAの単離

発現配列タグ（EST）DNAデータベース（LIFESeq（商品名）、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を検索し、ニューリチン（Neuritin）と相同性を持つESTを同定した。Incyte ESTクローン番号3705684をLIFESeq（商品名）、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CAから購入し、そのクロンのcDNA（ここでDNA92265-2669と命名する）のcDNA挿入物を得て全体を配列決定した〔Fig 37；配列番号：37〕。

【0185】

全長クローン〔DNA92265-2669；配列番号：37〕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27-29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522-524に見かけの停止シグナルを持つ（Fig 37；配列番号：37）。予測されるポリペプチド前駆体は165アミノ酸長であり、約17, 786の算定分子量及び約8.43のpIを有する。Fig 38（配列番号：38）に示した全長PRO5725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よそのものである。Fig 38に示した全長PRO5725配列の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸1～約アミノ酸35のシグナルペプチド；約アミノ酸141～約アミノ酸157の膜貫通ドメイン；約アミノ酸127～約アミノ酸133のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸77～約アミノ酸88の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位。クローンDNA92265-2669は1999年6月22日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-256が付与された。

【0186】

Fig 38（配列番号：38）に示した全長配列のWU-BLAST2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、PRO5725アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の相同性が明らかになった：RNU88958__1, P__W37859, P__W37858, JC6305, HGS__RE778, HGS__RE777, P__W27652, P__W44088, HGS__RE776, 及びHGS__RE425。

【0187】

実施例22

ヒトPRO1800をコードするcDNAクローンの単離

実施例1に記載したように、phrapを用いて他のEST配列に対してコンセンサスDNA配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでDNA30934と命名する。DNA30934コンセンサス配列に基づいて、1)PCRにより対象とする配列を含むcDNAライブラリを同定するため、及び2)PRO1800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。

PCRプライマー（正方向及び逆方向）を合成した：

正方向PCRプライマー（30934.f1）：

10

5'-GCATAATGGATGTCACCTGAGG-3'（配列番号：121）

逆方向PCRプライマー（30934.r1）：

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

さらに、DNA30934コンセンサス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（30934.p1）：

5'-GAAACGAGGAGGCGGCTCAGTGGTGATCGTGTCCTTCC
ATAGCAGCC-3'（配列番号：123）

【0188】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でPCR増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、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PRO1800遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリの構築のためのRNAはヒト胎児肝臓組織から単離した。

20

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、DNA35672-2508 [Fig 59、配列番号：59]の全長DNA配列；及びPRO1800の誘導タンパク質配列が得られた。

【0189】

DNA35672-2508の全コード化配列がFig 59（配列番号：59）に含まれる。クローンDNA35672-2508は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置36-38に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置870-872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278アミノ酸長であり、29,537ダルトンの見積もり分子量及び約8.97のpIを持つ。Fig 60（配列番号：60）に示した全長PRO344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よそのものである。Fig 60に示した全長PRO344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1～約アミノ酸15のシグナルペプチド；約アミノ酸183～アミノ酸187のN-グリコシル化部位；約アミノ酸43～約アミノ酸49、約アミノ酸80～約アミノ酸86、約アミノ酸191～約アミノ酸197、約アミノ酸213～約アミノ酸219、及び約アミノ酸272～約アミノ酸278のN-ミリスチン化部位；約アミノ酸276～約アミノ酸280の微小体C-末端標的シグナル；及び約アミノ酸162～約アミノ酸199の短鎖アルコールデヒドロゲナーゼ配列。クローンDNA35672-2508は1998年12月15日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203538が付与された。

30

40

【0190】

Fig 60（配列番号：60）に示した全長配列のWU-BLAST2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、PRO1800アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の相同性が明らかになった：HE27_HUMAN, CELF36H9_1, CEF54F3_3, A69621, AP000007_227, UCPA_ECOLI,

50

F 6 9 8 6 8, Y 4 L A _ R H I S N, D H K 2 _ S T R V N, 及び D H G 1 _ B A C M E。

【0191】

実施例 23

ヒト P R O 5 3 9 をコードする c D N A の単離

発現配列タグ (E S T) D N A データベース (L I F E S E Q (商品名)、I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s、P a l o A l t o, C A) を検索し、ショウジョウバエメラノガスターの C o a s t a l - 2 タンパク質と相同性を持つ E S T を同定した。次いで、この E S T 配列を公的データベース (例えば G e n B a n k) 及び企業の E S T データベース (L I F E S E Q (商品名)、I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s、P a l o A l t o, C A) 及びを含む種々の E S T と比較して相同 E S T 配列を同定した。比較はコンピュータプログラム B L A S T 又は B L A S T 2 (A l t s c h u l 等, M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 2 6 6 : 4 6 0 - 4 8 0 (1996)) 及び他の E S T 配列を用いて実施した。比較物は、プログラム「p h r a p」(P h i l G r e e n, U n i v e r s i t y o f W a s h i n g t o n, S e a t t l e, W A) で集団化してコンセンサス D N A 配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここで (c o n s e n s u s) と命名する。

【0192】

構築した (c o n s e n s u s) 配列に基づいて、1) P C R により対象とする配列を含む c D N A ライブラリを同定するため、及び 2) P R O 5 3 9 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オリゴヌクレオチドを合成した。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 - 1000 b p 長の P C R 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 - 55 b p 長である。幾つかの場合には、コンセンサス配列が約 1 - 1.5 k b p より大きいときに付加的なオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからの D N A を、A u s u b e l 等, C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y, のように、P C R プライマー対での P C R によりスクリーニングした。ポジティブライブラリを、次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて対象とする遺伝子をコードするクローンの単離するのに使用した。

P C R プライマー (正方向及び逆方向) を合成した：

正方向 P C R プライマー (h c o s 2. F)：

5' - G A T G A G G C C A T C G A G G C C C T G G - 3' (配列番号：124)

逆方向 P C R プライマー (h c o s 2. R)：

5' - T C T C G G A G C G T C A C C A C C T T G T C - 3' (配列番号：125)

さらに、(c o n s e n s u s) 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 (h c o s 2. P)：

5' - C T G G A T G C T G C C A T T G A G T A T A A G A A T G A G G C C A T C A C A - 3' (配列番号：126)

【0193】

c D N A ライブラリの構築のための R N A はヒト胎児腎臓組織から単離した。c D N A クローンの単離に用いた c D N A ライブラリは、I n v i t r o g e n, S a n D i e g o, C A からのも等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。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、平滑末端で S a l I ヘミキナーゼアダプターに結合させ、N o t I で切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター (p R K B 又は p R K D 等；p R K 5 B は S f i I 部位を含まない p R K 5 D の前駆体である；H o l m e s 等, S c i e n c e, 2 5 3 : 1 2 7 8 - 1 2 8 0 (1991) 参照) に、独特の X h o I 及び N o t I 部位において、所定の方向でクローニングした。

10

20

30

40

50

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、DNA 47465-1561 [Fig 65、配列番号：65]の全長DNA配列；及びPRO 539の誘導タンパク質配列が得られた。

【0194】

DNA 47465-1561の全コード化配列がFig 65（配列番号：65）に含まれる。クローンDNA 47465-1561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186-188に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置2676-2678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830アミノ酸長であり、約95,029ダルトンの見積もり分子量及び約8.26のpIを持つ。Fig 66（配列番号：66）に示した全長PRO 539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よそのものである。Fig 66に示した全長PRO 539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557～約アミノ酸579及び約アミノ酸794～アミノ酸816のロイシンジッパーパターン；約アミノ酸133～約アミノ酸137及び約アミノ酸383～約アミノ酸387のN-グリコシル化部位；約アミノ酸231～約アミノ酸672のキネシン関連タンパク質Kif-4コイルド-コイルドメイン。クローンDNA 47465-1561は1999年2月9日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203661が付与された。

Fig 66（配列番号：66）に示した全長アミノ酸配列のWU-BLAST2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、PRO 539アミノ酸配列と以下に示すDayhoff配列との間に配列相同性が見いだされた：AF019250_1, KIF4_MOUSE, TRHYY_HUMAN, A5614, G02520, MYSP_HUMAN, AF041382_1, A45592, HS125H2_1, 及びHS6802_2。

【0195】

実施例24

ヒトPRO 4316をコードするcDNAクローンの単離

ここでDNA 80935と呼ばれるcDNAクローンを、一次cDNAクローンの5'末端を優勢に示すヒト腎臓cDNAライブラリにおいて、酵母スクリーニングを使用して同定した。次いで、このcDNAを他の公知のEST配列と比較したが、比較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DNA 83527と命名する。

正方向PCRプライマー：

5'-TGGACGACCAAGGAGAAAGCTGC-3'（配列番号：127） 40

逆方向PCRプライマー：

5'-CTCCACTTGTCTCTGGAAGGTGG-3'（配列番号：128）

さらに、DNA 83527コンセンサス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'-GCAAGAGGCAGAAAGCCATGTTAGATGAGCCTCAGGAACAAGCGG-3'（配列番号：129）

【0196】

cDNAライブラリ構築のためのRNAは、ヒト副腎組織から単離した。cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリは、Invitrogen, San Diego, 50

C A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。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、平滑末端でS a l Iヘミキナーゼアダプターに結合させ、N o t Iで切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター（p R K 5 B又はp R K 5 D等；p R K 5 BはS f i I部位を含まないp R K 5 Dの前駆体である；H o l m e s等， S c i e n c e， 2 5 3： 1 2 7 8 - 1 2 8 0 （1 9 9 1）参照）に、独特のX h o I及びN o t I部位において、所定の方向でクローニングした。

【0197】

このスクリーニングから得た全長D N A 9 4 7 1 3 - 2 5 6 1クローンをF i g 6 7 [配列番号：67]に示し、それ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293-295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1934-1936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（F i g 6 8、配列番号：68）は547アミノ酸長である（F i g 6 8）。F i g 6 8に示す全長P R O 4 3 1 6は61, 005ダルトンの見積もり分子量と約6.34のp Iを持つ。F i g 6 8（配列番号：68）に示した全長P R O 4 3 1 6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よそのものである。F i g 6 8に示した全長P R O 4 3 1 6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1～約アミノ酸23のシグナル配列；約アミノ酸42～約アミノ酸60及び約アミノ酸511～約アミノ酸530の膜貫通ドメイン；約アミノ酸259～約アミノ酸263、約アミノ酸362～約アミノ酸366のN-グリコシル化部位；約アミノ酸115～約アミノ酸119、約アミノ酸186～約アミノ酸190、約アミノ酸467～約アミノ酸471、及び約アミノ酸488～約アミノ酸494のカゼインキナーゼI Iリン酸化部位；約アミノ酸255～約アミノ酸261、約アミノ酸304～約アミノ酸310、及び約アミノ酸335～約アミノ酸341のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸7～約アミノ酸11及び約アミノ酸174～約アミノ酸178のアミド化部位。クローンD N A 9 4 7 1 3 - 2 5 1 6は1999年3月9日にA T C Cに寄託され、A T C C寄託番号203835が付与された。F i g 6 8（配列番号：68）に示した全長配列のW U - B L A S T - 2配列アラインメント分析を用いたD a y h o f fデータベース（バージョン35.45 S w i s s P r o t 35）の分析により、P R O 4 3 1 6アミノ酸配列と以下のD a y h o f f配列との間の配列同一性が明らかにされた：Y D A 9 _ S C H P O， S 6 7 4 5 2， S 6 9 7 1 4， D P 2 7 _ C A E E L， S 4 7 0 5 3， C E Y 4 3 F 8 C _ 4， V P 2 _ B R D， 及びS P C C 8 9 5 _ 9。

【0198】

実施例25

ヒトP R O 4 9 8 0をコードするc D N Aクローンの単離

ここでD N A 8 1 5 7 3と呼ばれるc D N Aクローンを、一次c D N Aクローンの5'末端を優勢に示すヒトc D N Aライブラリにおいて、酵母スクリーニングを使用して同定した。次いで、このc D N Aを公的データベース（例えばG e n B a n k）及び企業のE S Tデータベース（L I F E S E Q（商品名）、I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s、P a l o A l t o， C A）からのE S Tと、コンピュータプログラムB L A S T又はB L A S T 2（A l t s c h u l等， M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 266：460-480（1996））を用いて比較した。E S Tは、プログラム「p h r a p」（P h i l G r e e n， U n i v e r s i t y o f W a s h i n g t o n， S e a t t l e， W a s h i n g t o n）で集団化してコンセンサスD N A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D N A 9 0 6 1 3と命名する。

【0199】

ヒト大動脈上皮細胞c D N Aライブラリから、P R O 4 9 8 0の全長コード化配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するために、D N A 9 0 6 1 3配列に基づいて

PCRプライマー（正及び逆）を合成した：

正方向PCRプライマー：

5' - C A A C C G T A T G G G A C C G A T A C T C G - 3' （配列番号：130）

逆方向PCRプライマー：

5' - C A C G C T C A A C G A G T C T T C A T G - 3' （配列番号：131）

ハイブリッド形成プローブ：

5' - G T G G C C C T C G C A G T G C A G G C C T T C T A C G T C C A A T A C A A G T G - 3' （配列番号：132）

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

【0200】

このスクリーニングから得た全長DNA 97003-2649クローンをFig 69 [配列番号：69] に示し、それ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286-288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1900-1902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538アミノ酸長である（Fig 70）。Fig 70に示す全長PRO4980は59, 268ダルトンの見積もり分子量と約8.94のpIを持つ。Fig 70（配列番号：70）に示した全長PRO4980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よそのものである。Fig 70に示した全長PRO4980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1～約アミノ酸36のシグナル配列；約アミノ酸77～約アミノ酸95、約アミノ酸111～約アミノ酸133、約アミノ酸161～約アミノ酸184、約アミノ酸225～約アミノ酸248、約アミノ酸255～約アミノ酸273、約アミノ酸299～約アミノ酸314、約アミノ酸348～約アミノ酸373、約アミノ酸406～約アミノ酸421、約アミノ酸435～約アミノ酸456、及び約アミノ酸480～約アミノ酸497の膜貫通ドメイン；約アミノ酸500～約アミノ酸504のN-グリコシル化部位；約アミノ酸321～約アミノ酸325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13～約アミノ酸19、約アミノ酸18～約アミノ酸24、約アミノ酸80～約アミノ酸86、約アミノ酸111～約アミノ酸117、約アミノ酸118～約アミノ酸124、約アミノ酸145～約アミノ酸151、約アミノ酸238～約アミノ酸244、約アミノ酸251～約アミノ酸257、約アミノ酸430～約アミノ酸436、約アミノ酸433～約アミノ酸439、約アミノ酸448～約アミノ酸454、約アミノ酸458～約アミノ酸464、約アミノ酸468～約アミノ酸474、約アミノ酸475～約アミノ酸481、約アミノ酸496～約アミノ酸502、及び約アミノ酸508～約アミノ酸514のN-ミリスチル化部位；及び約アミノ酸302～約アミノ酸313の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位。クローンDNA 97003-2649は1999年5月11日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-43が付与された。

Fig 70（配列番号：70）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、PRO4980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された：SC59_YEAST, S76857, CELF31F4_12, AC002464_1, NU5M_CHOCR, S59109, S

AY10108__2, AF055482__2, F69049, 及びG70433。

【0201】

実施例26

遺伝子増幅

この実施例は、PRO197-、PRO207-、PRO226-、PRO232-、PRO243-、PRO256-、PRO269-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO206-、PRO264-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO773-、PRO861-、PRO1216-、PRO1686-、PRO1800-、PRO3562-、PRO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO4980-コード化遺伝子が或る種のヒト肺、大腸及び／又は乳癌及び／又は細胞系のゲノムで増幅されることを示す。増幅は遺伝子産物の過剰発現を伴い、ポリペプチドが大腸、肺、乳及び他の癌といった或る種の癌において治療的処置の有用な標的であることを示している。治療薬は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに対するアンタゴニスト、例えばPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに対するマウス-ヒトキメラ、ヒト化又はヒト抗体であってよい。

スクリーニングの出発物質は種々の癌から単離したゲノムDNAである。DNAは、例えば蛍光的に正確に定量化される。ネガティブ対照として、10の正常健常個体からDNAを単離し、それをプールして健常個体における遺伝子コピーのアッセイ対照として使用した（示さず）。5'ヌクレアーゼアッセイ（例えばTaqMan（商品名））及び実時間定量的PCR（例えば、ABI Prizm 7700 Sequence Detection System（商品名）（Perkin Elmer, applied Biosystems Division, Foster City, CA））を、或る種の癌で潜在的に増幅される遺伝子の発見に使用した。結果は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードするDNAがスクリーニングした原発肺又は大腸癌又は癌細胞系又は乳癌細胞系で過剰表現されるか否かの決定に使用した。原発肺癌は、表2に示した型及び段階の腫瘍を持つ個体から得た。表2に列挙した原発腫瘍及びこの実施例を通して参照される細胞系の表示に使用した略語の説明は上記に与えた。

【0202】

TaqMan（商品名）の結果はデルタ（Δ）Ct単位で報告した。1単位は1PCRサ

イクル又は正常に対して約2倍の増幅に相当し、2単位は4倍、3単位は8倍増幅等々に相当する。定量化はプライマー及びPRO197-、PRO207-、PRO226-、PRO232-、PRO243-、PRO256-、PRO269-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO206-、PRO264-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO773-、PRO861-、PRO1216-、PRO1686-、PRO1800-、PRO3562-、PRO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO4980-コード化遺伝子から誘導したTaqMan（商品名）蛍光プローブを用いて得た。最も独特の核酸配列を含むと思われ、最もスプライシングされたイントロンを持たないと思われるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の領域が、プライマー及びプローブ誘導、例えば3-非翻訳領域のために好ましい。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980遺伝子増幅分析に使用されるプライマー及びプローブ（正、逆及びプローブ）の配列は次の通り：

【0203】

PRO197 (DNA 22780-1078) :

22780. tm. f :

5' -GCCATCTGGAAACTTGTGGAC-3' (配列番号: 133) 30

22780. tm. p :

5' -AGAAAGACCAACGACTGGAGAAAGCCCCC-3' (配列番号: 134)

22780. tm. r :

5' -AGCCCCCCTGCACTCAG-3' (配列番号: 135)

PRO207 (DNA 30879-1152) :

30879. tm. f :

5' -GACCTGCCCTCTCCCTCTAGA-3' (配列番号: 136)

30879. tm. p :

5' -CTGCCTGGGCTGTTCACGTGTT-3' (配列番号: 137) 40

30879. tm. r :

5' -GGAAATACTGTATTATA GTGGGATGGA-3' (配列番号: 138)

PRO226 (DNA 33460-1166) :

33460. 3utr-5 :

5' -GCAATAAAGGGAGAAAGAAAGTCCCT-3' (配列番号: 139)

33460. 3utr-probe. rc :

5' -TGACCCGCCCCACCTCAGCCA-3' (配列番号: 140)

33460. 3utr-3b :

5' - G C C T G A G G C T T C C T G C A G T - 3' (配列番号: 1 4 1)

【0 2 0 4】

PRO 2 3 2 (DNA 3 4 4 3 5 - 1 1 4 0) :

3 4 4 3 5. 3 u t r - 5 :

5' - G C C A G G C C T C A C A T T C G T - 3' (配列番号: 1 4 2)

3 4 4 3 5. 3 u t r - p r o b e :

5' - C T C C C T G A A T G G C A G C C T G A G C A - 3' (配列番号: 1 4 3)

3 4 4 3 5. 3 u t r - 3 :

5' - A G G T G T T T A T T A A G G G C C T A C G C T - 3' (配列番号: 1 4 4)

PRO 2 4 3 (DNA 3 5 9 1 7 - 1 2 0 7) :

3 5 9 1 7. t m. f :

5' - C C A G T G C C T T T G C T C C T C T G - 3' (配列番号: 1 4 5)

3 5 9 1 7. t m. p :

5' - T G C C T C T A C T C C C A C C C C C A C T A C C T - 3' (配列番号: 1 4 6)

3 5 9 1 7. t m. r :

5' - T G T G G A G C T G T G G T T C C C A - 3' (配列番号: 1 4 7)

PRO 2 5 6 (DNA 3 5 8 8 0 - 1 1 6 0) :

3 5 8 8 0. 3 u t r - 5 :

5' - T G T C C T C C C G A G C T C C T C T - 3' (配列番号: 1 4 8)

3 5 8 8 0. 3 u t r - p r o b e :

5' - C C A T G C T G T G C G C C C A G G G - 3' (配列番号: 1 4 9)

3 5 8 8 0. 3 u t r - 3 :

5' - G C A C A A A C T A C A C A G G G A A G T C C - 3' (配列番号: 1 5 0)

【0 2 0 5】

PRO 2 6 9 (DNA 3 8 2 6 0 - 1 1 8 0) :

3 8 2 6 0. t m. f :

5' - C A G A G C A G A G G G T G C C T T G - 3' (配列番号: 1 5 1)

3 8 2 6 0. t m. p :

5' - T G G C G G A G T C C C C T C T T G G C T - 3' (配列番号: 1 5 2)

3 8 2 6 0. t m. r :

5' - C C C T G T T T C C C T A T G C A T C A C T - 3' (配列番号: 1 5 3)

PRO 2 7 4 (DNA 3 9 9 8 7 - 1 1 8 4) :

3 9 9 8 7. t m. f :

5' - G G A C G G T C A G T C A G G A T G A C A - 3' (配列番号: 1 5 4)

3 9 9 8 7. t m. p :

5' - T T C G G C A T C A T C T C T T C C C T C T C C C - 3' (配列番号: 1 5 5)

3 9 9 8 7. t m. r :

5' - A C A A A A A A A G G G A A C A A A A T A C G A - 3' (配列番号: 1 5 6)

PRO 3 0 4 (DNA 3 9 5 2 0 - 1 2 1 7) :

3 9 5 2 0. t m. f :

5' - T C A A C C C C T G A C C C T T T C C T A - 3' (配列番号: 1 5 7)

3 9 5 2 0. t m. p :

5' - G G C A G G G G A C A A G C C A T C T C T C C T - 3' (配列番号: 1 5 8)

3 9 5 2 0. t m. r :

5' - G G G A C T G A A C T G C C A G C T T C - 3' (配列番号: 1 5 9)

10

20

30

40

50

【0206】

PRO339 (DNA43466-1225) :

43466. tm. f1 :

5' - GGGCCCTAACCTCATTA CCTTT - 3' (配列番号: 160)

43466. tm. p1 :

5' - TGTCTG CCTCAGCCCCAGGAAGG - 3' (配列番号: 161)

43466. tm. r1 :

5' - TCTGTCCACCATCTTG CCTTG - 3' (配列番号: 162)

PRO1558 (DNA71282-1668) :

71282. tm. f1 :

5' - ACTGCTCCG CCTACTACGA - 3' (配列番号: 163)

71282. tm. p1 :

5' - AGGCATCCTTCGCCGT CCTCA - 3' (配列番号: 164)

71282. tm. r1 :

5' - AAGGCCAAGGTGAGTCCAT - 3' (配列番号: 165)

71282. tm. f2 :

5' - CGAGTGTGTGCGAAACCTAA - 3' (配列番号: 166)

71282. tm. p2 :

5' - TCAGGGTCTACATCAGCCTCCTGC - 3' (配列番号: 167)

)

71282. tm. r2 :

5' - AAGGCCAAGGTGAGTCCAT - 3' (配列番号: 168)

PRO779 (DNA58801-1052) :

58801. tm. f1 :

5' - CCTATTCGCTCCAGCCAA - 3' (配列番号: 169)

58801. tm. p1 :

5' - CGAAGAAAGCACGAACGAATGTCGAGA - 3' (配列番号: 170)

58801. tm. r1 :

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

)

【0207】

PRO1185 (DNA62881-1515) :

62881. tm. f1 :

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

62881. tm. p1 :

5' - AGCGGCGCTCCAGCCTGAAT - 3' (配列番号: 173)

62881. tm. r1 :

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

PRO1245 (DNA64884-1527) :

64887. tm. f1 :

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

64887. tm. p1 :

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

64887. tm. r1 :

5' - GCTCAGCCAAACACTGTCA - 3' (配列番号: 177)

64887. tm. f2 :

5' - GGGGCCCCGTGACAGTGTT - 3' (配列番号: 178)

64887. tm. p2 :

5' - CTGAGCCGAGACTGGAGCATCTACAC - 3' (配列番号: 179)

)

10

20

30

40

50

79)

64887. tm. r2:

5' - GTGGGCAGCGTCTTGTC - 3' (配列番号: 180)

PRO1759 (DNA76531-1701):

76531. tm. f1:

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

76531. tm. p1:

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

76531. tm. r1:

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

【0208】

PRO5775 (DNA96869-2673):

96869. tm. f1:

5' - GGGGAACCATTTCCAACATC - 3' (配列番号: 184)

96869. tm. p1:

5' - CCATTTCAGCAGGGTGAAACCACAG - 3' (配列番号: 185)

96869. tm. r1:

5' - TCTCCGTGACCATGAACCTTG - 3' (配列番号: 186)

PRO7133 (DNA128451-2739):

128451. tm. f1:

5' - TTAGGGAATTTGGTGCTCAA - 3' (配列番号: 187)

128451. tm. p1:

5' - TTGCTCTCCCTTGCTCTTCCCC - 3' (配列番号: 188)

128451. tm. r1:

5' - TCCTGCAGTAGGTATTTTCAGTTT - 3' (配列番号: 189)

PRO7168 (DNA102846-2742):

102846. tm. f1:

5' - GAGCCGGTGCTCAAAAC - 3' (配列番号: 190)

102846. tm. p1:

5' - CCGGGGGTCCCTAGTCCCCCTTC - 3' (配列番号: 191)

102846. tm. r1:

5' - TTTACTGCTGCGCTCCAA - 3' (配列番号: 192)

【0209】

PRO5725 (DNA92265-2669):

92265. tm. f1:

5' - CAGCTGCAGTGTGGGAAT - 3' (配列番号: 193)

92265. tm. p1:

5' - CACTACAGCAAGAAAGCTCGCCAGG - 3' (配列番号: 194)

92265. tm. r1:

5' - CGCACAGAGTGTGCAAGTTAT - 3' (配列番号: 195)

PRO202 (DNA30869):

30869. tm. f:

5' - CGGAAGGAGGCCAACCAC - 3' (配列番号: 196)

30869. tm. p:

5' - CGACAGTGCCATCCCCACCTTCA - 3' (配列番号: 197)

30869. tm. r:

5' - TTCCTTTCTCCATCCCTCCGA - 3' (配列番号: 198)

10

20

30

40

50

PRO 206 (DNA 34405) :

34405. tm. f :

5' - GCATGGCCCCCAACGGT - 3' (配列番号 : 199)

34405. tm. p :

5' - CACGACTCAGTATCCATGCTCTTGACCTTGT - 3' (配列番号 : 200)

34405. tm. r :

5' - TGGCTGTAAATACGCCGTGTTCT - 3' (配列番号 : 201)

【0210】

PRO 264 (DNA 36995) :

36995. 3utr-5 :

5' - CCTGTGAGATTGTGGATGAGAAAGA - 3' (配列番号 : 202)

36995. 3utr-probe :

5' - CCACACCAGCCAGACTCCAGTTGACC - 3' (配列番号 : 203)

36995. 3utr-3 :

5' - GGGTGGTGGCCCTCCTGA - 3' (配列番号 : 204)

PRO 313 (DNA 43320) :

43320. tm. f :

5' - CCATTGTTTCAGACGTTGGTCA - 3' (配列番号 : 205)

43320. tm. p :

5' - CTCCTGTTAACTCTAAGATTCCCTAAGGCATGCTGTGTC - 3' (配列番号 : 206)

43320. tm. r :

5' - ATCGAGATAGCACTGAGTTCTGTCTG - 3' (配列番号 : 207)

PRO 342 (DNA 38649) :

38649. tm. f :

5' - CTCGGCTCGCGAAACTACA - 3' (配列番号 : 208)

38649. tm. p :

5' - TGCCCGCACACAGACTTCTACTGCCCTG - 3' (配列番号 : 209)

38649. tm. r :

5' - GGAGCTACATATCATCCTTGGACA - 3' (配列番号 : 210)

38649. tm. f2 :

5' - GAGATAAACGACGGGAAGCTCTAC - 3' (配列番号 : 211)

38649. tm. p2 :

5' - ACGCCTACGTCTCCTACAGCGACTGC - 3' (配列番号 : 212)

38649. tm. r2 :

5' - GCTGCGGCTTTAGGATGAAGT - 3' (配列番号 : 213)

【0211】

PRO 542 (DNA 56505) :

56505. tm. f1 :

5' - CCTTGGCCTCCATTCTGTCTC - 3' (配列番号 : 214)

56505. tm. p1 :

5' - TGCTGCTCAGGCCCATGCTATGAGT - 3' (配列番号 : 215)

10

20

30

40

50

5)

56505. tm. r1:

5' - GGGTGTAGTCCAGAACAGCTAGAGA - 3' (配列番号: 216)

PRO773 (DNA48303):

48303. tm. f1:

5' - CCCATTCCAGCTTCTTG - 3' (配列番号: 217)

48303. tm. p1:

5' - CTCAGAGCCAAAGGCTCCCCAGA - 3' (配列番号: 208)

48303. tm. r1:

5' - TCAAGGACTGAACCATGCTAGA - 3' (配列番号: 219)

PRO861 (DNA50798):

50798. tm. f1:

5' - ACCATGTACTACGTGCCAGCTCTA - 3' (配列番号: 220)

50798. tm. p1:

5' - ATTCTGACTTCTCTGTGATTTTGGCATGTGG - 3' (配列番号: 221)

50798. tm. r1:

5' - GGCTTGAACTCTCTCTTATAGGAGTGT - 3' (配列番号: 222)

【0212】

PRO1216 (DNA66489):

66489. tm. f1:

5' - CTAAGTGCACCAGCTCCAAAGAA - 3' (配列番号: 223)

66489. tm. p1:

5' - TCACAGCACCTCTCCAGGCACCTCAA - 3' (配列番号: 224)

66489. tm. r1:

5' - TCTGGGCCACAGATCCACTT - 3' (配列番号: 225)

PRO1686 (DNA80896):

80896. tm. f1:

5' - GCTCAGCCCTAGACCCCTGACTT - 3' (配列番号: 226)

80896. tm. p1:

5' - CAGGCTCAGCTGCTGTCTAAACCTCAGTAATG - 3' (配列番号: 227)

80896. tm. r1:

5' - CGTGGACAGCAGGAGCCT - 3' (配列番号: 228)

PRO1800 (DNA35672-2508):

35672. tm. f1:

5' - ACTCGGGATTCTCTGCTGTT - 3' (配列番号: 229)

35672. tm. p1:

5' - GGCCTGTCTCTGTGTTCTCA - 3' (配列番号: 230)

35672. tm. r1:

5' - AGGCCTTTACCCAAGGCCACAAC - 3' (配列番号: 231)

【0213】

PRO3562 (DNA96791):

96791. tm. f1:

5' - GACCCACGCGCTACGAA - 3' (配列番号: 232)

96791. tm. p1:

10

20

30

40

50

5' - C G G T C T C C T T C A T G G A C G T C A A C A G - 3' (配列番号: 2 3 3)

9 6 7 9 1. t m. r 1 :

5' - G G T C C A C G G T T C T C C A G G T - 3' (配列番号: 2 3 4)

PRO 9 8 5 0 (DNA 5 8 7 2 5) :

5 8 7 2 5. t m. f 1 :

5' - A T G A T T G G T A G G A A A T G A G G T A A A G T A C T - 3' (配列番号: 2 3 5)

5 8 7 2 5. t m. p 1 :

5' - C C A T C T T T C T C T G G C A C A T T G A G G A A C T G - 3' (配列番号: 2 3 6) 10

5 8 7 2 5. t m. r 1 :

5' - T G A T C T A G A A C T T A A A C T T T G G A A A A C A A C - 3' (配列番号: 2 3 7)

PRO 5 3 9 (DNA 4 7 4 6 5 - 1 5 6 1) :

. t m. f 1 :

5' - T C C C A C C A C T T A C T T C C A T G A A - 3' (配列番号: 2 3 8)

4 7 4 6 5. t m. p 1 :

5' - A T T G T C C T G A G A T T C G A G C A A G A - 3' (配列番号: 2 3 9)

4 7 4 6 5. t m. r 1 :

5' - C T G T G G T A C C C A A T T G C C G C C T T G T - 3' (配列番号: 2 4 0) 20

【0 2 1 4】

PRO 4 3 1 6 (DNA 9 4 7 1 3 - 2 5 6 1) :

9 4 7 1 3. t m. f 1 :

5' - G G T C A C C T G T G G G A C C T T - 3' (配列番号: 2 4 1)

9 4 7 1 3. t m. p 1 :

5' - T G C A C C T G A C A G A C A A A G C - 3' (配列番号: 2 4 2)

9 4 7 1 3. t m. r 1 :

5' - T C C C T C A C T C C C C T C C C T C C T A G T - 3' (配列番号: 2 4 3) 30

PRO 4 9 8 0 (DNA 9 7 0 0 3 - 2 6 4 9) :

9 7 0 0 3. t m. f 1 :

5' - A A G C C T T T G G G T C A C A C T C T - 3' (配列番号: 2 4 4)

9 7 0 0 3. t m. p 1 :

5' - T G G T C C A C T G T C T C G T T C A - 3' (配列番号: 2 4 5)

9 7 0 0 3. t m. r 1 :

5' - C G G A G C T T C C T G T C C C T T T T T C T G - 3' (配列番号: 2 4 6) 40

【0 2 1 5】

5' ヌクレアーゼアッセイ反応は蛍光PCRベースの技術であり、実時間での増幅監視のためのTaq DNAポリメラーゼ酵素の5' エキソヌクレアーゼ活性を使用する。PCR反応に典型的な単位複製配列の生成に2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用した。第3のオリゴヌクレオチド、又はプローブは、2つのPCRプライマーの間に位置する核酸配列を検出するために設計された。プローブはTaq DNAポリメラーゼ酵素により非伸展性であり、レポーター蛍光染料及び消光剤蛍光染料で標識される。2つの染料がプローブ上に接近して位置する場合、レポーター染料からのレーザー誘導発光は消光染料によって消光される。増幅反応の間、プローブはTAQ DNAポリメラーゼ酵素によりテンプレート依存的方式で切断される。得られたプローブ断片は溶液中に解離し、放出されたレポーター染料からのシグナルは第2のフルオロホアからの消光効果を受けない。レポー 50

ター染料の一分子は、新たに合成された各分子について標識され、非消光レポーター染料の検出がデータの定量的解釈の基礎を提供する。

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

5'ヌクレアーゼアッセイデータは、最初はCt又は境界サイクルで表現される。これは、レポーターシグナルが蛍光のバックグラウンドを越えて蓄積されるサイクルとして定義される。 ΔCt 値は核酸試料における特定の標的配列の種発コピー相対数の定量的尺度として使用した。

10

表2は、本発明のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980化合物のスクリーニングに用いた種々の原発腫瘍の段階(stage)、T段階及びN段階を記載する。

【0216】

20

表 6
原発肺及び結腸腫瘍プロフィール

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

10

20

30

40

50

【0217】

DNA調製：

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

細胞培養溶解：

細胞を洗浄し、チップ当たり 7.5×10^8 の濃度でトリプシン化し、 4°C で5分間1000rpmで遠心分離してペレット化し、次いで1/2容量のPBS再遠心で洗浄した。ペレットを3回洗浄し、懸濁細胞を回収して2xPBSで洗浄した。次いで細胞を10mLのPBSに懸濁させた。バッファーC1を 4°C で平衡化させた。Q u i a g e nプロテアーゼ#19155を6.25mlの冷ddH₂Oで最終濃度20mg/mlまで希釈して 4°C で平衡化させた。10mLのG2バッファーを、Q u i a g e nRNAseAストック(100mg/ml)を200μg/mlの最終濃度まで希釈して調製した。

バッファーC1(10ml、 4°C)及びddH₂O(40ml、 4°C)を、次いで10mlの細胞懸濁物に添加し、反転させて混合し、氷上で10分間インキュベートした。細胞核をB e c k m a nスイングバケットロータで 4°C において2500rpmで15分間遠心分離することによりペレット化した。上清を捨て、核をボルテックスしながら2mlの

バッファー C1 (4℃) 及び 6 ml の ddH₂O に懸濁し、1 秒後に 4℃ において 2500 rpm で 15 分間遠心分離した。次いで核を残りのバッファー中にチップ当たり 200 µl を用いて再懸濁した。G2 バッファー (10 ml) を懸濁した核に添加しながら緩いボルテックスを適用した。バッファー添加が完了したら、強いボルテックスを 30 秒間適用した。QuiaGen プロテアーゼ (200 µl 上記のように調製) を添加し、50℃ で 60 分間インキュベートした。インキュベーション及び遠心分離を、溶解物が透明になるまで繰り返した (例えば、さらに 30-60 分間インキュベートし、4℃ で 10 分間 3000 x g でペレット化する)。

【0218】

固体ヒト腫瘍試料の調製及び溶解：

腫瘍試料を秤量し 50 ml のコニカル管に配して氷上に保持した。加工は調製当たり 250 mg の組織未満に制限した (1 チップ/調製)。プロテアーゼ溶液を 6.25 ml の冷 ddH₂O 中に最終濃度 20 mg/ml まで希釈することにより新たに調製して 4℃ で貯蔵した。DNAse A を最終濃度 200 mg/ml まで希釈することにより G2 バッファー (20 ml) を調製した (100 mg/ml のストックから)。エアロゾルの吸入を避けるために層流フード内でポリトロン of の大きなチップを用いて、腫瘍組織を 19 ml の G2 バッファー中で 60 秒間均一化し、室温に保持した。試料間で、各々 2 L の ddH₂O で 2 x 30 秒間、次いで G2 バッファー (50 ml) でスピンさせることによりポリトロンを透明化した。組織がジェネレータチップ上に存在する場合は、装置を分解して清浄化した。

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

【0219】

ヒト血液調製及び溶解：

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

【0220】

透明化溶解物の精製：

(1) ゲノム DNA の単離：

ゲノム DNA を 10 ml の QBT バッファーで平衡化した (最大チップ調製当たり 1 試料)。QF 溶離バッファーを 50℃ で平衡化した。試料を 30 秒間ボルテックスし、次いで平衡化チップに負荷して重力により排液した。チップを 2 x 15 ml の QC バッファーで洗浄した。DNA を、30 ml のシラン化したオートクレーブ 30 ml Cortex 管に 15 ml の QF バッファー (50℃) で溶離した。イソプロパノール (10.5 ml) を

10

20

30

40

50

各試料に添加し、管をパラフィンで被覆し、DNAが沈殿するまで繰り返し反転させて混合した。試料を、SS-34ロータで4℃において15,000rpmで10分間遠心分離してペレット化した。ペレット位置をマークして上清を捨て、10mlの70%エタノール(4℃)を添加した。試料を、SS-34ロータで4℃において10,000rpmで10分間遠心分離して再度ペレット化した。ペレット位置をマークして上清を捨てた。次いで管を乾燥棚の各面に置き、37℃で10分間乾燥させたが、使用の過剰乾燥には注意した。

乾燥後、ペレットを1.0mlのTE(pH8.5)に溶解し、50℃に1-2時間置いた。試料を4℃に終夜保持して溶解を続けた。次いでDNA溶液を、ツベルクリンシリンジ上に26ゲージの針を具備する1.5ml管に移した。DNAを剪断するために移行を5x繰り返した。次いで試料を50℃に1-2時間置いた。 10

【0221】

(2) ゲノムDNAの定量及び遺伝子増幅アッセイのための調製：

各管のDNAレベルを1:20希釈(5μl DNA+95μl ddH₂O)での標準的なA₂₆₀、A₂₈₀分光分析により、Beckman DU640分光光度計の0.1ml石英キュベットを用いて定量した。A₂₆₀/A₂₈₀比率は1.8-1.9の範囲であった。次いで各DNA試料をTE(pH8.5)中に約200ng/mlまで希釈した。最初の材料が高濃度(約700ng/μl)である場合、材料を50℃に再懸濁するまで数時間置いた。

次いで、希釈した材料(20-600ng/ml)に対して、製造者の指示を以下のように改変して蛍光DNA定量化を実施した。これは、Hoeffer DyNA Quant 200蛍光計を約15分間暖めて実施した。Hoechst染料作業溶液(#H33258、10μl、使用の12時間以内に調製)を100mlの1xTNEバッファーに希釈した。2mlキュベットを蛍光計溶液で満たし、機械に配し、機械をゼロ調節した。pGEM3Zf(+)(2μl、ロット#360851026)を2mlの蛍光計溶液に添加して200単位で校正した。次いで、さらに2μlのpGEM3Zf(+)DNAを試験し、400+/-10単位で読みを確認した。次いで各試料を少なくとも3回読んだ。3試料が互いに10%以内であることが見られたとき、それらの平均をとり、この値を定量化値として用いた。 20

次いで、蛍光測定で決定した濃度を、各試料をddH₂O中に10ng/μlまで希釈するのに用いた。これは、1回のTaqManプレートアッセイについて全てのテンプレート試料について同時に行い、500-1000アッセイを実施するのに十分な材料で行った。試料は、Taqman(商品名)プライマー及びプローブで3回試験し、B-アクトン及びGAPDHともに正常なヒトDNAを持ちテンプレート対照を持たない単一のプレート上にある。希釈した試料を用いたが、試験DNAから減算した正常ヒトDNAのCT値は+/-1CTであった。希釈した、ロット定性化したゲノムDNAを、1.0mlアリコートで-80℃において保存した。続いて遺伝子増幅アッセイに使用するアリコートは、4℃で保存した。各1mlのアリコートは、8-9プレート又は64試験に十分である。 30

【0222】

遺伝子増幅アッセイ：

本発明のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980化合物を以下の原発腫瘍でスクリーニングし、得られたΔCt値を表3に報告する。 40

【0223】

表 7A
肺及び大腸原発腫瘍及び細胞系モデルにおけるΔCt値

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
HF-000 631	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 641	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 643	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 840	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.39	1.51	---	---
HF-000 842	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.24	---	---	---
HBL100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MB435s	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T47D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MB468	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MB175	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
MB361														
BT20														
MCF7														
SKBR3														
SW480		1.85	2.14									1.87 1.56		
SW620		1.96	2.67			1.23						1.13 1.38 1.21		
Colo320		1.09										1.18		
HT29			2.15			1.58						1.03 1.90		
HM7			1.23									1.33		

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
WtDr	---	---	2.21	---	---	1.35	---	---	---	---	---	1.35	---	---
HCT116	---	1.83	2.13	---	---	1.35	---	---	---	---	---	2.24 1.70	---	---
SKCO1	---	1.13	1.94	---	---	---	---	---	---	---	---	1.11	---	---
SW403	---	---	1.81	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LSI74T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.18	---	---
Colo205	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HCT15	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HCC 2998	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
KM12	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A549	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

10

20

30

40

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
Calu-1														
Calu-6														
H157														
H441														
H460														
SKMES1														
SW900														
H522														1.10
H810														
SRCC 1094														
SRCC 1095														
SRCC 1096														

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
SRCC 1097														
SRCC 1098														
SRCC 1099														
SRCC 1100														
SRCC 1101														
HF-000 545														
HF-000 499														
HF-000 539														
HF-000 575														
HF-000 698														

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
HF-000 756	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 762	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 789	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 795	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.01	---	---	---
HF-000 811	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 755	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT2	---	---	1.15	---	---	---	---	---	---	---	---	1.83 2.41 2.28 2.91	1.73	---
CT3	---	1.29	1.26	---	---	---	---	---	---	---	---	1.06 1.14 1.72	---	---
CT8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.01 1.03 1.20	---	---

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
CT10	---	1.33	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.03	---	---
CT12	---	---	1.20	---	---	---	---	---	---	---	---	1.05 1.15	---	---
CT14	---	---	1.38	---	1.14	---	---	---	---	---	---	1.01 1.14 1.20	---	---
CT15	---	1.26	1.07	---	---	---	---	---	---	---	---	1.14 1.12 1.05	---	1.00
CT16	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.14 1.22	---	---
CT17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.12 1.17	---	---
CT1	---	1.10	---	2.41	---	---	---	---	---	---	---	1.02 1.69 1.54 1.28 1.15	---	---
CT4	---	1.13	1.11	2.05	---	---	---	---	---	---	---	1.19 1.22 1.12	---	---
												1.62		

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
CT5	---	1.14	1.12	1.59	1.17	---	---	---	---	---	---	2.02 2.24 2.32 2.36 1.75	---	---
CT6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.17	---	---
CT7	---	---	---	1.00	---	---	---	---	---	---	---	1.00 1.04	---	---
CT9	---	---	---	1.13	---	---	---	---	---	---	---	1.05	---	---
CT11	---	1.32	1.35	1.92	---	---	---	---	---	---	---	1.27 1.73 1.82 1.89 1.93 1.43	---	---
CT18	---	---	---	1.29	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT25	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT28	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT35	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 611	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

【 0 2 3 1 】

10

20

30

40

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
HF-000 613														
HF-00 1291														
HF-00 1293														
HF-00 1294										1.50				
HF-00 1295														
HF-00 1296										2.88				
HF-00 1297														
HF-00 1299										1.37				
HF-00 1300														
LT7			1.12				1.04			1.08				
LT27														

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
LT13	1.40	1.26 1.29	1.10 1.10	---	1.05	---	1.27	---	1.29	1.04	---	1.69 2.79 2.42 1.44	---	3.84
LT1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT3	1.50	1.14	1.59	---	1.08	---	---	---	---	1.17	---	1.65 1.19 1.17	1.01	---
LT4	---	---	1.11	---	---	---	---	1.24	---	---	---	---	---	---
LT9	1.25	---	1.36	---	---	---	1.80	---	---	1.03	---	1.27	---	---
LT12	---	---	---	2.40	1.20	---	1.14	---	1.15	1.26	---	1.03 2.09 1.99 1.20	---	---
LT22	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT30	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.58	---
LT33	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
LT21	1.10	1.12	1.17	---	---	---	---	---	---	---	---	1.00	---	---
LT1a	---	---	1.39	---	---	---	---	---	---	---	---	1.46 1.04	---	---
LT6	1.39	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.75 1.25	---	---
LT10	1.03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.50	---	---
LT11	1.65	1.33 1.59	1.28 1.01	---	1.34	---	1.14	---	1.51	1.39	---	1.77 1.39 1.48	---	---
LT15	1.22	1.22 1.18	1.04	1.86	2.34 1.72	---	1.36	---	1.34	---	---	2.50 3.73 3.31 1.89	---	1.01
LT16	---	---	---	---	1.24 1.64	---	---	1.00	1.00	---	---	1.89 1.50 1.38	---	1.98
LT17	1.68	1.32 1.57	1.26 1.57	1.35	1.27	---	1.42	---	1.68	1.63	---	1.08 1.95 1.51 1.50	---	---
LT18	---	---	---	1.04	---	---	---	1.61	---	---	---	1.00	---	---

【 0 2 3 4 】

10

20

30

40

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
LT19	---	1.16 1.58	1.08 1.25	1.21	1.39	---	1.60	---	1.15	---	---	3.49 3.21 3.73	---	---
LT26	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.66	---
LT28	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT29	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT31	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 854	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 855	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 856	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 831	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 832	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 550	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
551														
HF-000 733														
HF-000 716														

表 7B
肺及び大腸原発腫瘍及び細胞系モデルにおけるΔCt値

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
HF-000 631	1.97 1.70			1.43										
HF-000 641	1.90 1.87				1.17 1.03									
HF-000 643	1.13 1.21													
HF-000 840	1.11 3.64 3.55		2.11	2.65	1.82 2.20 1.99					1.35				
HF-000 842		2.56 2.42 2.12 2.88		1.73						1.13				
HBL100											1.20			
MB435s														
T47D														
MB468														
MB175														
MB361														

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
BT20	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MCF7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.14	---	---	---
SKBR3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SW480	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.35	---	---	---
SW620	---	---	---	---	---	---	---	---	1.03	2.09	1.17 1.13	---	---	---
Colo320	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.31	---	---
HT29	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	3.08 2.59 3.24 2.68 2.77	1.97	---	---
HM7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
WiDr	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	3.35 3.15 2.59 2.94 3.03 2.99	---	---	2.42
HCT116	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2.09 2.01	---	---	1.71

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
											2.12 1.87 1.98 2.07			
SKCO1											1.71 2.00 1.97 1.64 1.82			
SW403											1.73 1.15 1.64 1.17 1.51 1.28			1.14
LS174T										1.13	1.41			1.16
Colo205												1.41		
HCT15														
HCC 2998														
KM12														
A549														

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
Calu-1										1.21				
Calu-6														
H157														
H441										1.65	1.15	1.51	1.71	
H460														
SKMES1														
SW900														
H522													1.02	
H810														
SRCC 1094														
SRCC 1095														
SRCC 1096														
SRCC 1097														
SRCC														

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
1098														
SRCC 1099														
SRCC 1100														
SRCC 1101														
HF-000 545														
HF-000 499														
HF-000 539														
HF-000 575														
HF-000 698														
HF-000 756														
HF-000		2.01			1.26									

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
762		1.04			1.04									
HF-000 789	---	1.30 1.12	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 795	1.32	---	1.08	---	1.02 1.28 1.10	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 811	---	1.82 1.80	1.09	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 755	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT2	---	---	---	---	---	---	1.21	---	1.75	3.04	---	---	2.40 2.35	---
CT3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.21	---	---	1.52 1.39	---
CT8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.21	---	---	1.55	---
CT10	---	---	---	---	---	---	1.06	---	---	1.81	1.13	---	1.97 1.33	---
CT12	---	---	---	---	---	---	1.06	---	---	1.41	1.08 1.17	---	1.36	1.18
CT14	---	---	---	---	---	---	1.29	---	---	1.61	1.41	---	1.75	---

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
													1.17	
CT15	---	---	---	---	---	---	1.32	---	---	1.41	---	1.04	1.75	---
CT16	---	---	---	---	---	---	1.59	---	---	1.39	---	1.37	1.11	---
CT17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.19	---	1.34	1.11	---
CT1	---	---	---	---	---	---	---	---	1.28	1.61	---	---	1.09 1.22	---
CT4	---	---	---	---	---	---	---	---	1.57	1.58	---	---	1.16	---
CT5	---	---	---	---	---	---	1.23	---	2.01	2.29	1.06	---	1.95	1.21
CT6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.20	---	---	---	---
CT7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.14	---
CT9	---	---	---	---	---	---	---	---	1.56	1.00	1.03	---	1.00	---
CT11	---	---	---	---	---	---	---	---	2.12	2.27	---	---	1.88	---
CT18	---	---	---	---	---	---	1.33	---	---	---	---	---	---	---
CT25	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT28	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT35	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
611														
HF-000 613	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1291	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1293	---	2.12 2.09	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1294	---	2.15 1.99	---	---	---	---	---	---	---	1.57	---	---	---	---
HF-00 1295	---	1.99 2.15	---	---	1.10	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1296	1.51	4.62 4.78	1.71	---	1.22	---	---	---	---	3.15	---	---	---	---
HF-00 1297	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1299	---	1.92 1.95	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1300	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT7	---	---	---	---	---	1.50	---	---	---	1.25	1.11	---	---	1.15

10

20

30

40

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
						1.79								
LT27	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT13	---	---	---	---	---	1.64	---	---	---	1.34 2.85 2.12	1.38	2.98	1.33	---
LT1	---	---	---	---	---	1.29 1.15	---	---	---	---	---	---	---	---
LT2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT3	---	---	---	---	---	1.67 1.66	---	1.82	---	1.89 1.71	---	---	---	---
LT4	---	---	---	---	---	1.21	---	1.43	---	---	---	---	---	---
LT9	---	---	---	---	---	1.30	---	1.13	1.19	1.51	---	---	---	---
LT12	---	---	---	---	---	1.73	---	---	1.03	2.02 1.74	1.31 1.41	---	1.18 1.38	1.02
LT22	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT30	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT33	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.00	---

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
LT21	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.00	1.19	---	---	---
LT1a	---	---	---	---	---	1.26 1.24	---	1.28	---	1.72 1.29	---	---	1.19	---
LT6	---	---	---	---	---	1.75 1.34	---	1.62	---	2.01	---	---	---	---
LT10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2.02 1.06	2.79	---	---	---
LT11	---	---	---	---	---	1.31	---	---	---	1.08 1.88 1.93	---	---	1.03	---
LT15	---	---	---	---	---	1.63	---	---	---	2.12 3.16 2.80	---	---	1.28	---
LT16	---	---	---	---	---	1.30	---	---	2.48	1.05	1.32	2.19	1.33	---
LT17	---	---	---	---	---	1.74	---	1.72	---	1.12 2.26 1.77	1.00 1.45	---	---	---
LT18	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.21	---	---	---
LT19	---	---	---	---	---	1.98	---	---	2.10	3.47 3.02	1.35	---	---	---

10

20

30

40

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
LT26														
LT28														
LT29														
LT31														
HF-000 854														
HF-000 855														
HF-000 856														
HF-000 831														
HF-000 832														
HF-000 550														
HF-000 551														
HF-000 733														

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
HF-000 716														

表 7C
肺及び大腸原発腫瘍及び細胞系モデルにおけるΔCt値

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
HF-000631	1.61						
HF-000641							
HF-000643							
HF-000840	1.61		1.87			2.34	1.01
HF-000842	1.11						
HBL100							
MB435s							
T47D							
MB468							
MB175							
MB361							
BT20							
MCF7							
SKBR3							
SW480							
SW620			1.08				

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
Colo320	---	1.16	---	---	---	---	---
HT29	---	---	---	---	---	---	---
HM7	---	---	---	---	---	---	---
WiDr	---	---	---	---	---	---	---
HCT116	---	---	1.26 1.15	---	---	---	---
SKCO1	---	---	---	---	---	---	---
SW403	---	---	---	---	---	---	---
LS174T	---	---	---	---	---	---	---
Colo205	---	---	---	---	---	---	---
HCT15	---	---	---	---	---	---	---
HCC2998	---	---	---	---	---	---	---
KM12	---	---	---	---	---	---	---
A549	---	---	---	---	---	---	---
Calu-1	---	---	---	---	---	---	---
Calu-6	---	---	---	---	---	---	---
H157	---	---	---	---	---	---	---

10

20

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
H441							
H460							
SKMES1							
SW900							
H522			2.93				
H810							
SRCC 1094							
SRCC 1095							
SRCC 1096							
SRCC 1097							
SRCC 1098							
SRCC 1099							
SRCC							

【 0 2 5 1 】

10

20

30

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
1100							
SRCC 1101							
HF-000545			1.05				
HF-000499							
HF-000539			2.10				
HF-000575							
HF-000698							
HF-000756							
HF-000762							
HF-000789							
HF-000795	1.13					1.06	
HF-000811							
HF-000755							
CT2	1.38	1.50					
CT3					1.17		
CT8							

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
CT10	1.32	---	---	1.10	1.16	---	---
CT12	1.20	---	---	---	1.19	---	---
CT14	---	1.62	---	---	---	---	---
CT15	---	1.48 1.08	1.01	1.23	1.03	---	---
CT16	---	---	---	1.49	---	---	---
CT17	---	---	---	---	---	---	---
CT1	1.50	---	---	1.00	---	---	---
CT4	1.75	---	---	1.25	---	---	---
CT5	2.32	1.10	---	1.49	---	---	---
CT6	1.13	---	---	1.04	---	---	---
CT7	---	---	---	1.15	---	---	---
CT9	---	---	---	---	---	---	---
CT11	2.76	1.20	---	1.35	1.12	---	---
CT18	---	---	---	---	---	---	---
CT25	---	---	---	---	---	---	---

【 0 2 5 3 】

10

20

30

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
CT28	---	---	---	---	---	---	---
CT35	---	---	---	---	---	---	---
HF-000611	---	---	---	---	---	---	---
HF-000613	---	---	---	---	---	---	---
HF-001291	---	---	---	---	---	---	---
HF-001293	---	---	---	---	---	---	---
HF-001294	1.69	---	---	---	---	---	1.14
HF-001295	---	---	---	---	---	---	---
HF-001296	3.08	---	---	---	---	---	1.87
HF-001297	---	---	---	---	---	---	---
HF-001299	1.11	---	---	---	---	---	1.12
HF-001300	---	---	---	---	---	---	---
LT7	---	---	---	---	---	---	---
LT27	---	---	---	---	---	---	---
LT13	1.42	1.27 2.18 2.22	3.94 3.57	1.19	1.64 1.08	---	---

【 0 2 5 4 】

10

20

30

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
		1.70					
LT1	---	---	---	---	---	---	---
LT2	---	---	---	---	---	---	---
LT3	---	---	---	---	---	---	---
LT4	---	---	---	---	---	---	---
LT9	---	---	---	---	---	---	---
LT12	---	1.34 2.28 2.03	---	1.32	1.25	---	---
LT22	---	---	---	---	---	---	---
LT30	---	---	---	---	---	---	---
LT33	---	---	---	---	---	---	---
LT8	---	---	---	---	---	---	---
LT21	---	1.30	---	---	1.32	---	---
LT1a	---	---	---	---	---	---	---
LT6	---	---	---	---	---	---	---
LT10	---	---	---	---	---	---	---

【 0 2 5 5 】

10

20

30

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
LT11	1.12	1.03 1.65 1.59	---	1.35	---	---	---
LT15	1.67	1.70 2.23 1.93	---	1.61	1.78 1.10	---	---
LT16	---	1.00 1.05 1.09	2.64 2.25	---	---	---	---
LT17	1.59	1.94 1.63	---	---	1.94 1.01	---	---
LT18	1.07	1.12	---	---	---	---	---
LT19	---	2.51 2.18	---	---	1.16	---	---
LT26	---	---	---	---	---	---	---
LT28	---	---	---	---	---	---	---
LT29	---	---	---	---	---	---	---
LT31	---	---	---	---	---	---	---
HF-000854	---	---	---	---	---	---	---
HF-000855	---	---	---	---	---	---	---

10

20

PRO4980	---	---	---	---	---	---	---
PRO4316	---	---	---	---	---	---	---
PRO539	---	---	---	---	---	---	---
PRO9850	---	---	---	---	---	---	---
PRO3562	---	---	---	---	---	2.03	1.83
PRO1800	---	---	---	---	---	---	---
PRO1686	---	---	---	---	---	---	---
原発腫瘍	HF-000856	HF-000831	HF-000832	HF-000550	HF-000551	HF-000733	HF-000716

10

20

30

40

50

【0257】

議論と結論：

PRO197 (DNA22780-1078)：

種々の腫瘍におけるDNA22780-1078についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは原発肺腫瘍：LT13、LT3、LT9、LT21、LT6、LT10、LT11、LT15及びLT17におけるPRO197ポリペプチドをコードする核酸DNA22780-1078の有意な増幅を示す。

DNA22780-1078の増幅は種々の肺腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA22780-1078にコードされるタンパク質 (PRO197) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0258】

PRO207 (DNA30879-1152)：

種々の腫瘍におけるDNA30879-1152についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは (1) 原発肺腫瘍：LT13、LT3、LT21、LT11、LT15、LT17及びLT19； (2) 原発大腸腫瘍：CT3、CT10、CT15、CT1、CT4、CT5及びCT11；及び (3) 大腸腫瘍細胞系：SW480、SW620、Colo

320、HCT116及びSKCO1におけるPRO207ポリペプチドをコードする核酸DNA30879-1152の有意な増幅を示す。

DNA30879-1152の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA30879-1152にコードされるタンパク質（PRO207）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0259】

PRO226（DNA33460-1166）：

種々の腫瘍におけるDNA33460-1166についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは（1）原発肺腫瘍：LT7、LT13、LT3、LT4、LT9、LT21、LT1a、LT11、LT15、LT17及びLT19；（2）原発大腸腫瘍：CT2、CT3、CT12、CT14、CT15、CT4、CT5及びCT11；及び（3）大腸腫瘍細胞系：SW480、SW620、HT29、HM7、Widr、HCT116、SKCO1及びSW403におけるPRO226ポリペプチドをコードする核酸DNA33460-1166の有意な増幅を示す。

DNA33460-1166の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA33460-1166にコードされるタンパク質（PRO226）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0260】

PRO232（DNA34435-1140）：

種々の腫瘍におけるDNA34435-1140についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは（1）原発肺腫瘍：LT12、LT15、LT17、LT18及びLT19；及び（2）原発大腸腫瘍：CT1、CT4、CT5、CT7、CT9、CT11及びCT18におけるPRO232ポリペプチドをコードする核酸DNA34435-1140の有意な増幅を示す。

DNA34435-1140の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA34435-1140にコードされるタンパク質（PRO232）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0261】

PRO243（DNA35917-1207）：

種々の腫瘍におけるDNA35917-1207についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは（1）原発肺腫瘍：LT13、LT3、LT12、LT11、LT15、LT16、LT17及びLT19；及び（2）原発大腸腫瘍：CT14及びCT5におけるPRO243ポリペプチドをコードする核酸DNA35917-1207の有意な増幅を示す。

DNA35917-1207の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA35917-1207にコードされるタンパク質（PRO243）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0262】

PRO256（DNA35880-1160）：

種々の腫瘍におけるDNA35880-1160についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは原発大腸腫瘍細胞系：SW620、HT29、Widr、及びHCT116におけるPRO256ポリペプチドをコードする核酸DNA35880-1160の有意な

10

20

30

40

50

増幅を示す。

DNA 35880-1160の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 35880-1160にコードされるタンパク質 (PRO 256) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0263】

PRO 269 (DNA 38260-1180) :

種々の腫瘍におけるDNA 38260-1180についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは原発肺腫瘍: LT7、LT13、LT9、LT12、LT11、LT15、LT17及びLT19におけるPRO 269ポリペプチドをコードする核酸DNA 38260-1180の有意な増幅を示す。 10

DNA 38260-1180の増幅は種々の肺腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 38260-1180にコードされるタンパク質 (PRO 269) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0264】

PRO 274 (DNA 39987-1184) :

種々の腫瘍におけるDNA 39987-1184についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは原発肺腫瘍: LT4、LT16及びLT18におけるPRO 274ポリペプチドをコードする核酸DNA 39987-1184の有意な増幅を示す。 20

DNA 39987-1184の増幅は種々の肺腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 39987-1184にコードされるタンパク質 (PRO 274) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0265】

PRO 304 (DNA 39520-1217) :

種々の腫瘍におけるDNA 39520-1217についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは原発肺腫瘍: LT13、LT12、LT11、LT15、LT16、LT17及びLT19におけるPRO 304ポリペプチドをコードする核酸DNA 39520-1217の有意な増幅を示す。 30

DNA 39520-1217の増幅は種々の肺腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 39520-1217にコードされるタンパク質 (PRO 304) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0266】

PRO 339 (DNA 43466-1225) :

種々の腫瘍におけるDNA 43466-1225についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは原発肺腫瘍: LT7、LT13、LT3、LT9、LT12、LT11及びLT17におけるPRO 339ポリペプチドをコードする核酸DNA 43466-1225の有意な増幅を示す。 40

DNA 43466-1225の増幅は種々の肺腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 43466-1225にコードされるタンパク質 (PRO 339) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0267】

PRO 1558 (DNA 71282-1668) :

50

種々の腫瘍におけるDNA 71282-1668についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは(1)原発肺腫瘍: HF-000842、HF-001294、HF-001296、及びHF-001299; 及び(2)大腸腫瘍中心HF-000795におけるPRO1558ポリペプチドをコードする核酸DNA 71282-1668の有意な増幅を示す。

DNA 71282-1668の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 71282-1668にコードされるタンパク質(PRO1558)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

10

【0268】

PRO779 (DNA 58801-1052) :

種々の腫瘍におけるDNA 58801-1052についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは(1)原発肺腫瘍: LT13、LT3、LT9、LT12、LT21、LY1-a、LT6、LT10、LT11、LT15、LT16、LT17、LT18、LT19及びHF-000840; (2)原発大腸腫瘍: CT2、CT3、CT8、CT10、CT12、CT14、CT15、CT16、CT17、CT1、CT4、CT5、CT6、CT7、CT9及びCT11; 及び(3)大腸腫瘍細胞系: SW480、SW620、Colo320、HT29、HM7、Widr、HCT116、HCT116、SKCO1及びLS174TにおけるPRO779ポリペプチドをコードする核酸DNA 58801-1052の有意な増幅を示す。

20

DNA 58801-1052の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 58801-1052にコードされるタンパク質(PRO779)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0269】

PRO1185 (DNA 62881-1515) :

種々の腫瘍におけるDNA 62881-1515についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは(1)原発肺腫瘍: LT3及びLT30; 及び(2)原発大腸腫瘍: CT2におけるPRO1185ポリペプチドをコードする核酸DNA 62881-1515の有意な増幅を示す。

30

DNA 62881-1515の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 62881-1515にコードされるタンパク質(PRO1185)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0270】

PRO1245 (DNA 64884-1527) :

種々の腫瘍におけるDNA 64884-1527についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは(1)原発肺腫瘍: LT13、LT15及びLT16; (2)肺腫瘍細胞系H522; 及び(3)原発大腸腫瘍: CT15におけるPRO1245ポリペプチドをコードする核酸DNA 64884-1527の有意な増幅を示す。

40

DNA 64884-1527の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 64884-1527にコードされるタンパク質(PRO1245)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0271】

PRO1759 (DNA 76531-1701) :

50

種々の腫瘍におけるDNA76531-1701についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは(1)原発肺腫瘍：HF-000840及びHF-001296；(2)原発大腸腫瘍：HF-000795におけるPRO1759ポリペプチドをコードする核酸DNA76531-1701の有意な増幅を示す。

DNA76531-1701の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA76531-1701にコードされるタンパク質(PRO1759)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0272】

10

PRO5775 (DNA96869-2673) :

種々の腫瘍におけるDNA96869-2673についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは(1)原発肺腫瘍：HF-000631、HF-000641、HF-000643、HF-000840、HF-000842、HF-001293、HF-001294、HF-001295、HF-001296及びHF-001299；(2)原発大腸腫瘍：HF-000792、HF-000789及びHF-000811におけるPRO5775ポリペプチドをコードする核酸DNA96869-2673の有意な増幅を示す。

DNA96869-2673の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA96869-2673にコードされるタンパク質(PRO5775)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

20

【0273】

PRO7133 (DNA128451-2739) :

種々の腫瘍におけるDNA128451-2739についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは(1)原発肺腫瘍：HF-000840及びHF-001296；及び(2)原発大腸腫瘍：HF-000795及びHF-000811におけるPRO7133ポリペプチドをコードする核酸DNA128451-2739の有意な増幅を示す。

30

DNA128451-2739の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA128451-2739にコードされるタンパク質(PRO7133)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0274】

PRO7168 (DNA102846-2742) :

種々の腫瘍におけるDNA102846-2742についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは原発肺腫瘍：HF-000631、HF-000840及びHF-000842におけるPRO7168ポリペプチドをコードする核酸DNA102846-2742の有意な増幅を示す。

40

DNA102846-2742の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA102846-2742にコードされるタンパク質(PRO7168)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0275】

PRO5725 (DNA92265-2669) :

種々の腫瘍におけるDNA92265-2669についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは(1)原発肺腫瘍：HF-000641、HF-000840、HF-001

50

295及びHF-001296；及び（2）原発大腸腫瘍中心：HF-000762及びHF-000795におけるPRO5725ポリペプチドをコードする核酸DNA92265-2669の有意な増幅を示す。

DNA92265-2669の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA92265-2669にコードされるタンパク質（PRO5725）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0276】

PRO202（DNA30869）：

種々の腫瘍におけるDNA30869についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは原発肺腫瘍：LT7、LT13、LT1、LT3、LT4、LT9、LT12、LT1a、LT6、LT11、LT15、LT16、LT17、及びLT19におけるPRO202ポリペプチドをコードする核酸DNA30869の有意な増幅を示す。 10

DNA30869の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA30869にコードされるタンパク質（PRO202）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0277】

PRO206（DNA34405）：

種々の腫瘍におけるDNA34405についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは原発大腸腫瘍：CT2、CT10、CT12、CT14、CT15、CT16、CT5及びCT18におけるPRO206ポリペプチドをコードする核酸DNA34405の有意な増幅を示す。 20

DNA34405の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA34405にコードされるタンパク質（PRO206）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0278】

PRO264（DNA36995）：

種々の腫瘍におけるDNA36995についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは原発肺腫瘍：LT3、LT4、LT9、LT1a、LT6及びLT17におけるPRO264ポリペプチドをコードする核酸DNA36995の有意な増幅を示す。 30

DNA36995の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA36995にコードされるタンパク質（PRO264）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0279】

PRO313（DNA43320）：

種々の腫瘍におけるDNA43320についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは（1）原発肺腫瘍：LT9、LT12、LT16及びLT19；（2）原発大腸腫瘍：CT2、CT1、CT4、CT5、CT9及びCT11；及び（3）大腸腫瘍細胞系SW620におけるPRO313ポリペプチドをコードする核酸DNA43320の有意な増幅を示す。 40

DNA43320の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA43320にコードされるタンパク質（PRO313）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと 50

予測される。

【0280】

PRO342 (DNA38649) :

種々の腫瘍におけるDNA38649についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは (1) 原発肺腫瘍: LT7、LT13、LT3、LT9、LT12、LT21、LT1a、LT6、LT10、LT11、LT15、LT16、LT17、LT19、HF-000840、HF-000842、HF-001294、及びHF-001296; (2) 原発大腸腫瘍: CT2、CT3、CT8、CT10、CT12、CT14、CT15、CT16、CT17、CT1、CT4、CT5、CT6、CT9、及びCT11; (3) 肺腫瘍細胞系: Calu-1及びH441; 及び(4) 大腸腫瘍細胞系: SW620及びLS174TにおけるPRO342ポリペプチドをコードする核酸DNA38649の有意な増幅を示す。

DNA38649の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA38649にコードされるタンパク質 (PRO342) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0281】

PRO542 (DNA56505) :

種々の腫瘍におけるDNA56505についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは (1) 原発肺腫瘍: LT7、LT13、LT12、LT21、LT10、LT16、LT17、LT18、及びLT19; (2) 原発大腸腫瘍: CT10、CT12、CT14、CT5及びCT9; (3) 肺腫瘍細胞系H441; (4) 大腸腫瘍細胞系: SW480、SW620、HT29、Widr、HCT116、SKCO1、SW403、及びLS174T; 及び(5) 乳房腫瘍細胞系: HBL100及びMCF7におけるPRO542ポリペプチドをコードする核酸DNA56505の有意な増幅を示す。

DNA56505の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA56505にコードされるタンパク質 (PRO542) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0282】

PRO773 (DNA48303) :

種々の腫瘍におけるDNA48303についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは (1) 原発肺腫瘍: LT13及びLT16; (2) 原発大腸腫瘍: CT15、CT16、及びCT17; (3) 大腸腫瘍細胞系: Colo320、HT29及びColo205; 及び(4) 肺腫瘍細胞系H441におけるPRO773ポリペプチドをコードする核酸DNA48303の有意な増幅を示す。

DNA48303の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA48303にコードされるタンパク質 (PRO773) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0283】

PRO861 (DNA50798) :

種々の腫瘍におけるDNA50798についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは (1) 原発肺腫瘍: LT13、LT12、LT8、LT1a、LT11、LT15及びLT16; (2) 原発大腸腫瘍: CT2、CT3、CT8、CT10、CT12、CT14、CT15、CT16、CT17、CT1、CT4、CT5、CT7、CT9、及びCT

10

20

30

40

50

11 ; (3) 肺腫瘍細胞系 : H 4 4 1 及び H 5 2 2 における P R O 8 6 1 ポリペプチドをコードする核酸 D N A 5 0 7 9 8 の有意な増幅を示す。

D N A 5 0 7 9 8 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、D N A 5 0 7 9 8 にコードされるタンパク質 (P R O 8 6 1) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0284】

P R O 1 2 1 6 (D N A 6 6 4 8 9) :

種々の腫瘍における D N A 6 6 4 8 9 についての $\Delta C t$ 値を表 7 B に報告する。 $\Delta C t > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7 B は (1) 原発肺腫瘍 : L T 7 及び L T 1 2 ; (2) 原発大腸腫瘍 : C T 1 2 及び C T 1 5 ; 及び (3) 大腸腫瘍細胞系 : W i D r、H C T 1 1 6、S W 4 0 3 及び L S 1 7 4 T における P R O 1 2 1 6 ポリペプチドをコードする核酸 D N A 6 6 4 8 9 の有意な増幅を示す。

D N A 6 6 4 8 9 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、D N A 6 6 4 8 9 にコードされるタンパク質 (P R O 1 2 1 6) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0285】

P R O 1 6 8 6 (D N A 8 0 8 9 6) :

種々の腫瘍における D N A 8 0 8 9 6 についての $\Delta C t$ 値を表 7 C に報告する。 $\Delta C t > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7 C は (1) 原発肺腫瘍 : L T 1 3、T L 1 1、L T 1 5、L T 1 7、L T 1 8、H F - 0 0 8 4 0、H F - 0 0 0 8 4 2、H F - 0 0 1 2 9 4 及び H F - 0 0 1 2 9 9 ; (2) 原発大腸腫瘍 : C T 2、C T 1 0、C T 1 2、C T 1、C T 4、C T 5、C T 6 及び C T 1 1 ; 及び (3) 大腸腫瘍細胞系 : H F - 0 0 0 7 9 5 における P R O 1 6 8 6 ポリペプチドをコードする核酸 D N A 8 0 8 9 6 の有意な増幅を示す。

D N A 8 0 8 9 6 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、D N A 8 0 8 9 6 にコードされるタンパク質 (P R O 1 6 8 6) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0286】

P R O 1 8 0 0 (D N A 3 5 6 7 2 - 2 5 0 8) :

種々の腫瘍における D N A 3 5 6 7 2 - 2 5 0 8 についての $\Delta C t$ 値を表 7 C に報告する。 $\Delta C t > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7 C は (1) 原発肺腫瘍 : L T 1 3、L T 1 2、L T 2 1、L T 1 1、L T 1 5、L T 1 6、L T 1 6、L T 1 7、L T 1 8 及び L T 1 9 ; (2) 原発大腸腫瘍 : C T 2、C T 1 4、C T 1 5、C T 5 及び C T 1 1 ; 及び (3) 大腸腫瘍細胞系 : C o l o 3 2 0 における P R O 1 8 0 0 ポリペプチドをコードする核酸 D N A 3 5 6 7 2 - 2 5 0 8 の有意な増幅を示す。

D N A 3 5 6 7 2 - 2 5 0 8 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、D N A 3 5 6 7 2 - 2 5 0 8 にコードされるタンパク質 (P R O 1 8 0 0) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0287】

P R O 3 5 6 2 (D N A 9 6 7 9 1) :

種々の腫瘍における D N A 9 6 7 9 1 についての $\Delta C t$ 値を表 7 C に報告する。 $\Delta C t > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7 C は (1) 原発肺腫瘍 : L T 1 3、L T 1 6 及び H F - 0 0 0 8 4 0 ; (2) 原発大腸腫瘍 : C T 1 5 ; (3) 大腸腫瘍中心 H F - 0 0 0 5 3 9 ; (4) 胚珠用細胞系 h 5 2 2 ; (5

）大腸腫瘍細胞系 SW620 及び HCT116；（６）乳房腫瘍 HF-000545；及び（７）精巣腫瘍：HF-000733 及び HF-000716 における PRO3562 ポリペプチドをコードする核酸 DNA96791 の有意な増幅を示す。

DNA96791 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA96791 にコードされるタンパク質（PRO3562）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0288】

PRO9850 (DNA58725) :

種々の腫瘍における DNA58725 についての ΔCt 値を表 7C に報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7C は（１）原発肺腫瘍：LT13、LT12、LT11 及び LT15；及び（２）原発大腸腫瘍：CT10、CT15、CT16、CT1、CT4、CT5、CT6、CT7 及び CT11 における PRO9850 ポリペプチドをコードする核酸 DNA58725 の有意な増幅を示す。 10

DNA58725 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA58725 にコードされるタンパク質（PRO9850）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0289】

PRO539 (DNA47465-1561) :

種々の腫瘍における DNA47465-1561 についての ΔCt 値を表 7C に報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7C は（１）原発肺腫瘍：LT13、LT12、LT21、LT15、LT17 及び LT19；及び（２）原発大腸腫瘍：CT3、CT10、CT12、CT15 及び CT11 における PRO539 ポリペプチドをコードする核酸 DNA47465-1561 の有意な増幅を示す。

DNA47465-1561 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA47465-1561 にコードされるタンパク質（PRO539）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。 30

【0290】

PRO4316 (DNA94713-2561) :

種々の腫瘍における DNA94713-2561 についての ΔCt 値を表 7C に報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7C は（１）原発肺腫瘍 HF-000840；及び（２）原発大腸腫瘍中心 HF-000795 における PRO4316 ポリペプチドをコードする核酸 DNA94713-2561 の有意な増幅を示す。

DNA94713-2561 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA94713-2561 にコードされるタンパク質（PRO4316）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。 40

【0291】

PRO4980 (DNA97003-2649) :

種々の腫瘍における DNA97003-2649 についての ΔCt 値を表 7C に報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7C は（１）原発肺腫瘍：HF-000840、HF-001294、HF-001296 及び HF001299 における PRO4980 ポリペプチドをコードする核酸 DNA97003-2649 の有意な増幅を示す。 50

DNA 97003-2649の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 97003-2649にコードされるタンパク質 (PRO4980) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0292】

実施例27

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局在化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及び局在化、特定mRNA合成及び染色体マッピングにおける追跡に有用である。 10

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

【0293】

³³ P-リボプローブ合成

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

2.0 µl の5x転写バッファー

1.0 µl のDTT (100 mM)

2.0 µl のNTP混合物 (2.5 mM: 10 µl; 10 mMのGTP, CTP及びATP+10 µlのH₂O)

1.0 µl のUTP (50 µM)

1.0 µl のRNAsin 30

1.0 µl のDNAテンプレート (1 µg)

1.0 µl のH₂O

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

管を37℃で1時間インキュベートし、1.0 µlのRQ1 DNaseを添加し、次いで37℃で15分間インキュベートした。90 µlのTE (10 mMトリス pH 7.6 / 1 mMのEDTA pH 8.0) を添加し、混合物をDE81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を用いてスピンスさせた (6分間)。濾過ユニットを第2の管に変換し、プログラム2を用いてスピンスさせた (3分間)。最終回収スピンの後、100 µlのTEを添加した。1 µlの最終生成物をDE81紙にピペットし6 mlのBiofluor IIで数えた。 40

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

【0294】

³³ 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℃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 50

． 5 x S S C で 5 分間室温で洗浄した (2 5 m l 2 0 x S S C + 9 7 5 m l S Q H₂O) 。 0 . 5 μ g / m l のプロテイナーゼ中、 3 7 ° C で 1 0 分間の脱タンパクの後 (2 5 0 m l の予備加熱 R N a s e 無し R N a s e バッファー中の 1 0 m g / m l ストック 1 2 . 5 μ l) 、切片を 0 . 5 x S S C で 1 0 分間室温で洗浄した。切片を、 7 0 % 、 9 5 % 、 1 0 0 % 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、 S Q H₂O 中に配置し、 2 x S S C で室温において各々 5 分間 2 回リンスした。切片を 2 0 μ g / m l のプロテイナーゼ K (2 5 0 m l の R N a s e 無し R N a s e バッファー中 1 0 m g / m l を 5 0 0 μ l ; 3 7 ° C 、 1 5 分間) - ヒト胚又は 8 x プロテイナーゼ K (2 5 0 m l の R N a s e バッファー中 1 0 0 μ l 、 3 7 ° C 、 3 0 分間) - ホルマリン組織で脱タンパクした。 10
続く 0 . 5 x S S C でのリンス及び脱水は上記のように実施した。

【 0 2 9 5 】

C . プレハイブリッド化： スライドを B o x バッファー (4 x S S C 、 5 0 % ホルムアミド) - 飽和濾紙で列を作ったプラスチックボックスに並べた。組織を 5 0 μ l のハイブリッド形成バッファー (3 . 7 5 g デキストラン硫酸 + 6 m l S Q H₂O) で被覆し、ボルテックスし、キャップを外して 2 分間マイクロ波で加熱した。氷上で冷却した後、 1 8 . 7 5 m l のホルムアミド、 3 . 7 5 m l の 2 0 x S S C 及び 9 m l の S Q H₂O を添加し、組織を良くボルテックスし、 4 2 ° 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 x 1 0 ⁶ c p m のプローブ及び 1 . 0 μ l の t R N A (5 0 m g / m l ストック) を 9 5 ° 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 4 8 μ 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、 5 0 μ l の ³²P 混合物をスライド上のプレハイブリッド 5 0 μ l に添加した。 20
スライドを 5 5 ° C で終夜インキュベートした。

E . 洗浄： 洗浄は、 2 x 1 0 分間、 2 x S S C 、 E D T A で室温で実施し (4 0 0 m l の 2 0 x S S C + 1 6 m l の 0 . 2 5 M E D T A 、 V f = 4 L) 、次いで R N a s e A 処理を 3 7 ° C で 3 0 分間行った (2 5 0 m l R N a s e バッファー中 1 0 m g / m l を 5 0 0 μ l = 2 0 μ g / m l) 。スライドを 2 x 1 0 分間、 E D T A で室温において洗浄した。緊縮性洗浄条件は次の通り： 5 5 ° C で 2 時間、 0 . 1 x S S C 、 E D T A (2 0 m l の 2 0 x S S C + 1 6 m l の E D T A 、 V f = 4 L) 。

【 0 2 9 6 】

F . オリゴヌクレオチド

インサイツハイブリッド形成は、ここに開示した D N A のうち 6 つについて実施した。これらの分析に使用したオリゴヌクレオチドは以下の通り：

(1) P R O 1 9 7 (D N A 2 2 7 8 0 - 1 0 7 8) :

2 2 7 8 0 . p 1 :

5 ' - G A A T T C T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G C C G C C A C C G C C G T G C T A C T G A - 3 ' (配列番号 : 2 4 7)

2 2 7 8 0 . p 2 :

5 ' - C T A T G A A A T T A A C C C T C A C T A A A G G G A T G C A G G C G G C T G A C A T T G T G A - 3 ' (配列番号 : 2 4 8) 40

(2) P R O 2 0 7 (D N A 3 0 8 7 9 - 1 1 5 2) :

3 0 8 7 9 . p 1 :

5 ' - G G A T T C T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G C T C C T G C G C C T T T C C T G A A C C - 3 ' (配列番号 : 2 4 9)

3 0 8 7 9 . p 2 :

5 ' - C T A T G A A A T T A A C C C T C A C T A A A G G G A G A C C C A T C C T T G C C C A C A G A G - 3 ' (配列番号 : 2 5 0)

(3) P R O 2 2 6 (D N A 3 3 4 6 0 - 1 1 6 6) :

3 3 4 6 0 . p 1 :

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

G G G A T G T C A A C - 3' (配列番号: 2 5 1)

3 3 4 6 0. p 2:

5' - C T A T G A A A T T A A C C C T C A C T A A A G G G A G T T T G G G C C T
C G G A G C A G T G - 3' (配列番号: 2 5 2)

【0 2 9 7】

(4) PRO 2 3 2 (DNA 3 4 4 3 5 - 1 1 4 0):

3 4 4 3 5 0 p 1:

5' - G G A T C C T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G C A C C C A C G C G T
C C G G C T G C T T - 3' (配列番号: 2 5 3)

3 4 4 3 5. p 2:

5' - C T A T G A A A T T A A C C C T C A C T A A A G G G A C G G G G G A C A C
C A C G G A C C A G A - 3' (配列番号: 2 5 4)

(5) PRO 2 4 3 (DNA 3 5 9 1 7 - 1 2 0 7):

3 5 9 1 7. p 1:

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

- 3' (配列番号: 2 5 5)

3 5 9 1 7. p 2:

5' - C T A T G A A A T T A A C C C T C A C T A A A G G G A G G G G G C C C T T
G G T G C T G A G T - 3' (配列番号: 2 5 6)

(6) PRO 3 4 2 (DNA 3 8 6 4 9):

3 8 6 4 9. p 1:

5' - G G A T T C T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G C G G G G C C T T C A
C C T G C T C C A T C - 3' (配列番号: 2 5 7)

3 8 6 4 9. p 2:

5' - C T A T G A A A T T A A C C C T C A C T A A A G G G A G C T G C G T C T G
G G G G T C T C C T T - 3' (配列番号: 2 5 8)

【0 2 9 8】

7. 結果

(1) PRO 1 9 7 (DNA 2 2 7 8 0 - 1 0 7 8):

炎症を起こした虫垂の良性だが反応性の間質細胞全体に中程度から強いシグナルが見られた。これらの細胞は典型的に顕著な核小体を持つ大きな核を有している。哺乳動物の管腺癌における腫瘍細胞の小さなサブセット (< 5%) 全体、及び腫瘍周辺の間質細胞に強いシグナルが存在した。ポジティブ細胞の組織学的外観は、隣接するネガティブ細胞と顕著に相違しなかった。壊死性組織に隣接する腎性細胞癌において、腫瘍及び／又は間質細胞全体に非常に集中したポジティブシグナルが見られた。肺性腺癌にはシグナルは見られなかった。

【0 2 9 9】

(2) PRO 2 0 7 (DNA 3 0 8 7 9 - 1 1 5 2) (A p o 2 L 相同体):

軟骨芽細胞腫全体、及び他の柔組織肉腫全体に低レベルの発現が観察された。他の全ての組織はネガティブであった。

試験したヒト胎児組織 (E 1 2 - E 1 6 週) は以下を含む: 胎盤、臍帯、肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、肺、心臓、大血管、食道、胃、小腸、脾臓、胸腺、膵臓、脳、眼、脊髄、体壁、骨盤及び下肢。

試験した成体ヒト組織は以下を含む: 腎臓 (正常及び末期)、副腎、心筋、脾臓、リンパ節、膵臓、肺、皮膚、眼 (網膜を含む)、膀胱、及び肝臓 (正常、慢性及び急性不全)。

試験した非ヒト霊長類組織は以下を含む:

チンパンジー組織: 唾液腺、胃、甲状腺、副甲状腺、舌、胸腺、卵巣、及びリンパ節。

アカゲザル組織: 大脳皮質、海馬、小脳、及び陰茎。

(3) PRO 2 2 6 (DNA 3 3 4 6 0 - 1 1 6 6) (E G F 相同体):

10

20

30

40

50

胎児の眼において発達中の外眼筋の直近の緩い結合組織における細胞全体に特異的なシグナルが観察された。

【0300】

(4) PRO232 (DNA34435-1140) (幹細胞抗原相同体) :

ヒト及び胎児組織での発現パターン

前立腺上皮、膀胱上皮における強い発現と、気管支上皮における低レベルの発現が見られた。低レベルの発現は、その他の中で、骨、血液、軟骨肉腫、成体心臓及び胎児肝臓を含む多くの部位で見られた。他の全ての組織はネガティブであった。

腎盂輸尿管の尿路管上皮及びアカゲザル陰茎の尿道における発現

発現は、前立腺の上皮、膀胱の尿路管の表層、腎盂を内張する尿路管、及び輸尿管の尿路 (2つの実験のうち1つ) で観察された。アカゲザルの尿道はネガティブであったが; このことが尿道による発現を本当に欠いているのか、あるいはアカゲザル組織と交差反応するプローブの欠陥によるのかは不明である。前立腺及び膀胱での発見は、同位体検出技術を用いて既に記載したものに類似していた。この抗原に対するmRNAの発現は、前立腺上皮特異的ではなかった。抗原は尿路誘導組織の有用なマーカーとして提供されうる。尿路上皮の表面の有糸分裂後細胞における発現も、それが特異的な幹細胞マーカーを表現していないであろうことを示唆し、これは基底上皮において特異的に発現されると予想される。

【0301】

前立腺及び膀胱癌におけるPSCA

様々な程度の前立腺及び膀胱癌の6つの試料、各々が正常な腎盂、輸尿管、膀胱、前立腺 (精嚢を含む) の一試料、及び陰茎尿路、及びLNCaP及びPC3前立腺癌細胞系のペレットを分析した: 各試料はPSCAに対するセンス及びアンチセンスプローブ、及びベーターアクチンのみに対するアンチセンスプローブ (mRNA完全性コントロール) でハイブリダイゼーションした。

腎盂、輸尿管、及び膀胱の正常な移行性上皮、及び陰茎尿路の真直な円柱状の上皮は全てPSCAに対してポジティブであった。正常な前立腺の腺性上皮はPSCAに対するポジティブ性が変化し; 中程度から強いポジティブ性の腺が同じ組織片内のネガティブ腺の直近で生じた。全てのポジティブな上皮 (膀胱及び前立腺) は、移行性又は前立腺の上皮でより強い発現を示した。精嚢上皮及び他の全ての組織 (神経、血管、繊維支質、腎臓実質細胞) はPSCAを発現しない。

前立腺腫瘍細胞は一般にPSCA-ネガティブであり; LNCaP及びPC3細胞及び6つの組織試料中の3つにおいて検出可能な発現は記録されず; 中程度から弱い発現が6つの前立腺腫瘍試料の中の3つのみで生じた。PSCA-ネガティブな前立腺腫瘍試料は十分なmRNA保存に一致するベーターアクチン発現を示した。

乳頭移行性癌細胞 (6つのケースのうち5つ) は、PSCAに対して中程度から強くポジティブであった。6つの腫瘍のうちの1つ (侵襲性の低分化TCC) は集中したポジティブ細胞のみを示した。

【0302】

更なる前立腺及び膀胱癌試料におけるPSCA及びPSA発現

前立腺癌の13試料 (全ては中程度から僅かに分化した腺癌)、腫瘍を持たない前立腺の一試料、及び様々な程度の膀胱移行性細胞癌 (8つの分化が進んだもの、3つの中程度に分化したもの、2つの僅かしか分化していないもの) を、PSCAに対するセンス及びアンチセンスプローブ及びベーターアクチンのみに対するアンチセンスプローブ (mRNA完全性コントロール) でハイブリダイゼーションした。さらなる対照として、14の前立腺ケースを、以前の実験からの前立腺CAの6切片でしたように、PSAに対するアンチセンスプローブでハイブリダイゼーションした。

1つの前立腺癌のケース (#127) は、PSCAの均一で高い発現を示した。2つのケースの前立腺CA (#399、#403) は、集中した高レベルのPSCAのみを示し、1つのケース (#124) は集中した中程度の発現を示し、全ては腺から腺で顕著に変動

10

20

30

40

50

した。これら3つのケースの殆どの領域、及び他の9つのケースの全ての領域は、PSCA発現が均一に低いか存在しなかった。低PSCAシグナルはmRNA分解によるものではなく：PSCAに対してネガティブな前立腺CAの全てのケースはPSA及び／又はベータアクチンに対してポジティブであった。

膀胱の11の分化が進んだ又は中程度に分化が進んだ移行性癌は全て、PSCAに対して均一に中程度又は強くポジティブであった。ともに分化の進んでいないTCCである2つの腫瘍は、ネガティブであるか弱いポジティブであった。

これらの結果は、既に記載した実験を立証する。これら2つの実験において、19の前立腺CAケースが試験され：19のうち1つが均一で高い発現を示し；19のうち6つが腫瘍細胞の一部における集中した高い発現を示し；19のうち12がネガティブ又は弱冠のポジティブであった。これに対して、これら2つの実験は、19の膀胱TCCケースを含み、その大部分は均一で中程度又は強いPSCAポジティブであった。16の分化が進んだ又は中程度に分化したTCCケースは全てポジティブであり；3つの僅かに分化したケースはネガティブ又は弱冠のポジティブであった。

【0303】

(5) PRO243 (DNA35917-1207) :

大腿骨頭と寛骨臼との間（股関節）を形成する発達中の滑膜関節の開裂線で微かな発現が観察された。この発現パターンが関節形成の他の部位で観察された場合、それはコルネリア・ド・ランゲ症候群で観察される顔面及び四肢の異常を示しうる。

ヒト胎児顔面、頭部、四肢及びマウス胚の更なる切片も試験した。マウス組織のいずれでも発現は見られなかった。発現はアンチセンスプローブでのみ見られた。

発現は、骨膜間葉における発達中の四肢及び顔面骨に隣接して観察された。発現は高度に特異的で、多くは血管形成中の領域に隣接していた。分布は、コルネリア・ド・ランゲ症候群において観察される骨格異常と一致していた。また発現は、胎児脳における発達中の側頭葉及び後頭葉でも観察されたが、他では観察されなかった。さらに、発達中の内耳の神経節で発現が見られた。

【0304】

(6) PRO342 (DNA38649) :

このDNAは多くの組織及び多くの細胞型で発現された。胎児では、発現は網膜の内面、後根神経節、小腸上皮、胸腺髄質及び脾臓で見られた。成人では、発現は尿細管の上皮、肝臓の肝細胞及び膀胱で見られた。また発現は浸潤している炎症細胞及び骨肉腫にも存在した。チンパンジーでは、発現は胃腸上皮、唾液腺及び胸腺で見られた。試験した他の組織は特異的な発現の証拠を示さなかった。

試験した胎児組織（E12-E16週）は以下を含む：肝臓、腎臓、副腎、肺、心臓、大血管、食道、胃、脾臓、生殖腺、脊髄、及び体壁。試験したヒト組織は以下を含む：肝臓、腎臓、胃、膀胱、前立腺、胚、肝細胞癌、骨肉腫、肝炎及び肝硬変。試験したチンパンジー組織は以下を含む：副腎、神経、胸腺、副腎胃腸粘膜及び唾液腺。試験したアカゲザル組織はアカゲザル脳を含む。

さらに、肺の8つの扁平及び8つの腺癌を試験した。発現は全ての腫瘍で観察されたが、発現レベルは変動した。シグナル強度に基づいて、腫瘍を高及び低発現に分類した。3つの腫瘍（2つの腺癌：96-20125及び96-3686及び1つの扁平癌95-6727）を高発現として分類した。また中程度の発現が正常な良性気管支上皮及びリンパ性浸潤に見られ、この所見は、このレセプターが殆どの検体で広く発現されるという以前の観察と一致する。

【0305】

実施例12

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO26

4、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードする核 10
酸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。

ここに開示されるような全長又は成熟「PRO197」、「PRO207」、「PRO226」、「PRO232」、「PRO243」、「PRO256」、「PRO269」、「PRO274」、「PRO304」、「PRO339」、「PRO1558」、「PRO779」、「PRO1185」、「PRO1245」、「PRO1759」、「PRO5775」、「PRO7133」、「PRO7168」、「PRO5725」、「PRO202」、「PRO206」、「PRO264」、「PRO313」、「PRO342」、「PRO542」、「PRO773」、「PRO861」、「PRO1216」、「PRO1686」、「PRO1800」、「PRO3562」、「PRO9850」、「PRO539」、「PRO4316」又は「PRO4980」ポリペプチド又はその断片の 20
コード化配列を含むDNAは、ヒト組織cDNAライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリにおける同種DNA（PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド、PRO533、PRO214、PRO240、PRO211、PRO230、PRO261、PRO246又はPRO317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 30
のためのプローブとして用いられ得る。

【0306】

ハイブリッド形成及びいずれかのライブラリを含むフィルターの洗浄は、以下の高い緊縮性条件下で実施される。放射性標識PRO197-、PRO207-、PRO226-、PRO232-、PRO243-、PRO256-、PRO269-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO206-、PRO264-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO773-、PRO861-、PRO1216-、PRO1686-、PRO1800-、PRO3562-、PRO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO4980-誘導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、5xSSC、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、0.1xSSC及び0.1%SDS水溶液中で、42℃で実施した。 40

全長天然配列PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO8 50

61、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードするDNAと所望の同一性を持つ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。

【0307】

実施例29

大腸菌におけるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの発現
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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の調製を例示する。

対象とするPROポリペプチドをコードする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）、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980コード化領域、ラムダ転写終結区、及びargU遺伝子を含む。

【0308】

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、細胞を採集して遠心分離できる。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、可溶化PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、P

RO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980タンパク質を金属キレート化カラムを用いてタンパク質を緊密に結合させる条件下で精製した。

PRO197、PRO207、PRO1185、PRO5725、PRO202、及びPRO3562は、以下の手法を用いて、大腸菌においてポリHisタグ形態で発現させた。PRO197、PRO207、PRO1185、PRO5725、PRO202、及びPRO3562をコードするDNAを選択したPCRプライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いでPCR増幅された、ポリHisタグ配列を発現ベクターに結合させ、それを株52 (W3110 fuhA (tonA) lon galE rpoH ts (httpRts) cl1pP (lacIq)) に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用した。形質転換体は、最初に50mg/mlのカルベニシリンを含有するLB中、30℃で振盪しながら3-5のO.D. 600に達するまで成長させた。ついで培地をCRAP培地 (3.57gの(NH₄)₂SO₄、0.71gのクエン酸ナトリウム・2H₂O、1.07gのKCl、5.36gのDifco酵母抽出物、500mL水中の5.36gのSheffield hycase SF、並びに110mMのMPOS、pH7.3、0.55% (w/v)のグルコース及び7mMのMgSO₄の混合で調製) 中に50-100倍希釈し、30℃で振盪させながら約20-30時間成長させた。試料を取り出してSDS-PAGEにより発現を確認し、バルク培地を遠心分離して細胞のペレットとした。細胞細胞ペレットを精製及び再折りたたみまで凍結させた。

10

20

【0309】

0.5から1Lの発酵 (6-10gペレット) からの大腸菌ペーストを、7Mのグアニジン、20mMのトリス、pH8バッファー中で10容量 (w/v) で再懸濁させた。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々0.1M及び0.02Mとし、溶液を4℃で終夜攪拌した。この工程により、亜硫酸によりブロックされたシステイン残基を持つ変性タンパク質がもたらされた。溶液をBeckman Ultracentrifuge中で40,000rpmで30分間濃縮した。上清を金属キレートカラムバッファー (6Mのグアニジン、20mMのトリス、pH7.4) の3-5容量で希釈し、0.22ミクロンフィルターを通して濾過して透明化した。透明化抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた5mlのQiagen Ni-NTA金属キレートカラムに負荷した。カラムを50mMのイミダゾール (Calbiochem, Utrोल grade) を含む添加バッファー、pH7.4で洗浄した。タンパク質を250mMのイミダゾールを含有するバッファーで溶離した。所望のタンパク質を含有する画分をプールし、4℃で保存した。タンパク質濃度は、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて280nmにおけるその吸収により見積もった。

30

試料を、20mMのトリス、pH8.6、0.3MのNaCl、2.5Mの尿素、5mMのシステイン、20mMのグリシン及び1mMのEDTAからなる新たに調製した再折りたたみバッファー中に徐々に希釈することによりタンパク質を再折りたたみさせた。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が50-100マイクログラム/mlとなるように選択した。リフォールディング溶液を4℃で12-36時間ゆっくり攪拌した。リフォールディング反応はTFAを採取濃度0.4% (約3のpH) で添加することにより停止させた。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を0.22ミクロンフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度2-10%で添加した。再折りたたみされたタンパク質を、Poros R1/H逆相カラムで、0.1% TFAの移動バッファーと10-80%のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかけた。A₂₈₀吸収を持つ画分のアリコートでSDSポリアクリルアミドゲルで分析し、相同な再折りたたみされたタンパク質を含有する画分をプールした。一般的に、殆どのタンパク質の正

40

50

しく再折りたたみされた種は、これらの種が最もコンパクトであり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。タンパク質の誤って折りたたまれた形態を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。

所望の折りたたまれたPRO197、PRO207、PRO1185、PRO5725、PRO202、及びPRO3562タンパク質各々を含有する画分をプールし、溶液に向けた窒素の弱い気流を用いてアセトニトリルを除去した。タンパク質を、透析又は調製バッファーで平衡化したG25 Superfine (Pharmacia) 樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、0.14Mの塩化ナトリウム及び4%のマニトールを含む20mMのHEPES、pH6.8に調製した。 10

【0310】

実施例30

哺乳動物細胞におけるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の発現 20

この実施例は、哺乳動物細胞での組換え発現によるグリコシル化形態のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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日発行のEP 307, 247参照)を用いた。場合によっては、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980DNA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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980DNAの挿入を行う。得られたベクターは、pRK5-PRO197、pRK5-PRO207、pRK5-PRO226、pRK5-PRO232、pRK5-PRO243、pRK5-PRO256、pRK5-PRO269、pRK5-PRO274、pRK5-PRO304、pRK5-PRO339、pRK5-PRO1558、pRK5-PRO779、pRK5-PRO1185、pRK5-PRO1245、pRK5-PRO1759、pRK5-PRO5775、pRK5-PRO7133、pRK5-PRO7168、pRK5-PRO 50

5725、pRK5-PRO202、pRK5-PRO206、pRK5-PRO264、pRK5-PRO313、pRK5-PRO342、pRK5-PRO542、pRK5-PRO773、pRK5-PRO861、pRK5-PRO1216、pRK5-PRO1686、pRK5-PRO1800、pRK5-PRO3562、pRK5-PRO9850、pRK5-PRO539、pRK5-PRO4316又はpRK5-PRO4980と呼ばれる。

【0311】

一実施態様では、選択された宿主細胞は293細胞とすることができる。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)は、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分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 μ gのpRK5-PRO197、pRK5-PRO207、pRK5-PRO226、pRK5-PRO232、pRK5-PRO243、pRK5-PRO256、pRK5-PRO269、pRK5-PRO274、pRK5-PRO304、pRK5-PRO339、pRK5-PRO1558、pRK5-PRO779、pRK5-PRO1185、pRK5-PRO1245、pRK5-PRO1759、pRK5-PRO5775、pRK5-PRO7133、pRK5-PRO7168、pRK5-PRO5725、pRK5-PRO202、pRK5-PRO206、pRK5-PRO264、pRK5-PRO313、pRK5-PRO342、pRK5-PRO542、pRK5-PRO773、pRK5-PRO861、pRK5-PRO1216、pRK5-PRO1686、pRK5-PRO1800、pRK5-PRO3562、pRK5-PRO9850、pRK5-PRO539、pRK5-PRO4316又はpRK5-PRO4980 DNAを約1 μ gのVA RNA遺伝子をコードするDNA [Thimmappaya等, Cell, 31:543 (1982)]と混合し、500 μ l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 μ lの50mMのHEPES (pH7.35)、280mMのNaCl、1.5mMのNaPO₄を添加し、25℃で10分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、293細胞に加えて37℃で約4時間定着させた。培養培地を吸引し、2mlのPBS中20%グリセロールを30秒間添加した。293細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートした。形質移入の約24時間後、培養培地を除去し、培養培地(のみ)又は200 μ Ci/mlの³⁵S-システイン及び200 μ Ci/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、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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。

【0312】

これに換わる技術において、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980 DNAは、So

mparyac等, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて293細胞に一過的に導入される。293細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700 μ gのpRK5-PRO197、pRK5-PRO207、pRK5-PRO226、pRK5-PRO232、pRK5-PRO243、pRK5-PRO256、pRK5-PRO269、pRK5-PRO274、pRK5-PRO304、pRK5-PRO339、pRK5-PRO1558、pRK5-PRO779、pRK5-PRO1185、pRK5-PRO1245、pRK5-PRO1759、pRK5-PRO5775、pRK5-PRO7133、pRK5-PRO7168、pRK5-PRO5725、pRK5-PRO202、pRK5-PRO206、pRK5-PRO264、pRK5-PRO313、pRK5-PRO342、pRK5-PRO542、pRK5-PRO773、pRK5-PRO861、pRK5-PRO1216、pRK5-PRO1686、pRK5-PRO1800、pRK5-PRO3562、pRK5-PRO9850、pRK5-PRO539、pRK5-PRO4316又はpRK5-PRO4980DNAを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄した。DNA-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートした。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、5 μ g/mlウシインシュリン及び0.1 μ g/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約4日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いで発現されたPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を含む試料を濃縮し、透析又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製した。

【0313】

他の実施態様では、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をCHO細胞で発現させることができる。pRK5-PRO197、pRK5-PRO207、pRK5-PRO226、pRK5-PRO232、pRK5-PRO243、pRK5-PRO256、pRK5-PRO269、pRK5-PRO274、pRK5-PRO304、pRK5-PRO339、pRK5-PRO1558、pRK5-PRO779、pRK5-PRO1185、pRK5-PRO1245、pRK5-PRO1759、pRK5-PRO5775、pRK5-PRO7133、pRK5-PRO7168、pRK5-PRO5725、pRK5-PRO202、pRK5-PRO206、pRK5-PRO264、pRK5-PRO313、pRK5-PRO342、pRK5-PRO542、pRK5-PRO773、pRK5-PRO861、pRK5-PRO1216、pRK5-PRO1686、pRK5-PRO1800、pRK5-PRO3562、pRK5-PRO9850、pRK5-PRO539、pRK5-PRO4316又はpRK5-PRO4980ベクターは、CaPO₄又はDEAE-デキストランなどの公知の試薬を用いてCHO細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地（のみ）又は³⁵S-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243

、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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。

10

【0314】

また、エピトープタグPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980は、宿主CHO細胞において発現させてもよい。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980はpRK5ベクターからサブクローニングした。サブクローン挿入物は、次いで、PCRを施してバキュロウイルス発現ベクター中のポリ-hisタグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。ポリ-hisタグPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980挿入物は、次いで、安定なクローンの選択のためのDHFR等の選択マーカを含むSV40誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、CHO細胞をSV40誘導ベクターで（上記のように）形質移入した。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-hisタグPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を含む培養培地は、次いで濃縮し、Ni²⁺-キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択された方法

20

30

40

50

により精製できる。

【0315】

PRO197、PRO226、PRO256、PRO202、PRO264、PRO542、PRO773及びPRO861は安定発現法でCHO細胞において発現された、PRO256、PRO264及びPRO861はCHO細胞で一過性発現された。CHO細胞における安定な発現は以下の方法を用いて実施された。タンパク質は、それは対応するタンパク質の可溶化形態及び／又はポリ-Hisタグ形態のコード化配列（例えば、細胞外ドメイン）がIgG1のヒンジ、CH2及びCH2ドメインを含む定常領域配列に融合したIgG作成物（イムノアドヘシン）として発現された。

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

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

【0316】

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

ポリ-Hisタグ作成物について、タンパク質はNi²⁺-NTAカラム(Qiagen)を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのNaCl及び5mMイミダゾールを含む20mMのHepes, pH7.4バッファーで平衡化した6mLのNi-NTAカラムに4-5mL/分の流速で4℃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中で25mlのG25 Superfine (Pharmacia)を用いて脱塩し、-80℃で貯蔵した。

イミノアドヘシン (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275μl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。均一性はSDSポリアクリルアミドゲルで試験し、エドマン (Edman) 分解によりN-末端アミノ酸配列決定した。

10

【0317】

実施例32

酵母菌でのPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の発現

以下の方法は、酵母菌中でのPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の組換え発現を記載する。

20

第1に、ADH2/GAPDHプロモーターからのPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の細胞内発現を指示する。分泌のために、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232

30

40

50

、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードするDNAを選択したプラスミドに、ADH2／GAPDHプロモーター、天然PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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分泌シグナル／リーダー配列、及び（必要ならば）PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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。

【0318】

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

続いて組換えPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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。

【0319】

実施例33

バキュロウイルス感染昆虫細胞でのPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO

202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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。

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980あるいはPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980のコード化配列の所定部分（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）が、5'及び3'領域に相補的なプライマーでのPCRにより増幅される。5'プライマーは、隣接する（選択された）制限酵素部位を包含していてもよい。生成物は、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。

【0320】

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）中にリポフェクチン（GIBCO-BRLから市販）を用いて同時形質移入することにより作成される。28℃で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilly等、Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press（1994）に記載されているように実施した。

次いで、発現されたポリ-hisタグPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980は、例えば、Ni²⁺-キレートアフィニティクロマトグラフィーにより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MgCl₂; 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、0.45μmフィルターで濾過した。Ni²⁺-NTAアガロースカラム(Qiagenから市販)を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Ni²⁺-NTAでのウェスタンブロットで分析した。溶離したHis₁₀-タグPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を含む分画をプールし、負荷バッファーで透析した。

【0321】

あるいは、IgGタグ(又はFcタグ)PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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のスケールであったが、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。

【0322】

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。

第1の増幅ウイルス上清を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。 10

【0323】

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、配列を含むタンパク質を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)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。PROポリペプチドの均一性はSDSポリアクリルアミドゲル(PEG)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。 30

PRO256、PRO269、PRO1245、PRO264及びPRO542は、バキュロウイルス感染Sf9昆虫細胞において上記の手法により発現された。

【0324】

あるいは、修飾バキュロウイルス法をhigh5細胞取り込みに使用してもよい。この方法では、所望の配列をコードするDNAは、Pfu(Stratagene)等の適当な系で増幅されても、又はバキュロウイルス発現ベクターの含まれるエピトープタグの上流(5'-)に融合させてもよい。このようなエピトープタグは、ポリ-Hisタグ及び免疫グロブリンタグ(IgGのFc領域等)を含む。種々のプラスミドを用いることができ、pIE-1(Novagen)等の市販のプラスミドから誘導されたプラスミドを含む。pIE-1及びpIE-2ベクターは、安定に形質転換された昆虫細胞におけるバキュロウイルスie1プロモーターからの組換えタンパク質の構成的発現のために設計される。このプラスミドは複数のクロ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ie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 50

ターにサブクローニングされる。例えば、p I E l - 1 の誘導体はヒト I g G (p b . P H . I g G) の F c 領域又は 8 ヒスチジン (p b . P H . H i s) 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。H i g h 5 細胞は、27℃、CO₂ 無し、p e n / s t r e p 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、30 µg の P R O ポリペプチドを含む p I E ベースベクターを 1ml の E x - 細胞培地 (媒質 : E x - 細胞 401 + 1 / 100 の L - G l u J R H B i o s c i e n c e s # 14401 - 78 P (注 : この媒質は軽感受性)) と混合し、別の管において、100 µl のセルフェクチン (C e l l F E C T I N (G i b c o B R L # 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 D N A / 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 H i 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 D N A / セルフェクチン混合物を吸引し、細胞を E x - 細胞で 1 回戦乗して過剰のセルフェクチンを除去した。30ml の新鮮な E x - 細胞培地を添加し、細胞を 28℃で 3 日間インキュベートした。上清を回収して、バキュロウイルス感染ベクターでの P R O ポリペプチドの発現を、1ml の上清の 25mL のヒスチジntag タンパク質用の N i ²⁺ - N T A ビーズ (Q I A G E N) 又は I g G タグタンパク質用のプロテイン A セファロース C L - 4 B ビーズ (P h a r m a c i a) へのバッチ結合、次いでクマシーブルー染色により周知の濃度のタンパク質標準と比較する S D S - P A G E 分析により測定した。

10

20

【0325】

形質移入細胞からの条件培地 (0 . 5 ~ 3 L) を、遠心分離により細胞を除去し 0 . 22 ミクロンフィルターを通して濾過することにより回収した。ポリ - H i s タグ作成物については、タンパク質作成物を N i ²⁺ - N T A カラム (Q i a g e n) を用いて精製した。精製前に、イミダゾールを条件培地に 5mM の濃度まで添加した。条件培地を、0 . 3 M の N a C l 及び 5mM イミダゾールを含む 20mM の H e p e s , p H 7 . 4 バッファーで平衡化した 6ml の N i ²⁺ - N T A カラムに 4 - 5ml / 分の流速で 48℃においてポンプ供給した。負荷後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を 0 . 25M イミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて 10mM の H e p e s , 0 . 14M の N a C l 及び 4 % のマンニトールを含む貯蔵バッファー、p H 6 . 8 中で 25ml の G 25 S u p e r f i n e (P h a r m a c i a) を用いて脱塩し、-80℃で貯蔵した。

30

タンパク質のイムノアドヘシン (F c 含有) 作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、20mM のリン酸ナトリウムバッファー、p H 6 . 8 で平衡化した 5ml のプロテイン A カラム (P h a r m a c i a) に負荷した。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、p H 3 . 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、p H 9 を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ - H i s タグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。P R O ポリペプチドの均一性は S D S ポリアクリルアミドゲル及びエドマン (E d m a n) 分解による N - 末端アミノ酸配列決定及び所望又は必要に応じて他の分析手法により評価できる。

40

P R O 226、P R O 232、P R O 243、P R O 269、P R O 779、P R O 202、P R O 542 及び P R O 861 は、h i g h 5 細胞を導入する上記の改変バキュロウイルス法により成功裏に発現された。

【0326】

実施例 34

P R O 197、P R O 207、P R O 226、P R O 232、P R O 243、P R O 256、P R O 269、P R O 274、P R O 304、P R O 339、P R O 1558、P R O 779、P R O 1185、P R O 1245、P R O 1759、P R O 5775、P R O 7133、P R O 7168、P R O 5725、P R O 202、P R O 206、P R O 26

50

4、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980に結合する抗体の調製
この実施例は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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。 10

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、Goding, 上掲に記載されている。用いられ得る免疫原は、精製PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980含む融合タンパク質、細胞表面に組換えPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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。 20 30

【0327】

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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779 40 50

、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体の検出のためのELISAアッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。適当な抗体価が検出された後、抗体に「ポジティブ」な動物に、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980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、脾臓を取り出した。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（ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン）培地を含む96ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髓腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

10

20

【0328】

ハイブリドーマ細胞は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980に対する反応性についてのELISAでスクリーニングされる。所望のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980に対するモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

30

ポジティブハイブリドーマ細胞を同系のBalb/cマウスに腹腔内注入し、抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980モノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインA又はプロテインGへの親和性に基づくアフィニティクロマトグラフィーを用いることもできる。

40

50

【 0 3 2 9 】

材料の寄託

次の細胞系をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, 10801 ユニバーシティ プルバード 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
DNA22780-1078	209284	1997年 9月18日
DNA30879-1152	209358	1997年10月10日
DNA33460-1166	209376	1997年10月16日
DNA34435-1140	209250	1997年 9月16日
DNA35917-1207	209508	1997年12月03日
DNA35880-1160	209379	1997年10月16日
DNA38260-1180	209397	1997年10月17日
DNA39987-1184	209786	1998年 4月21日
DNA39520-1217	209482	1997年11月21日
DNA43466-1225	209490	1997年11月21日
DNA71282-1668	203312	1998年10月 6日
DNA58801-1052	55820	1996年 9月 5日
DNA62881-1515	203096	1987年 8月 4日
DNA64884-1527	203155	1998年 8月25日
DNA76531-1701	203465	1998年11月17日
DNA96869-2673	PTA-255	1999年 6月22日
DNA128451-2739	PTA-618	1999年 8月31日
DNA102846-2742	PTA-545	1999年 8月17日
DNA92265-2669	PTA-256	1999年 6月22日
DNA35672-2508	203538	1998年12月15日
DNA47465-1561	203661	1999年 2月 2日
DNA94713-2561	203835	1999年 3月 9日
DNA97003-2649	PTA-43	1999年 5月11日

10

20

【 0 3 3 0 】

この寄託は、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、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、どれが最初であろうとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、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886 O G 6 3 8 の 3 7 C F R 第 1 . 1 4 条を含む）に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

30

本出願の譲受人は、寄託した培養物が、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即座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。

40

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。ここでの物質の寄託は、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

50

を様々なに変更することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

【図面の簡単な説明】

【F i g 1】天然配列 P R O 1 9 7 をコードするヌクレオチド配列を含む c D N A のヌクレオチド配列（配列番号：1）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：1）はここで D N A 2 2 7 8 0 - 1 0 7 8 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 2】F i g 1 に示した配列番号：1 のコード化配列から誘導された天然配列 P R O 1 9 7 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：2）を示す図である。

【F i g 3】天然配列 P R O 2 0 7 をコードするヌクレオチド配列を含む c D N A のヌクレオチド配列（配列番号：3）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：3）はここで D N A 3 0 8 7 9 - 1 1 5 2 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。 10

【F i g 4】F i g 3 に示した配列番号：3 のコード化配列から誘導された天然配列 P R O 2 0 7 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：4）を示す図である。

【F i g 5】天然配列 P R O 2 2 6 をコードするヌクレオチド配列を含む 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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：5）はここで D N A 3 3 4 6 0 - 1 1 6 6 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【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天然配列 P R O 2 2 6 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：6）を示す図である。 20

【F i g 7】天然配列 P R O 2 3 2 をコードするヌクレオチド配列を含む 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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：7）はここで D N A 3 4 4 3 5 - 1 1 4 0 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【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天然配列 P R O 2 3 2 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：8）を示す図である。

【F i g 9】天然配列 P R O 2 4 3 をコードするヌクレオチド配列を含む 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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：9）はここで D N A 3 5 9 1 7 - 1 2 0 7 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。 30

【F i g 10】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天然配列 P R O 2 4 3 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：10）を示す図である。

【F i g 11】天然配列 P R O 2 5 6 をコードするヌクレオチド配列を含む 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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：11）はここで D N A 3 5 8 8 0 - 1 1 6 0 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 12】F i g 11 に示した配列番号：11 のコード化配列から誘導された天然配列 P R O 2 5 6 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：12）を示す図である。

【F i g 13】天然配列 P R O 2 6 9 をコードするヌクレオチド配列を含む 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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：13）はここで D N A 3 8 2 6 0 - 1 1 8 0 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。 40

【F i g 14】F i g 13 に示した配列番号：13 のコード化配列から誘導された天然配列 P R O 2 6 9 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：14）を示す図である。

【F i g 15】天然配列 P R O 2 7 4 をコードするヌクレオチド配列を含む 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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：15）はここで D N A 3 9 9 8 7 - 1 1 8 4 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 16】F i g 15 に示した配列番号：15 のコード化配列から誘導された天然配 50

列 PRO 274 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：16）を示す図である。

【F i g 17】天然配列 PRO 304 をコードするヌクレオチド配列を含む 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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：17）はここで DNA 39520-1217 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 18】F i g 17 に示した配列番号：17 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO 304 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：18）を示す図である。

【F i g 19】天然配列 PRO 339 をコードするヌクレオチド配列を含む 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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：19）はここで DNA 43466-1225 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。 10

【F i g 20】F i g 19 に示した配列番号：19 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO 339 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：20）を示す図である。

【F i g 21】天然配列 PRO 1558 をコードするヌクレオチド配列を含む 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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：21）はここで DNA 71282-1668 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 22】F i g 21 に示した配列番号：21 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO 1558 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：22）を示す図である。

【F i g 23】天然配列 PRO 779 をコードするヌクレオチド配列を含む 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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：23）はここで DNA 58801-1052 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。 20

【F i g 24】F i g 23 に示した配列番号：23 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO 779 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：24）を示す図である。

【F i g 25】天然配列 PRO 1185 をコードするヌクレオチド配列を含む 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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：25）はここで DNA 62881-1515 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 26】F i g 25 に示した配列番号：25 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO 1185 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：26）を示す図である。 30

【F i g 27】天然配列 PRO 1245 をコードするヌクレオチド配列を含む 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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：27）はここで DNA 64884-1527 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 28】F i g 27 に示した配列番号：27 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO 1245 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：28）を示す図である。

【F i g 29】天然配列 PRO 1759 をコードするヌクレオチド配列を含む 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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：29）はここで DNA 76531-1701 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。 40

【F i g 30】F i g 29 に示した配列番号：29 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO 1759 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：30）を示す図である。

【F i g 31】天然配列 PRO 5775 をコードするヌクレオチド配列を含む 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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：31）はここで DNA 96869-2673 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 32】F i g 31 に示した配列番号：31 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO 5775 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：32）を示す図である。

【F i g 33】天然配列 PRO 7133 をコードするヌクレオチド配列を含む c D N A の 50

ヌクレオチド配列（配列番号：33）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：33）はここでDNA128451-2739と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 34】Fig 33に示した配列番号：33のコード化配列から誘導された天然配列PRO7133ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：34）を示す図である。

【Fig 35】天然配列PRO7168をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：35）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：35）はここでDNA102846-2742と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 36】Fig 35に示した配列番号：35のコード化配列から誘導された天然配列PRO7168ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：36）を示す図である。 10

【Fig 37】天然配列PRO5725をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：37）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：37）はここでDNA92265-2669と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 38】Fig 37に示した配列番号：37のコード化配列から誘導された天然配列PRO5725ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：38）を示す図である。

【Fig 39】天然配列PRO202をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：39）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：39）はここでDNA30869と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォ 20

ントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 40】Fig 39に示した配列番号：39のコード化配列から誘導された天然配列PRO202ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：40）を示す図である。

【Fig 41】天然配列PRO206をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：41）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：41）はここでDNA34405と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォ 30

ントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 42】Fig 41に示した配列番号：41のコード化配列から誘導された天然配列PRO206ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：42）を示す図である。

【Fig 43】天然配列PRO264をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：43）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：43）はここでDNA36995と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォ 30

ントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 44】Fig 43に示した配列番号：43のコード化配列から誘導された天然配列PRO264ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：44）を示す図である。

【Fig 45】天然配列PRO313をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：45）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：45）はここでDNA43320と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォ 40

ントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 46】Fig 45に示した配列番号：45のコード化配列から誘導された天然配列PRO313ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：46）を示す図である。 40

【Fig 47】天然配列PRO342をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：47）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：47）はここでDNA38649と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォ 50

ントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 48】Fig 47に示した配列番号：47のコード化配列から誘導された天然配列PRO342ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：48）を示す図である。

【Fig 49】天然配列PRO542をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：49）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：49）はここでDNA56505と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォ 50

ントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 5 0】F i g 4 9に示した配列番号：49のコード化配列から誘導された天然配列PRO542ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：50）を示す図である。

【F i g 5 1】天然配列PRO773をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：51）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：51）はここでDNA48303と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 5 2】F i g 5 1に示した配列番号：51のコード化配列から誘導された天然配列PRO773ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：52）を示す図である。

【F i g 5 3】天然配列PRO861をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：53）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：53）はここでDNA50798と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。 10

【F i g 5 4】F i g 5 3に示した配列番号：53のコード化配列から誘導された天然配列PRO861ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：54）を示す図である。

【F i g 5 5】天然配列PRO1216をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：55）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：55）はここでDNA66489と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 5 6】F i g 5 5に示した配列番号：55のコード化配列から誘導された天然配列PRO1216ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：56）を示す図である。 20

【F i g 5 7】天然配列PRO1686をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：57）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：57）はここでDNA80896と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 5 8】F i g 5 7に示した配列番号：57のコード化配列から誘導された天然配列PRO1686ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：58）を示す図である。

【F i g 5 9】天然配列PRO1800をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：59）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：59）はここでDNA35672-2508と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。 30

【F i g 6 0】F i g 5 9に示した配列番号：59のコード化配列から誘導された天然配列PRO1800ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：60）を示す図である。

【F i g 6 1】天然配列PRO3562をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：61）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：61）はここでDNA96791と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 6 2】F i g 6 1に示した配列番号：61のコード化配列から誘導された天然配列PRO3562ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：62）を示す図である。

【F i g 6 3】天然配列PRO9850をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：63）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：63）はここでDNA58725と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。 40

【F i g 6 4】F i g 6 3に示した配列番号：63のコード化配列から誘導された天然配列PRO9850ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：64）を示す図である。

【F i g 6 5】天然配列PRO539をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：65）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：65）はここでDNA47465-1561と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 6 6】F i g 6 5に示した配列番号：65のコード化配列から誘導された天然配 50

列PRO539ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：66）を示す図である。

【Fig 67】天然配列PRO4316をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：67）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：67）はここでDNA94713-2561と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 68】Fig 67に示した配列番号：67のコード化配列から誘導された天然配列PRO4316ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：68）を示す図である。

【Fig 69】天然配列PRO4980をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：69）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：69）はここでDNA97003-2649と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 70】Fig 69に示した配列番号：69のコード化配列から誘導された天然配列PRO4890ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：70）を示す図である。

【図 1】

```
GCCGAGCTGAGCGGATCCTCAGTGCAGTGTGATCCGATTTCTTCCAGCGGCTTGTGCACCAAGCGGGTCTTACC
CCCGTCTCTCCGCTCTCCAGTCTCTCGACCTGGAACCCCAACGTCCCGAGAGTCCCGAATCCCGCTCCGAG
GCTACTTAAGAGATGAGCGGTGCTCCGACGGCCGGGAGCGCCCTGATGCTCTGCGCGCCACCGCGCTGCTACT
GAGCCTCAGAGCGAGCCCGTGCAGTCCAGTCTGCGCGCTTTGCGCTCGGACGAGATGAATCTCTGGCGCA
CGGATCTCTCGAGTCTGGCGAGGGCTGCGCAACACGCGGAGCCGACCCGAGTCAAGTGAAGCGCGCTGGAGCG
GGCTCGAGCGCTGCGGGTCCGCTCTCAGGGAACCGAGGGTCCACCGACCTCCCGTTAGCCCTTGAGAGCGC
GGTGACCCCTGAGGTCTCTCAGACCTGACAGCAAACTCAAGGCTCAGAACAGCAGGATCCAGCAACTCTTCCA
CAGGTGGCCGAGCAGCGGACCTGGAGAGCAGCAGCTCGCAATTCAGTATCTGCAAGCCAGTTTGGCTCT
CTGGGCCACAGCACCTAGACATGAGGTGGCAAGCTCTGCCGAGAGAAGAGCTCTCGGAGATGGGCGAGCC
AGTTGACCCGGCTCACAATGTGACGCGGCTGACCGGCTGCCAGGGATTGCGAGAGCTGTTCCAGGTTGGGA
GAGGCAGAGTGGACTATTGAAATCCAGCTCAGGGGTCTCCGCCATTTTGTGTAAGTCAAGATGACCTCAGA
TGGAGGCTGGACAGTAATTCAGAGCGCCACAGTGGCTCAGTGGACTTCACCGGCTCGGGAAGCTACAGGC
GGGTTTGGGATCCCAAGCGGAGTCTGCTGGCTGGAGAGGTGCATGACATCAGCGGAGCCGCAAG
CCGCTTGGCCCTCGAGCTGCCGAGTGGATGGCAACCGCGAGTTGCTCGAGTTCTCCGTGCACTCGCTGGGTGGCA
GACACAGGCTATAGCTGAGCTCACTGCACCCGTGGCGGCGCAGTGGCGCCACACCGTCCCAAGCCAGCGG
CCCTCTCGTACCTTCTCCACTTGGGACGAGGATCAGCACTCCCGAGGGACAAGAACTGCGCAAGAGCTCTC
TGAGGCTGTGGTTTGGCACTGACGACCATTCACCTCAAGGCCAGTACTTGGCTCAGTCCACAGCAGG
GCAGAGCTTAAAGAGGGAATTTCTGGAAGCTGTGGCGGGCCCTCACTACCCCTCGAGGCCAACACAGTGT
GATTCAGCCCATGCGAGCAGAGCGACGCTCCTAGCGTCTGTGGTGGGCTGGTCCAGGCCCAAGAGAGGCTG
ACTTTGGCTCTGCCGAGGATGTGGCGTTCCCTGCTGGGCAAGGCTCCAGGAGGGCCATCTGGAAACTT
GTGGACAGAGAAGAGACACGACTGGAGAGAGCCCTTTCTGAGTGCAGGGGGGCTGCATGCTTGCCTCTGA
GATCAGGCTCAGAGATGCTCAGGCTCTAGAGGCTGGACAGAGGCGATGAGACTTCACTCTCTCTGGGCA
GGGAGTTGGGACTCAGAGGAGCACTTGGGCGAGCGAGAGTGGCTCAATGGCGGCACTCAGTCAATTCAGT
ACGGGGACAGGGCTTGTGTGGTTCAGAGCGCCCTCATGGTGTGCTGCTGTTGTGTAGGTCCCTGGGGAC
ACAAGCAGCGCCATGATCTCGGCGGAGCTCAGAGGTTCTTGGATAAAGCAACCTCAGAACAC
```

【図 2】

```
MTVIRFFPAASATKRVLPVLRVSSPTWNPVNPSPRIAPRLPKRMSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGFV
QSKSPRFASWDMNVLAHLLQLGGQLREHAERTRSQLSALERLLSACGACQGTGSDTDLPLAPESRVDPVHLH
SLTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQLQSQFGLLDNRHLDEHVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHMV
SKLHLPRDCQLFVQVERQSLFELIQGSGPPFLVNCMTSDGGWTVIQRHBDGSDVDFNRPWEATKAGPGDFHG
EPHLLGLKVHBITDGRSLVAVQLRDNDGALLQPSVHLGGEPVAVSLQTAIVAGLGLCTVPPSGLSVPSST
MDQDHLDRDKNCAKLSGGWVFGTCSHNLNGQYFRSIPQQRKLEKGFNKTWRGRYYPLQATTMLIQPAAB
AAS
```

膜貫通ドメイン：	アミノ酸 51-70
N-グリコシル化部位：	アミノ酸 224-228
cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位：	アミノ酸 46-50; 118-122
N-ミリスチル化部位：	アミノ酸 50-56; 129-135; 341-347; 357-363
フィブリノーゲン・ペーテ及びガビン鎖末端ドメインシグネチャー	アミノ酸 396-409

【図 3】

```
CGATCCCTCGGGTCCCGGGATGGGGGGCGGTGAGGCAGGCACAGCCCCCGCCCCATAGSCCGCCGCTGGAGC
CAGAGCGCGAGGGGGCGCGGGGAGCGGGCACCGCCCTGCTGCTCCCGCTCGCGCTGGGCTGGGCTGGCG
CTGGCTGCTCGGCCCTCTGCTGGCGGTGGTCAAGTTTGGGAGCGCGGCATCGCTGTCGCGCCAGGAGCTGCC
CAGGAGGAGCTGGTGGCAGAGGAGGACAGGACCCCTCGGAATCGAATCCCCAGACAGAGAAGCCAGGATCCT
GGCGCTTTCCGAAACCGACTAGTTCCGGCTCGGAGAAATGCACTTAAGGCGCGGAAGACGGGTGGAAGAGG
ATCGAGGCCAATTATGAAGTTCATCCAGCACTGGACAGGACGGAGCGAGGTGTGGACGGGACAGTAGT
GGCTGGGAGGAGCCAGAATCAACAGCTCCAGCCCTCTGCGCTACAACCGCCAGATCGGGGAGTTTATAGTACC
CGGGCTGGGCTCTACTACTGTACTCTAGTGCAGCTTTGATGAGGGGGAAGGTGTCTACTCTGAAGCTGGACTTG
CTGGTGGATGGTGTGCTGGCCCTCGGCTGCTGGAGGAATTTCTCAGCCACTGGCGCAGTTCCTCGGGCCAG
CTCCGCTCTGCCAGGTCTCTGGGCTGTGGGCTGGGGCGAGGCTTCCCTGGGATGCCACCTCTCCCTGG
GCCATCTCAAGGCTGCCCTCTCCCTCACTACTCTCGGACTCTTCAGAGTTCACTGAGGGGCCCTGGCTCCCGG
CAGTCTGCCAGGCTGCCCGGCTCCCTCGACAGCTCTCTGGGACCCGGTCCCTCTGCCCCACCTCAGCGCT
CTTTGCTCCAGAGCTGCCCTCCCTCTAGAGGCTGCCCTGGGCTGTTCAAGTGTTTTCCATCCCAATAATACA
GTATPCCCACTCTTATCTTACAGCTCCCCACCGCCACTCTCCAGCTCACTAGTCCCAATCCCTGACCTTT
GAGGCCCCCAGTGATCTCGAGTCCCGCTGGCCACAGACCCCGAGTCAATGTGTCTACTGTACTGTGGGCA
CGATGGTCCAGAAAGCCCACTTCAGGCACTAAGAGGGGCTGGAGCTGGCGCAGSAGGCCAAGAGACTGGGC
CTAGGCCAGGAGTCCCAATGTGAGGGCGGAGAAACAGACAAGCTCTCCCTTGAGAATTCCTGTGGATTTT
TAAACAGATATTATTTTATTATTATCTGACAAAAATTGATAAATAGATAAGTCATAAAA
AAA
```

【図 4】

```
MAARRSQRRRGRGEPGTALLVFLALGLALACLGLLAVVSLGRASLSAQEPQSELVAEEDQDPSELNPQT
EESQDPAFLMLVPRRSAPGRKTRAKRAIAAHYEVHPRFGQDGAQVDGTVSGWEARINSSPLRNQI
GETVTRAGLYLYTQVHFDGKAVYLLDLVGVLAIRCLSEFNTAASSLGPQLRLCQVSLALRPGSEL
IRTLPAWHLKAAPFLTYFGLPQVH
```

シグナルペプチド：	アミノ酸 1-40
N-グリコシル化部位：	アミノ酸 139-143
N-ミリスチル化部位：	アミノ酸 27-33; 29-35; 36-42; 45-51; 118-124; 121-127; 125-131; 128-134
アミド化部位：	アミノ酸 10-14; 97-101
原核生物膜リボタンパク質結合部位：	アミノ酸 24-35

【図 1 3】

ATCTGCTTGGCTCCCTCTACCCGCGCCAGCTGTCTTCTGACCCAGAAATAATCTCAGGGCTGCACCGGCGCTG
 GCAGCGCTCCGCACACATTTCTCTGCTCCGCGCTCAAGCGAACTCTTGAGCTCGGGCCCGCGGGGATCTCTTGG
 CAGTTGGGGGGTCCGCTCGGAGCGAGGGCGGAGGCGAAGGAGGGGGGACCGGGTTGGGGAAGCCAGCTCTAGAG
 CGGGGTGACCGGCTCCAGACACACAGCTCTGCGCTCTCGAGCGGACAGATCCAAAGTTGGAGACAGCTCTCGGTGG
 GGGGCTCAGAGAAAGAGCGCGGCTCGCGCTCTGCTCTCTGCGAGCGGCTCTGGCCCTGGAGCGGGGCGGCGG
 CGAACACCCGCTCTGACGCGCTGGCGTGGCTGGAGAGCCGACACGCTCTGAGCGCTGCACACAGCTTACCATGAA
 CGCGAGGGCGCCGAGAGAGCGCTGATCTCTCGAGGTGGGGGCTCTGACAGCCGCTGCGGCGCGGAGCGAGCTGG
 CGCTGTGCTCGGCTCTGCTGGCGAGGCCGAGGGCCGGAGGGGCTCCAAAGACCTGCTGTCTTGCGTCCGCACT
 GGAGGCGAGCGCTTCCACTGCACCTTGGAGAGACGAGCTTTCGGGGGGTTTCTCGTGGTGTGCTCTCGACGCCGG
 CGGCTTCGAAAGCGACAGCTGCAGTGGGTGGAGAGCCGACACGCTCTGAGCGCTGCACACAGCTTCCGCTACT
 CGAGCGACGCTGGGGTGGAGCGCTGCGAGGCTCGAAGGAGATCGATGCCACTCTGCGGCCCAAGCGCTTACCTGTG
 CAAATACAGTTTGAAGCTTTGTCTTCGCGCCGCGCCCGGGCGGCTTAACTTGAGCTTACGCGCGGCTCTGCG
 CAGCTGCGACAGCGCGCTCTGACTTTCAGTGCACCTGGGACCGAGGTAGTGCGCTCTGCGCGGGGACAGCTCCG
 GATCTCAGTTACTTGCATTCGCGAGCAAAATCGGCGCTCTGCGGACAAACTCTCGGCGGATGTGTGTCTGCCCTG
 CCGGGAGGATCATCTCTGCTCGCAATGCGAGAGCTCTCTAACTCTTGAGCGACTTGAGAGCTTTGCTCG
 CGAATGCTCTACGGGCTTCGAGCTGGGGAAGGACGCGCGCTCTGTGTGACAGCTGGGAGAGGACGCGACCTT
 TGGGGGAGCGGGGTGCCACACAGCGCGCCCGGGCCACTGCAACCGAGCCCGTCCGACAGAAATCGGCCAAT
 CAGGGTGCAGCGAAGGTGGGAGAGACCACTTGTCCCTGACAAAGACAATTCAGTAACATCTTATTCCTGAGAT
 TCTCTGATGGGATCAGAGACGATGTCTTACTCTTAAATGTCCCTTTCAGCGAGTCGAAAGCGCTCTGATCAG
 CCGATCAGGAGCGTCAATTTCCCAATTTAATCTAGCACTTCTCTCGGACCTCTCGAGCTTTCGACTCTCTCTC
 TGCCCTGGTCTTCATATTTGTGAGCAGCAGTAGTAGTGTGGGATCTTGACATGACACTCTGGGCTGTGTA
 CAGCTCTGCTTTCAGAAAGCGGCTTCTCCGACCGAAGAGGAGTCTATGGGCGCGCGGGCTTGGAGAGTGTA
 TCTGAGCGCGCTCTTGTGGTCTCATCTGACATCTGCACAAACAATGGGTGAAATCTGGGACTGTGATCT
 GCGGACACAGCAAGGGTGTCTCTGTCGGCGAGTCCCTCTTGCGCTTAGTAGATGCACTAGGGAACAGGGGACA
 TGCGCACTCTCTGAGCAAGTTTTCACCTTTTATGTAACAGGGGAGCCAAAGAGCAACTTACTTGTGTAAGTACAA
 TTTCTGACAGAAATCCCTCTCTCTTAAATTCCTTACTCTCACTGAGGACTTAAATCAGAACATGCGACTTCTCTC
 CTCTGATGATAGAGAGTGGAAATGCTTTTACGATGATGTAATCTGGGAGCCCGGTGATGTCGGAGAGCATTT
 TCTTATCTTTATCTGGAGATTTTGGAGAGCTTTTGACATTTTTCAGACATCTCGCAAAATAGAGAACAAATA
 AATTTACATTTAAAAAATATTTCTACCAAATAGAGAAATGTTCTATGTGTTTTCAGGCTAGGAGATATATGG
 TGTGAATTCAGGGAAGAAAAATTAATTAATAAATAAATAAGGATTTGTGAT

【図 1 4】

MRPAPALCLLWQALWFGGGGHEPTADRAGCSASGACYSLLHHAATMKRQAAEEACILRGGAISTVRAGAEALRAVLA
 LURAGPGPGGGSKDLLFWALERRHSCTLENELPRGFWLSSDPGLESITLQWVEEPORSCATBRRCALVLQATG
 VRFPGHKNHCHLRNAGYLCKYQFEVLPAPRPGASNLNLSRAFFLHSAALDFPPGTVEFSAALRGGLFISYT
 CLADEIGARHWKLSGVNVLCKTGGTFLNPLNLDLGFACACATFLELDGRCSTGTFSGGAGAGATTT
 VTPRPPRATPSVPVQRTFWIRVDEKILGETLPLVPEQDNSTSIPIEIPRWGSQSTMBTLQMSLQAESKATITPFSG
 VISKPNSTTSATPTQAFDSASAVFIVSTAAVVVLIVTMMVLGLVKLCFRESPPSRKESMGFPGLSDPEPA
 ALGSSSHACTNNGVKGDCDLDRDRAGALLAESPLGSSDA

シグナルペプチド:

アミノ酸 1-16

膜貫通ドメイン:

アミノ酸 397-418

N-グリコシル化部位:

アミノ酸 189-193; 381-385

グリコサミナリタン接着部位:

アミノ酸 289-293

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位:

アミノ酸 98-102; 434-438

N-ミストリル化部位:

アミノ酸 30-36; 35-41; 58-64; 59-65;

121-127; 151-157; 185-191; 209-215; 2

67-273;

350-356; 374-380; 453-459; 463-469; 477-483

アスパラギン酸及びアスパラギンヒドロキシル化部位:

アミノ酸 262-274

【図 1 5】

CGCTTGCGCGCTCGCCCTTCCCTTCCCGCGAGAGTCCCTCGCGGCGACAGATGTCTGTGGGGTCAGGCCAGCGG
 GGGAATATGGTGAAATTTCCGGCGCTCAGCACTACTCGGCCCTGATCCGGTCTTGTGTCGCCCTGGGCATCAC
 CAATCAATGAGCCATGACTCTCGGGAGGAGCGGCTTGAACCGGGCATTTGCTGCTGTCAAGGAGGATGCGAGTCTGAGAT
 CTGGGCGAGCTAGGGCTGGCGTACTCCCTCATGAAATCTTTCAGCGGCTCCGATGAGTACTTCAAATAATGCGG
 CCTGGTGTCTTGTGAACAGCAAGAGAGAGAGGACCAAGCGCTCTGTGTATGTGTGTGGCGGGCGCATCTGCTG
 CGCTTGTACACACATGATAGCTATATGATGATTAGGATATCATATATCAAACTTCCACCATPFGACGAGT
 GTFGGGGAGCAGAGAGAGAGGGCTTCTCTGACTCTCGGCCCTTCTTCTCATGAGCAATGCGATGAGACCA
 TGCTGGCATCTCTTAAACACAAATACAGTTTCTGCTGGGATGTGCTCTCAATCTCAGATGCTCATAGCTCAGGT
 TGTITTTGTAGCCATTGTGCTACAGCTACCTGGAAATCGCGGAGGCCCTGCTATCCCGATCTCTCTCTGTA
 CATGGGGCACTTGTGCGCTGCACACACCTGTGCTGGGCTACTACAGAACATTCAGACAGATCATCTCCTGAGC
 AAGTGGGCGAGTGGGGGAGATGCACAAATFAGAACAGTGGCTGGATCTTGTGGTGCTTTGGCTGTATPCT
 AGCAGCAGAGAAATCAGTCGGGCTATTGTCAACCTCTTTGTTCCGGGACCTTGTGGCGAGCTCTTGACGCCAC
 AGAGGAGACTGGGATTTGACAGCCATATACCTGTGGTACATGCGATCGGCTGGTGCAGGAAATCGCTGTC
 TGTGTATCTGCTTTCGACAAAGATAACCCAGCAACAACCTGTGGAGCAGAGCAACAGCTCAGGCGAGCCCA
 CATCAAGAATTTCACTTGTGTGATGGCTGTGCACTCAGCGCTCTGTCTGTGGATGTTTGTGGACACCAACCT
 GTTGAGAAATTTTGTATAGACATGATCGGATGGGACTTGTGCTTTCAGAAATTTGTGTCTTCTGCGAT
 CTCTCTCTTCTCCAGTTTCAGTACACATGAGGCGGATCTCAGCGGSGTGTGATGACTCAAGAAACACTT
 CTGCTTCTGCCCCAGCTCTGTGTCGGGATCAGTGTCTCATTCGCGGACAGCTCTGCTGGTCTACCTCACTGGGGT
 GCAGGTGCGACCTTGGGGTGGGCTTCTCTGCGGGGCTTCTGCGGAGAAATCGACATGCTCGCATCTGCTGTG
 GTCTATGCTTACCGAGAACGAAAGAGAGATGGAGATGATGCTGCCAGGAGGGGAGAGCTTGCCTAGC
 AGACATGCTTCCGACAGAGGAGTGACAGACATCTCGAAATAGAGAGGAGAAATGAAGAGGACCGAGGAGGCCA
 TGGGCACTCGAGGAGCGGTCACTAGGATGACACTTCGGCATCTCTCTCCCTCTCCATCTGATTTTGTGTCCC
 TTTTTTTTGTGTGTGTGTATGAAGAGAGGCGCTTGATTTAAAGTTCGTGTGCAATCTCTAGCATCTGGGT
 ATGCTCAGACATGAGCGGGGAGGACTAGTGAATGGTCTTACTGTGTGATGTGAAACCAACAGCAACTGACTT
 CATACGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCAGGTGAGCTGTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
 TCTCTCTTGGACCAAGCACTGCACTGCGATGCGCATCTCGGCTCTGCTCAGCTGCGACAGCGGACAGACATCTC
 CTGTCGCCCTCTCATGCTCTTAAAGATCAACAGGTTAAACCTCGGCTTGTGATTTGCTTCCCACTGACTG
 CGGTACAAGAGATGGAGCCCGGCTGGCTCTTAAATTTCCCTTTCGCGAGGAGTGTGAACACTTACTTCCAC
 ACATGCGAGAGCGGGGTGCGACTCTCAGCGCGGAGTCCCTGTACACATGAGAACGAGAGACTGACACAG
 CAGCTGACAGAGAGGAGCACTTCCCTCGAGAGGTTTGGGTGAAATGCGCGGGGACGCAAACTGACATGG
 TTGAATGATAGCATTTCACTCTGCTCTCTCTAGATCTGAGCAAGCTCTGACTTCTACCCCACTCGTATATA
 CATGAGCTTAACTTTTTTAAATGTGCAAAAGCGCATCTCCAGATTCAGAGCCTCGCGCATGACTTTCTTGAA
 GCGTGGTCTTCTCTCGCTTCTCTGAAAGTGCATTTAGAGGAGGATCAGTGGAGATCTTAACTTTGCTATTTA
 GTTTTACATGTGATGAGCTTAACTTAACTCTTAACTGAGCTTAACTGAGTGTGCTTCTGAGTAACTTTGAG
 TAGATATATTACCTGGTTCTGCTATCTTATGATTAATCTGCGGTACAGTAATAGAGATGTACTACGCTACT
 TCCCTCCCAACCATACGATAAAGCAAGCATTTTATAGCATGAGGAGACATGATGTGGTCTCTCTGAAATA
 AGCTATTCGAAATCCATGCACTGATATATTTCTTAAGTTTGGAGAGCAGTTATTTCTTTTAAAAAATTA
 TAGACAGGGTCTCAATTAATGATTAGTCAGAAATTCCTAGATCGAGGAGAACTAAAGAAATTTTAAAG
 TATAATATATGCTTATGTTATGTATGTTATTTTGGGTATTAATCATTTCTTATTTTGGCATTTTCAATAA
 ATAGCTCTTAAACAAAAA

【図 1 6】

MYKFPALTHYWLIRFLVPLGITNIAIDFGEQALNRGTAAVKEDAVENLASVGLAYSIMKFFTPGMSDFKNVGLV
 FVNSKDRKAVILWVWVAGLRAVPLTIVSLGYIILNKHVDESVGSKTHRAFLIAAFFPMDAATWTHAG
 ILLKHVSYFLVGCASIEDVIAQVVFVAILHSHLEKREPLLIILSLYALVLVCTTLCGLYKNIHDIIDPRSG
 PELGDACTIRKLSFWFPLILALITATQIRISRPVNLVFSRDLGSSATAEMVAILATPVYHMGVWLTETRAVY
 PAFPDNPNPNKLVSMTSVTAHIKKFTFVCMALSLTLCFVMFTNVSESLIIDIIVGFDAFELWCVPLRIFS
 VTRKPTVRAHLTGMWLTKTFVLAPSSVLRIIIVLASLVLVYGVHGTALGVSLAGVFSWVIAATCY
 VYRKFKKHNESATGDSASTDMPTEVTDIVMEHNEE

膜貫通ドメイン:

アミノ酸 86-105; 162-178; 327-345;

359-374; 403-423

N-グリコシル化部位:

アミノ酸 347-351; 461-465

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位:

アミノ酸 325-329

N-ミストリル化部位:

アミノ酸 53-59; 94-100; 229-235;

267-273; 268-274; 358-364; 422-428;

425-431; 431-437

【図 1 7】

CCACCGCTCCGCGGAGCGGTGGGAAGGGCAAAATGGGACTCCAGAGCTGCTCCTAGGGCTCTTTGGCCCTATC
 CTCTCTGGCAATGCAGTACAGCCCGAGGAGCGGACGAGCGAGGAGAGCTGCCCGAGGCTGGGTGCTCCCTGGGCG
 CGT
 CGGACCTCTGAGGAAGAGCTGACTCTTCACTTTTGGCTGAGACAGAGAAATGTGGAAGAACTCTCGAGACTGGT
 CAGGCTGTCTCGATCCGACTCTCTCAATACGGAATAATCTGACCTAGAGAATGTGGCTGATCTGGTAGG
 CCATCCGCTCACTGACCTCCAGCGCTCCAGAAATGGCTTTGGAGCGGAGGCCAGGAAGTCCATCTGTATGTC
 ACACAGGAGCTTTTGACTTGTCTGGTAGCATCCGACAGGACAGCTGCTGCTCTCGGGGCTGAGTTTCATCAC
 TATGTTGGAGGAGACTACGGAARACCATGTGTAAAGTCCGACACTTCTACAGCTCTCCACAGCGTCTGGGCCCC
 CATGTGGAGTTTGTGGGGAGGCTTGGCTTTTCCCGCACTCTCTCTGAGGACAGCTCTTGCGCGAGGCTG
 CAGGAGACTGTAGCGTGCATCTCGCGGTAAACCCCTCTGTGATCGTGAAGCATACAACCTGAGCTCCACAAGC
 GTGGGCTCTGGACCAAGCAATACAGCGAGCTGCGGCTCTGGAGCAGTATTTCCATGCTCAGCAAGCTG
 GCTCAGTTTACGCGCTCTTCTGGTGGCAATTTGACAGCTAGGACATAGTAGCGGTGTGTTGGACACAGCGGG
 CGGGGCGGCGGGGTGAGGCGAGTCTGATCTGATCTGATCTGCTGCTCAGCGCTCTGACAGCGTCTCGACGCG
 CAGCTGATGAGCTGCGCGGAGTGGGAGAGGAGCGGCTTCTCGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 GCGCTGCCACATGTGCTACTGTAGCATGTGAGATGTAGGAGACTCCCTCAGCAGCGCTACTACAGCGGGCTG
 AACACTGAGCTATGAAAGCTCGGAGCTCGGCTGTACCTGCTCTTGGCCFAGGTGACAGTGGGCGGCGGTGT
 TGCTCTGTCTTGGAGAGACAGACTTCCGCTTACTCTTCTGCTCTCAGCGCTCTGATGTCACACAGTGGGAGGCG
 CACTCTTCCAGGAACCTTTTCTATCACAAAATGCAAAATTCGTGATCATAGTGTGGTGGCTTCCAGCAATGT
 TCTCCAGCGGCTTATACACAGGAGGAGCTGTAAACGAATTCCTGAGCTTACGCCCCAGCTGCCACATTCAGT
 TACTTCAATCCAGCTGGCGCTCGCTACCCAGATGTGCTGCTCATTTTGTAGGTACTGGGTGCTCAGCAACAGA
 TGCCCATTTCACTGGGTGTCGGAACCTCGGCTCTTACTCCAGTGTTTGGGGGATCTTATCTTGTGATTAATGAG
 CACAGGATCTTFTGTGGGCGGCTCTTGTGGCTTTTTCACCGAGGCTTACAGCGAGCTGGGGAGGCTCT
 TTTGATGTAAACCGTGGCTGCATAGCTCTGCTTGGTGAAGAGGTAGAGGGCAGGGTTTCTGCTCTGGTGGCT
 GGCTGGGATCTCTGTAACAGCTTGGGAGCAACCACTCTGTAAGAGCTCTACTCAACCGCTGACGCTTCT
 TTTCTATCAGAGAGATGGTCTGCTCGGCTGCTGAGCTGGGAGTCACTGCTCTTATTCAGCGCTGTGTGGAGAG
 CCGTCTGAGCTCAACATGTGCTCTGCTGAGAGCTTATCTCTTCAAGAGCTTATCTGATCTGATCTGATCTG
 ACTTCAACCTTACGCTTCTCATCTACATCAGCTCTGCTTCACTCTGCTTACGATTTCTCAATAAGATGCTGTA
 ACTGATCATTTTGAATGCTCTTCTCGGATCTCATCTTCTCTTCTTCAATCAGGCTTTCTCAAGGGTCTGTA
 TACAGACTCTGTGCACTATTCAATGATATTCCTCCATCTTCACTCGCAAGAGAGACTCTTACTGCTCAGCGTT
 AGCTTTCTGCTACCTGACATCTGACATCTGAGAGCTTCACTGCTTCTCAATTTTCTGATCTGATCTGCTTCT
 KCAATATTTGCTGCTCTCTCTTCTTCTGAGCTTAACTTCTGATCATCTGCTTCTGCTTCTGCTTCTGCTTCT
 CATCAATTTCTGCTCTTCTCAAGGATGCTGACTTCTTCTGCTTCTGATGATTTTGTCTCTTCTGATTTTACT
 CATTTCTCCCTGGAACAAATCTGACGATCTACAACTTACCATCTTCACTAAATAGACTTTTCTATCCAAATAT
 GATTGATACCTCAATGTAAATAA

【図 1 8】

MCGLQACILLFALLISGKCSYSEPPDQRRLTPFOWSLGRADPEELSLTFPALQONQVRLSELVQAVSDPSSPO
 YGYRLTENLVDLVRPSLLTLVTKMLLAAGAGCHSVITQDFITKLSIRQAEILLPGAFFHHVYGGPTETREV
 VRSPHPYQLPQALAPHVDFVGGILHFPPTSSLRORPEPVQTVGLHGVLPSPVIRKRYNLSTDQVDSGTSNNQ
 ACQGLFQYFPHSDLAQFMRLPGNFAHQASVARVVGQGGGRAGIESLDVQYIHSAGANISTWYSSPGRHGE
 QEPFLQWLMLSHNESALPHVHTVSYGDDDSISSAVTQRVWELMKAARGLTLFASGDSGAGCWSVGRHOPR
 FPFAPSPVTVTVQTSIQEPTLNLIVYISGSGFNPFPSPVGEAVTFLSSPHLPSQVYFNAGSNAP
 DVAALSDEQWVSHNPVPIWVSQTEAGTVPFGGLISLNEHRLISGRPPLGLNPLRYQHGAGLPDVTGRGHS
 CLDEVEQGGFCSPGQWPDVGTGGTPTSQLC

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 210-214; 222-226; 286-290;

313-317; 443-447

グリコサミナリタン接着部位:

アミノ酸 361-365; 408-412; 538-542

N-ミストリル化部位:

アミノ酸 2-8; 107-113; 195-201; 199-205;

217-223; 219-225; 248-254; 270-276; 2

84-290;

409-415; 410-416; 473-479; 482-488; 5

21-527;

533-539; 549-555

シグナルペプチド:	アミノ酸	1-29
膜貫通ドメイン:	アミノ酸	381-399
N-グリコシル化部位:	アミノ酸	133-137; 154-158; 232-236; 264-268; 386-390; 400-404; 410-414; 427-43
N-ミリスチル化部位:	アミノ酸	58-64; 94-100; 131-137; 194-200; 251-257; 277-283; 281-287; 361-36
;		200, 405, 440, 446, 448, 454, 478, 484

CTCCCTGTGGCGGGAAGGGAAGAAC'TTTTGCACAGACAAGGCTT
CTCAACCTCTAACCTAGTGTGAGGTTCTTCCTGTGCCACCTTT

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	663-686
N-グリコシル化部位:	アミノ酸	44-48;140-144;198-202; 297-301;308-312;405-409;520-524
グリコサミノグリカン接着部位:	アミノ酸	490-494;647-651;813-817
CAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位:	アミノ酸	655-659
チロシンキナーゼリン酸化部位:	アミノ酸	154-163;776-783
N-ミリスチル化部位:	アミノ酸	57-63;192-198;255-261; 294-300;366-372;426-432;441-447;5; 13-519; 517-523;530-536;548-554;550-556;5; 81-587; 592-598;610-616;612-618;623-629; 48-654; 666-672;667-673;762-768;763-769; 80-786; 809-815;821-827;833-839
カドヘリン細胞外被り筋ドメインシグネチャー:	アミノ酸	112-123

セリン酸化部位：
アミノ酸 655-659

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
26 July 2001 (26.07.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/53486 A1

(51) International Patent Classification:	C12N 15/12, C07K 1447, 16/18, C12Q 1/68, G01N 33/574, C12N 15/62	60/151,689 PCT/US99/20111 PCT/US99/21090	31 August 1999 (31.08.1999) 1 September 1999 (01.09.1999) 15 September 1999 (15.09.1999)	US US US
(21) International Application Number:	PCT/US00/03565	PCT/US99/28313	30 November 1999 (30.11.1999)	US
(22) International Filing Date:	11 February 2000 (11.02.2000)	PCT/US99/28301	1 December 1999 (01.12.1999)	US
(25) Filing Language:	English	PCT/US99/28634	1 December 1999 (01.12.1999)	US
(26) Publication Language:	English	PCT/US00/00219	5 January 2000 (05.01.2000)	US
(30) Priority Data:	PCT/US99/05028 8 March 1999 (08.03.1999) US 60/123,972 11 March 1999 (11.03.1999) US 60/133,459 11 May 1999 (11.05.1999) US PCT/US99/12252 2 June 1999 (02.06.1999) US 60/140,650 22 June 1999 (22.06.1999) US 60/140,653 22 June 1999 (22.06.1999) US 60/144,758 20 July 1999 (20.07.1999) US 60/145,698 26 July 1999 (26.07.1999) US 60/146,222 28 July 1999 (28.07.1999) US 60/149,395 17 August 1999 (17.08.1999) US	(71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).	(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): ASHKENAZI, Avi, J. [US/US]; 1456 Tarrytown Street, San Mateo, CA 94402 (US); GODDARD, Audrey [CA/US]; 110 Congo Street, San Francisco, CA 94131 (US); GODOWSKI, Paul, J. [US/US]; 2627 Easton Drive, Burlingame, CA 94010 (US); GURNEY, Austin, L. [US/US]; 1 Debbie	

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF TUMOR

MTVIRFFPAASATKRVLPFVLRVSSPRTWNPVPSRIPAPRLFKRMSGAPTAGAALMLCAATAVILLSAQGGFV
QSKSPRFAGWDMNVLSHGLQLGQGLRERHARTRSQLSALERRLSACGSAQGTGSGTDLPLAPESRVDPEVLH
SLQTQLKAQNSRIQQLPHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQPLLDHKLHDHBAKPARRKRLPEMAQFVDPFHNH
SRLHRLFRDCQELPQVGRQSGLFETQPQSGPFLVNCRMSTSDGGWTVIQRRHDSVDFNRPWEAYKAGFGDPHG
RFWLGLKRVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNARLLQPSVHLGSGEDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPEGLSVFPST
WDQDHLDRDINCAKSLSGSWFGTCSHENLNGQIFRSIFQQRQKLKKGIPKWTWGRYITPLQATMLIQPMABEAS

Transmembrane domain: Amino acids 51-70

N-glycosylation site: Amino acids 224-228

cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites:
Amino acids 46-50;118-122N-myristoylation sites: Amino acids 50-56;129-135;341-347;
357-363Fibrinogen beta and gamma chains C-terminal domain signature:
Amino acids 396-409

(57) Abstract: The invention concerns compositions and methods for the diagnosis and treatment of neoplastic cell growth and proliferation in mammals, including humans. The invention is based upon the identification of genes that are amplified in the genome of tumor cells. Such gene amplification is expected to be associated with the overexpression of the gene product as compared to normal cells of the same tissue type and contribute to tumorigenesis. Accordingly, the proteins encoded by the amplified genes are believed to be useful targets for the diagnosis and/or treatment (including prevention) of certain cancers, and may act as predictors of the prognosis of tumor treatment. The present invention is directed to novel polypeptides and to nucleic acid molecules encoding those polypeptides. Also provided herein are vectors and host cells comprising those nucleic acid sequences, chimeric polypeptide molecules comprising the polypeptides of the present invention fused to heterologous polypeptide sequences, antibodies which bind to the polypeptides of the present invention and to methods for producing the polypeptides of the present invention.

WO 01/53486 A1

WO 01/53486 A1



Lane, Belmont, CA 94002 (US). **HILLAN, Kenneth, J.** [GB/US]; 64 Seward Street, San Francisco, CA 94114 (US). **MARSTERS, Scot, A.** [US/US]; 990 Cherry Street, San Carlos, CA 94070 (US). **PAN, James** [CA/US]; 2705 Coronet Boulevard, Belmont, CA 94002 (US). **PITTL, Robert, M.** [US/US]; 1110 Liberty Street, El Cerrito, CA 94530 (US). **ROY, Margaret, Ann** [GB/US]; 2960 Webster Street #4, San Francisco, CA 94123 (US). **SMITH, Victoria** [AU/US]; 19 Dwight Road, Burlingame, CA 94010 (US). **STONE, Donna, M.** [US/US]; 684 Sierra Point Road, Brisbane, CA 94005 (US). **WATANABE, Colin, K.** [US/US]; 128 Corliss Drive, Moraga, CA 94556 (US). **WOOD, William, I.** [US/US]; 35 Southdown Court, Hillsborough, CA 94010 (US).

(74) Agents: **BARNES, Elizabeth, M.** et al.; Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).

(81) Designated States (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,

DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

5

COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF TUMOR

Field of the Invention

The present invention relates to compositions and methods for the diagnosis and treatment of tumor.

10

Background of the Invention

Malignant tumors (cancers) are the second leading cause of death in the United States, after heart disease (Boring *et al.*, CA Cancer J. Clin., 43:7 [1993]).

Cancer is characterized by an increase in the number of abnormal, or neoplastic cells derived from a normal tissue which proliferate to form a tumor mass, the invasion of adjacent tissues by these neoplastic tumor cells, and the generation of malignant cells which eventually spread via the blood or lymphatic system to regional lymph nodes and to distant sites (metastasis). In a cancerous state, a cell proliferates under conditions in which normal cells would not grow. Cancer manifests itself in a wide variety of forms, characterized by different degrees of invasiveness and aggressiveness.

Alteration of gene expression is intimately related to the uncontrolled cell growth and de-differentiation which are a common feature of all cancers. The genomes of certain well studied tumors have been found to show decreased expression of recessive genes, usually referred to as tumor suppression genes, which would normally function to prevent malignant cell growth, and/or overexpression of certain dominant genes, such as oncogenes, that act to promote malignant growth. Each of these genetic changes appears to be responsible for importing some of the traits that, in aggregate, represent the full neoplastic phenotype (Hunter, Cell, 64:1129 [1991] and Bishop, Cell, 64:235-248 [1991]).

A well known mechanism of gene (*e.g.*, oncogene) overexpression in cancer cells is gene amplification. This is a process where in the chromosome of the ancestral cell multiple copies of a particular gene are produced. The process involves unscheduled replication of the region of chromosome comprising the gene, followed by recombination of the replicated segments back into the chromosome (Alitalo *et al.*, Adv. Cancer Res., 47:235-281 [1986]). It is believed that the overexpression of the gene parallels gene amplification, *i.e.*, is proportionate to the number of copies made.

Proto-oncogenes that encode growth factors and growth factor receptors have been identified to play important roles in the pathogenesis of various human malignancies, including breast cancer. For example, it has been found that the human ErbB2 gene (erbB2, also known as her2, or c-erbB-2), which encodes a 185-kd transmembrane glycoprotein receptor (p185^{HER2}; HER2) related to the epidermal growth factor receptor EGFR, is overexpressed in about 25% to 30% of human breast cancer (Slamon *et al.*, Science, 235:177-182 [1987]; Slamon

WO 01/53486

PCT/US00/03565

et al., Science, 244:707-712 [1989]).

It has been reported that gene amplification of a proto-oncogene is an event typically involved in the more malignant forms of cancer, and could act as a predictor of clinical outcome (Schwab *et al.*, Genes Chromosomes Cancer, 1:181-193 [1990]; Alitalo *et al.*, *supra*). Thus, *erbB2* overexpression is commonly regarded as a predictor of a poor prognosis, especially in patients with primary disease that involves axillary lymph nodes (Slamon *et al.*, [1987] and [1989], *supra*; Ravdin and Channess, Gene, 159:19-27 [1995]; and Hynes and Stern, Biochim. Biophys. Acta, 1198:165-184 [1994]), and has been linked to sensitivity and/or resistance to hormone therapy and chemotherapeutic regimens, including CMF (cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil) and anthracyclines (Baselga *et al.*, Oncology, 11 (3 Suppl 1):43-48 [1997]). However, despite the association of *erbB2* overexpression with poor prognosis, the odds of HER2-positive patients responding clinically to treatment with taxanes were greater than three times those of HER2-negative patients (*Ibid.*). A recombinant humanized anti-ErbB2 (anti-HER2) monoclonal antibody (a humanized version of the murine anti-ErbB2 antibody 4D5, referred to as rhuMab HER2 or Herceptin™) has been clinically active in patients with ErbB2-overexpressing metastatic breast cancers that had received extensive prior anticancer therapy. (Baselga *et al.*, J. Clin. Oncol., 14:737-744 [1996]).

In light of the above, there is obvious interest in identifying novel methods and compositions which are useful for diagnosing and treating tumors which are associated with gene amplification.

Summary of the Invention

A. Embodiments

The present invention concerns compositions and methods for the diagnosis and treatment of neoplastic cell growth and proliferation in mammals, including humans. The present invention is based on the identification of genes that are amplified in the genome of tumor cells. Such gene amplification is expected to be associated with the overexpression of the gene product and contribute to tumorigenesis. Accordingly, the proteins encoded by the amplified genes are believed to be useful targets for the diagnosis and/or treatment (including prevention) of certain cancers, and may act as predictors of the prognosis of tumor treatment.

In one embodiment, the present invention concerns an isolated antibody which binds to a polypeptide designated herein as a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide. In one aspect, the isolated antibody specifically binds to a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide. In another aspect, the antibody induces the death of a cell which expresses a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide. Often, the cell that expresses the

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide is a tumor cell that overexpresses the polypeptide as compared to a
 5 normal cell of the same tissue type. In yet another aspect, the antibody is a monoclonal antibody, which preferably has non-human complementarity determining region (CDR) residues and human framework region (FR) residues. The antibody may be labeled and may be immobilized on a solid support. In yet another aspect, the antibody is an antibody fragment, a single-chain antibody, or a humanized antibody which binds, preferably specifically, to a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558,
 10 PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide.

In another embodiment, the invention concerns a composition of matter which comprises an antibody which binds, preferably specifically, to a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier. In one aspect, the composition of matter comprises a therapeutically effective amount of the antibody. In another aspect, the composition comprises a further active ingredient, which may, for
 20 example, be a further antibody or a cytotoxic or chemotherapeutic agent. Preferably, the composition is sterile.

In a further embodiment, the invention concerns isolated nucleic acid molecules which encode anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibodies, and vectors and recombinant host cells comprising such nucleic acid molecules.

In a still further embodiment, the invention concerns a method for producing an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody, wherein the method comprises culturing a host cell transformed with a nucleic acid molecule which encodes the antibody under conditions sufficient to allow
 35 expression of the antibody, and recovering the antibody from the cell culture.

The invention further concerns antagonists of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide that inhibit one or more of the biological and/or immunological functions or activities of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide.

In a further embodiment, the invention concerns an isolated nucleic acid molecule that hybridizes to a nucleic acid molecule encoding a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide or the complement thereof. The isolated nucleic acid molecule is preferably DNA, and hybridization preferably occurs under stringent hybridization and wash conditions. Such nucleic acid molecules can act as antisense molecules of the amplified genes identified herein, which, in turn, can find use in the modulation of the transcription and/or translation of the respective amplified genes, or as antisense primers in amplification reactions. Furthermore, such sequences can be used as part of a ribozyme and/or a triple helix sequence which, in turn, may be used in regulation of the amplified genes.

In another embodiment, the invention provides a method for determining the presence of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide in a sample suspected of containing a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, wherein the method comprises exposing the sample to an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody and determining binding of the antibody to a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide in the sample. In another embodiment, the invention provides a method for determining the presence of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide in a cell, wherein the method comprises exposing the cell to an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody and determining binding of the antibody to the cell.

5 In yet another embodiment, the present invention concerns a method of diagnosing tumor in a mammal, comprising detecting the level of expression of a gene encoding a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide (a) in a test
10 sample of tissue cells obtained from the mammal, and (b) in a control sample of known normal tissue cells of the same cell type, wherein a higher expression level in the test sample as compared to the control sample, is indicative of the presence of tumor in the mammal from which the test tissue cells were obtained.

In another embodiment, the present invention concerns a method of diagnosing tumor in a mammal, comprising (a) contacting an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256,
15 anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody with a test sample of tissue cells obtained from the mammal, and (b) detecting the formation of a complex
20 between the anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody and a
25 PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide in the test sample, wherein the formation of a complex is indicative of the presence of a tumor in said mammal. The detection may be qualitative or quantitative, and may be performed
30 in comparison with monitoring the complex formation in a control sample of known normal tissue cells of the same cell type. A larger quantity of complexes formed in the test sample indicates the presence of tumor in the mammal from which the test tissue cells were obtained. The antibody preferably carries a detectable label. Complex formation can be monitored, for example, by light microscopy, flow cytometry, fluorimetry, or other techniques known in the art.

35 The test sample is usually obtained from an individual suspected to have neoplastic cell growth or proliferation (e.g. cancerous cells).

In another embodiment, the present invention concerns a cancer diagnostic kit comprising an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody and a carrier (*e.g.*, a buffer) in suitable
 5 packaging. The kit preferably contains instructions for using the antibody to detect the presence of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide in a sample suspected of containing the same.

10 In yet another embodiment, the invention concerns a method for inhibiting the growth of tumor cells comprising exposing tumor cells which express a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide to an effective amount
 15 of an agent which inhibits a biological and/or immunological activity and/or the expression of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, wherein growth of the tumor cells is thereby inhibited. The agent preferably is an anti-
 20 PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody, a small organic and inorganic
 25 molecule, peptide, phosphopeptide, antisense or ribozyme molecule, or a triple helix molecule. In a specific aspect, the agent, *e.g.*, the anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody, induces
 30 cell death. In a further aspect, the tumor cells are further exposed to radiation treatment and/or a cytotoxic or chemotherapeutic agent.

In a further embodiment, the invention concerns an article of manufacture, comprising:

a container;

35 a label on the container; and

a composition comprising an active agent contained within the container; wherein the composition is effective for inhibiting the growth of tumor cells and the label on the container indicates that the composition can be used for treating conditions characterized by overexpression of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide as compared to a normal cell of the same tissue type. In particular aspects, the active agent in the composition is an agent which inhibits an activity and/or the expression of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide. In preferred aspects, the active agent is an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody or an antisense oligonucleotide.

The invention also provides a method for identifying a compound that inhibits an activity of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, comprising contacting a candidate compound with a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide under conditions and for a time sufficient to allow these two components to interact and determining whether a biological and/or immunological activity of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide is inhibited. In a specific aspect, either the candidate compound or the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide is immobilized on a solid support. In another aspect, the non-immobilized component carries a detectable label. In a preferred aspect, this method comprises the steps of (a) contacting cells and a candidate compound to be screened in the presence of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide under conditions suitable for the induction of a cellular response normally induced by a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide and (b) determining the induction of said cellular response to determine if the test compound is an effective antagonist.

5 In another embodiment, the invention provides a method for identifying a compound that inhibits the expression of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide in cells that express the polypeptide, wherein the method
10 comprises contacting the cells with a candidate compound and determining whether the expression of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide is inhibited. In a preferred aspect, this method comprises the steps of (a)
15 contacting cells and a candidate compound to be screened under conditions suitable for allowing expression of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide and (b) determining the inhibition of expression of said polypeptide.
20

B. Additional Embodiments

In other embodiments of the present invention, the invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that encodes a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133,
25 PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide.

In one aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% sequence identity, preferably at least about 81% sequence identity, more preferably at least about 82% sequence identity, yet more preferably at least about 83% sequence identity, yet more preferably at least about 84%
30 sequence identity, yet more preferably at least about 85% sequence identity, yet more preferably at least about 86% sequence identity, yet more preferably at least about 87% sequence identity, yet more preferably at least about 88% sequence identity, yet more preferably at least about 89% sequence identity, yet more preferably at least about 90% sequence identity, yet more preferably at least about 91% sequence identity, yet more preferably at least about 92% sequence identity, yet more preferably at least about 93% sequence identity, yet more preferably at least about 94%
35 sequence identity, yet more preferably at least about 95% sequence identity, yet more preferably at least about 96% sequence identity, yet more preferably at least about 97% sequence identity, yet more preferably at least about 98% sequence identity and yet more preferably at least about 99% sequence identity to (a) a DNA molecule encoding a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide having a full-length amino acid sequence as disclosed herein, an amino acid sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a transmembrane
 5 protein, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In other aspects, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% sequence identity, preferably at least about 81% sequence identity, more preferably at least about 82% sequence identity, yet more preferably at least about 83% sequence identity, yet more preferably at least about 84%
 10 sequence identity, yet more preferably at least about 85% sequence identity, yet more preferably at least about 86% sequence identity, yet more preferably at least about 87% sequence identity, yet more preferably at least about 88% sequence identity, yet more preferably at least about 89% sequence identity, yet more preferably at least about 90% sequence identity, yet more preferably at least about 91% sequence identity, yet more preferably at least about 92% sequence identity, yet more preferably at least about 93% sequence identity, yet more preferably at least about 94%
 15 sequence identity, yet more preferably at least about 95% sequence identity, yet more preferably at least about 96% sequence identity, yet more preferably at least about 97% sequence identity, yet more preferably at least about 98% sequence identity and yet more preferably at least about 99% sequence identity to (a) a DNA molecule comprising the coding sequence of a full-length PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168,
 20 PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide cDNA as disclosed herein, the coding sequence of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800,
 25 PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide lacking the signal peptide as disclosed herein, the coding sequence of an extracellular domain of a transmembrane PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide,
 30 with or without the signal peptide, as disclosed herein or the coding sequence of any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In a further aspect, the invention concerns an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence having at least about 80% sequence identity, preferably at least about 81% sequence identity, more
 35 preferably at least about 82% sequence identity, yet more preferably at least about 83% sequence identity, yet more preferably at least about 84% sequence identity, yet more preferably at least about 85% sequence identity, yet more preferably at least about 86% sequence identity, yet more preferably at least about 87% sequence identity, yet more preferably at least about 88% sequence identity, yet more preferably at least about 89% sequence identity, yet more

WO 01/53486

PCT/US00/03565

preferably at least about 90% sequence identity, yet more preferably at least about 91% sequence identity, yet more preferably at least about 92% sequence identity, yet more preferably at least about 93% sequence identity, yet more preferably at least about 94% sequence identity, yet more preferably at least about 95% sequence identity, yet more preferably at least about 96% sequence identity, yet more preferably at least about 97% sequence identity, yet more preferably at least about 98% sequence identity and yet more preferably at least about 99% sequence identity to (a) a DNA molecule that encodes the same mature polypeptide encoded by any of the human protein cDNAs deposited with the ATCC as disclosed herein, or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

Another aspect of the invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide which is either transmembrane domain-deleted or transmembrane domain-inactivated, or is complementary to such encoding nucleotide sequence, wherein the transmembrane domain(s) of such polypeptide are disclosed herein. Therefore, soluble extracellular domains of the herein described PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptides are contemplated.

Another embodiment is directed to fragments of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide coding sequence, or the complement thereof, that may find use as, for example, hybridization probes, for encoding fragments of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide that may optionally encode a polypeptide comprising a binding site for an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody or as antisense oligonucleotide probes. Such nucleic acid fragments are usually at least about 20 nucleotides in length, preferably at least about 30 nucleotides in length, more preferably at least about 40 nucleotides in length, yet more preferably at least about 50 nucleotides in length, yet more preferably at least about 60 nucleotides in length, yet more preferably at least about 70 nucleotides in length, yet more preferably at least about 80 nucleotides in length, yet more preferably at least about 90 nucleotides in length, yet more preferably at least about 100 nucleotides in length, yet more preferably at least about 110 nucleotides in length, yet more preferably at least about 120

WO 01/53486

PCT/US00/03565

nucleotides in length, yet more preferably at least about 130 nucleotides in length, yet more preferably at least about 140 nucleotides in length, yet more preferably at least about 150 nucleotides in length, yet more preferably at least about 160 nucleotides in length, yet more preferably at least about 170 nucleotides in length, yet more preferably at least about 180 nucleotides in length, yet more preferably at least about 190 nucleotides in length, yet more preferably at least about 200 nucleotides in length, yet more preferably at least about 250 nucleotides in length, yet more preferably at least about 300 nucleotides in length, yet more preferably at least about 350 nucleotides in length, yet more preferably at least about 400 nucleotides in length, yet more preferably at least about 450 nucleotides in length, yet more preferably at least about 500 nucleotides in length, yet more preferably at least about 600 nucleotides in length, yet more preferably at least about 700 nucleotides in length, yet more preferably at least about 800 nucleotides in length, yet more preferably at least about 900 nucleotides in length and yet more preferably at least about 1000 nucleotides in length, wherein in this context the term "about" means the referenced nucleotide sequence length plus or minus 10% of that referenced length. It is noted that novel fragments of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide-encoding nucleotide sequence may be determined in a routine manner by aligning the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide-encoding nucleotide sequence with other known nucleotide sequences using any of a number of well known sequence alignment programs and determining which PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide-encoding nucleotide sequence fragment(s) are novel. All of such PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide-encoding nucleotide sequences are contemplated herein. Also contemplated are the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide fragments encoded by these nucleotide molecule fragments, preferably those PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide fragments that comprise a binding site for an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody.

In another embodiment, the invention provides isolated PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide encoded by any of the isolated nucleic acid sequences hereinabove identified.

In a certain aspect, the invention concerns an isolated PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, comprising an amino acid sequence having at least about 80% sequence identity, preferably at least about 81% sequence identity, more preferably at least about 82% sequence identity, yet more preferably at least about 83% sequence identity, yet more preferably at least about 84% sequence identity, yet more preferably at least about 85% sequence identity, yet more preferably at least about 86% sequence identity, yet more preferably at least about 87% sequence identity, yet more preferably at least about 88% sequence identity, yet more preferably at least about 89% sequence identity, yet more preferably at least about 90% sequence identity, yet more preferably at least about 91% sequence identity, yet more preferably at least about 92% sequence identity, yet more preferably at least about 93% sequence identity, yet more preferably at least about 94% sequence identity, yet more preferably at least about 95% sequence identity, yet more preferably at least about 96% sequence identity, yet more preferably at least about 97% sequence identity, yet more preferably at least about 98% sequence identity and yet more preferably at least about 99% sequence identity to a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide having a full-length amino acid sequence as disclosed herein, an amino acid sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a transmembrane protein, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein.

In a further aspect, the invention concerns an isolated PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide comprising an amino acid sequence having at least about 80% sequence identity, preferably at least about 81% sequence identity, more preferably at least about 82% sequence identity, yet more preferably at least about 83% sequence identity, yet more preferably at least about 84% sequence identity, yet more preferably at least about 85% sequence identity, yet more preferably at least about 86% sequence identity, yet more preferably at least about 87% sequence identity, yet more preferably at least about 88% sequence identity, yet more preferably at least about 89% sequence identity, yet more preferably at least about 90% sequence identity, yet more preferably at least about 91% sequence identity, yet more preferably at least about 92% sequence identity, yet more preferably at least about 93% sequence identity, yet more preferably at least about 94% sequence identity, yet more preferably at least about 95% sequence identity, yet more preferably at least about 96% sequence identity, yet more preferably at least about 97% sequence identity, yet more preferably at least about 98% sequence identity and yet more preferably at least about 99% sequence identity to a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide having a full-length amino acid sequence as disclosed herein, an amino acid sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a transmembrane protein, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

identity, yet more preferably at least about 92% sequence identity, yet more preferably at least about 93% sequence identity, yet more preferably at least about 94% sequence identity, yet more preferably at least about 95% sequence identity, yet more preferably at least about 96% sequence identity, yet more preferably at least about 97% sequence identity, yet more preferably at least about 98% sequence identity and yet more preferably at least about 99% sequence identity to an amino acid sequence encoded by any of the human protein cDNAs deposited with the ATCC as disclosed herein.

In a further aspect, the invention concerns an isolated PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide comprising an amino acid sequence scoring at least about 80% positives, preferably at least about 81% positives, more preferably at least about 82% positives, yet more preferably at least about 83% positives, yet more preferably at least about 84% positives, yet more preferably at least about 85% positives, yet more preferably at least about 86% positives, yet more preferably at least about 87% positives, yet more preferably at least about 88% positives, yet more preferably at least about 89% positives, yet more preferably at least about 90% positives, yet more preferably at least about 91% positives, yet more preferably at least about 92% positives, yet more preferably at least about 93% positives, yet more preferably at least about 94% positives, yet more preferably at least about 95% positives, yet more preferably at least about 96% positives, yet more preferably at least about 97% positives, yet more preferably at least about 98% positives and yet more preferably at least about 99% positives when compared with the amino acid sequence of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide having a full-length amino acid sequence as disclosed herein, an amino acid sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a transmembrane protein, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein.

In a specific aspect, the invention provides an isolated PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide without the N-terminal signal sequence and/or the initiating methionine and is encoded by a nucleotide sequence that encodes such an amino acid sequence as hereinbefore described. Processes for producing the same are also herein described, wherein those processes comprise culturing a host cell comprising a vector which comprises the appropriate encoding nucleic acid molecule under conditions suitable for expression of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide and recovering the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide from the cell culture.

Another aspect of the invention provides an isolated PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide which is either transmembrane domain-deleted or transmembrane domain-inactivated. Processes for producing the same are also herein described, wherein those processes comprise culturing a host cell comprising a vector which comprises the appropriate encoding nucleic acid molecule under conditions suitable for expression of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide and recovering the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide from the cell culture.

In yet another embodiment, the invention concerns antagonists of a native PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide as defined herein. In a particular embodiment, the antagonist is an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody or a small molecule.

In a further embodiment, the invention concerns a method of identifying antagonists to a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide which comprise contacting the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide with a candidate molecule and monitoring a biological activity mediated by said PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide. Preferably, the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide is a native PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide.

In a still further embodiment, the invention concerns a composition of matter comprising a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, or an antagonist of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide as herein described, or an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody, in combination with a carrier. Optionally, the carrier is a pharmaceutically acceptable carrier.

Another embodiment of the present invention is directed to the use of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, or an antagonist thereof as hereinbefore described, or an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody, for the preparation of a medicament useful in the treatment of a condition which is responsive to the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, an antagonist thereof or an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

In other embodiments of the present invention, the invention provides vectors comprising DNA encoding any of the herein described polypeptides. Host cell comprising any such vector are also provided. By way of example, the host cells may be CHO cells, *E. coli*, yeast, or Baculovirus-infected insect cells. A process for producing any of the herein described polypeptides is further provided and comprises culturing host cells under conditions suitable for expression of the desired polypeptide and recovering the desired polypeptide from the cell culture.

In other embodiments, the invention provides chimeric molecules comprising any of the herein described polypeptides fused to a heterologous polypeptide or amino acid sequence. Example of such chimeric molecules comprise any of the herein described polypeptides fused to an epitope tag sequence or a Fc region of an immunoglobulin.

In another embodiment, the invention provides an antibody which specifically binds to any of the above or below described polypeptides. Optionally, the antibody is a monoclonal antibody, humanized antibody, antibody fragment or single-chain antibody.

In yet other embodiments, the invention provides oligonucleotide probes useful for isolating genomic and cDNA nucleotide sequences or as antisense probes, wherein those probes may be derived from any of the above or below described nucleotide sequences.

Brief Description of the Figures

Figure 1 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:1) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO197, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:1) is a clone designated herein as DNA22780-1078. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 2 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:2) of a native sequence PRO197 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:1 shown in Figure 1.

Figure 3 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:3) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO207, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:3) is a clone designated herein as DNA30879-1152. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 4 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:4) of a native sequence PRO207 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:3 shown in Figure 3.

Figure 5 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:5) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO226, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:5) is a clone designated herein as DNA33460-1166. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 6 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:6) of a native sequence PRO226 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:5 shown in Figure 5.

Figure 7 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:7) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO232, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:7) is a clone designated herein as DNA34435-1140. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop

WO 01/53486

PCT/US00/03565

codons.

Figure 8 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:8) of a native sequence PRO232 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:7 shown in Figure 7.

Figure 9 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:9) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO243, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:9) is a clone designated herein as DNA35917-1207. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 10 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:10) of a native sequence PRO243 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:9 shown in Figure 9.

Figure 11 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:11) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO256, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:11) is a clone designated herein as DNA35880-1160. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 12 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:12) of a native sequence PRO256 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:11 shown in Figure 11.

Figure 13 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:13) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO269, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:13) is a clone designated herein as DNA38260-1180. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 14 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:14) of a native sequence PRO269 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:13 shown in Figure 13.

Figure 15 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:15) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO274, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:15) is a clone designated herein as DNA39987-1184. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 16 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:16) of a native sequence PRO274 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:15 shown in Figure 15.

Figure 17 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:17) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO304, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:17) is a clone designated herein as DNA39520-1217. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 18 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:18) of a native sequence PRO304 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:17 shown in Figure 17.

Figure 19 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:19) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO339, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:19) is a clone designated herein as DNA43466-1225. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 20 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:20) of a native sequence PRO339 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:19 shown in Figure 19.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Figure 21 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:21) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO1558, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:21) is a clone designated herein as DNA71282-1668. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

5 Figure 22 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:22) of a native sequence PRO1558 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:21 shown in Figure 21.

Figure 23 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:23) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO779, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:23) is a clone designated herein as DNA58801-1052. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop
10 codons.

Figure 24 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:24) of a native sequence PRO779 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:23 shown in Figure 23.

Figure 25 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:25) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO1185, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:25) is a clone designated herein as DNA62881-1515. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop
15 codons.

Figure 26 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:26) of a native sequence PRO1185 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:25 shown in Figure 25.

Figure 27 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:27) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO1245, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:27) is a clone designated herein as DNA64884-1527. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop
20 codons.

Figure 28 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:28) of a native sequence PRO1245 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:27 shown in Figure 27.

25 Figure 29 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:29) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO1759, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:29) is a clone designated herein as DNA76531-1701. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 30 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:30) of a native sequence PRO1759 polypeptide
30 as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:29 shown in Figure 29.

Figure 31 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:31) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO5775, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:31) is a clone designated herein as DNA96869-2673. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop
codons.

35 Figure 32 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:32) of a native sequence PRO5775 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:31 shown in Figure 31.

Figure 33 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:33) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO7133, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:33) is a clone designated herein as DNA128451-2739. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop

WO 01/53486

PCT/US00/03565

codons.

Figure 34 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:34) of a native sequence PRO7133 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:33 shown in Figure 33.

Figure 35 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:35) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO7168, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:35) is a clone designated herein as DNA102846-2742. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 36 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:36) of a native sequence PRO7168 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:35 shown in Figure 35.

Figure 37 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:37) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO5725, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:37) is a clone designated herein as DNA92265-2669. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 38 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:38) of a native sequence PRO5725 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:37 shown in Figure 37.

Figure 39 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:39) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO202, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:39) is a clone designated herein as DNA30869. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 40 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:40) of a native sequence PRO202 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:39 shown in Figure 39.

Figure 41 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:41) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO206, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:41) is a clone designated herein as DNA34405. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 42 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:42) of a native sequence PRO206 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:41 shown in Figure 41.

Figure 43 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:43) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO264, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:43) is a clone designated herein as DNA36995. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 44 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:44) of a native sequence PRO264 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:43 shown in Figure 43.

Figure 45 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:45) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO313, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:45) is a clone designated herein as DNA43320. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 46 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:46) of a native sequence PRO313 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:45 shown in Figure 45.

Figure 47 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:47) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO342, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:47) is a clone designated herein as DNA38649. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 48 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:48) of a native sequence PRO342 polypeptide as

WO 01/53486

PCT/US00/03565

derived from the coding sequence of SEQ ID NO:47 shown in Figure 47.

Figure 49 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:49) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO542, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:49) is a clone designated herein as DNA56505. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

5 Figure 50 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:50) of a native sequence PRO542 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:49 shown in Figure 49.

Figure 51 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:51) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO773, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:51) is a clone designated herein as DNA48303. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

10 Figure 52 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:52) of a native sequence PRO773 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:51 shown in Figure 51.

Figure 53 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:53) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO861, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:53) is a clone designated herein as DNA50798. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

15 Figure 54 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:54) of a native sequence PRO861 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:53 shown in Figure 53.

Figure 55 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:55) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO1216, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:55) is a clone designated herein as DNA66489. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

20 Figure 56 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:56) of a native sequence PRO1216 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:55 shown in Figure 55.

Figure 57 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:57) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO1686, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:57) is a clone designated herein as DNA80896. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

25 Figure 58 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:58) of a native sequence PRO1686 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:57 shown in Figure 57.

Figure 59 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:59) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO1800, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:59) is a clone designated herein as DNA35672-2508. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop

30 codons.

Figure 60 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:60) of a native sequence PRO1800 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:59 shown in Figure 59.

Figure 61 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:61) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO3562, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:61) is a clone designated herein as DNA96791. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

35 Figure 62 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:62) of a native sequence PRO3562 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:61 shown in Figure 61.

Figure 63 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:63) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO9850, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:63) is a clone designated herein

WO 01/53486

PCT/US00/03565

as DNA58725. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 64 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:64) of a native sequence PRO9850 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:63 shown in Figure 63.

Figure 65 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:65) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO539, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:65) is a clone designated herein as DNA47465-1561. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 66 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:66) of a native sequence PRO539 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:65 shown in Figure 65.

Figure 67 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:67) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO4316, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:67) is a clone designated herein as DNA94713-2561. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 68 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:68) of a native sequence PRO4316 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:67 shown in Figure 67.

Figure 69 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:69) of a cDNA containing a nucleotide sequence encoding native sequence PRO4980, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:69) is a clone designated herein as DNA97003-2649. Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 70 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:70) of a native sequence PRO4980 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:69 shown in Figure 69.

Detailed Description of the Invention

I. Definitions

The phrases "gene amplification" and "gene duplication" are used interchangeably and refer to a process by which multiple copies of a gene or gene fragment are formed in a particular cell or cell line. The duplicated region (a stretch of amplified DNA) is often referred to as "amplicon." Usually, the amount of the messenger RNA (mRNA) produced, *i.e.*, the level of gene expression, also increases in the proportion of the number of copies made of the particular gene expressed.

"Tumor", as used herein, refers to all neoplastic cell growth and proliferation, whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues.

The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia. More particular examples of such cancers include breast cancer, prostate cancer, colon cancer, squamous cell cancer, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, colorectal cancer, endometrial carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney cancer, liver cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma and various types of head and neck cancer.

"Treatment" is an intervention performed with the intention of preventing the development or altering the

WO 01/53486

PCT/US00/03565

pathology of a disorder. Accordingly, "treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those in which the disorder is to be prevented. In tumor (*e.g.*, cancer) treatment, a therapeutic agent may directly decrease the pathology of tumor cells, or render the tumor cells more susceptible to treatment by other therapeutic agents, *e.g.*,
 5 radiation and/or chemotherapy.

The "pathology" of cancer includes all phenomena that compromise the well-being of the patient. This includes, without limitation, abnormal or uncontrollable cell growth, metastasis, interference with the normal functioning of neighboring cells, release of cytokines or other secretory products at abnormal levels, suppression or aggravation of inflammatory or immunological response, etc.

10 "Mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as dogs, horses, cats, cattle, pigs, sheep, etc. Preferably, the mammal is human.

"Carriers" as used herein include pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers which are nontoxic to the cell or mammal being exposed thereto at the dosages and concentrations employed. Often the
 15 physiologically acceptable carrier is an aqueous pH buffered solution. Examples of physiologically acceptable carriers include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose,
 20 mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEENTM, polyethylene glycol (PEG), and PLURONICSTM.

Administration "in combination with" one or more further therapeutic agents includes simultaneous (concurrent) and consecutive administration in any order.

25 The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes (*e.g.*, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y and ⁸⁶Re), chemotherapeutic agents, and toxins such as enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin, or fragments thereof.

A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer. Examples of
 30 chemotherapeutic agents include adriamycin, doxorubicin, epirubicin, 5-fluorouracil, cytosine arabinoside ("Ara-C"), cyclophosphamide, thiotepa, busulfan, cytosine, taxoids, *e.g.*, paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), and doxorubicin (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France), taxotere, methotrexate, cisplatin, melphalan, vinblastine, bleomycin, etoposide, ifosfamide, mitomycin C, mitoxantrone, vincristine, vinorelbine, carboplatin, teniposide, daunomycin, carminomycin, aminopterin, dactinomycin, mitomycins,
 35 esperamicins (see U.S. Pat. No. 4,675,187), 5-FU, 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, actinomycin D, VP-16, chlorambucil, melphalan, and other related nitrogen mustards. Also included in this definition are hormonal agents that act to regulate or inhibit hormone action on tumors such as tamoxifen and onapristone.

A "growth inhibitory agent" when used herein refers to a compound or composition which inhibits growth of a cell, especially cancer cell overexpressing any of the genes identified herein, either *in vitro* or *in vivo*. Thus,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

the growth inhibitory agent is one which significantly reduces the percentage of cells overexpressing such genes in S phase. Examples of growth inhibitory agents include agents that block cell cycle progression (at a place other than S phase), such as agents that induce G1 arrest and M-phase arrest. Classical M-phase blockers include the vincas (vincristine and vinblastine), taxol, and topo II inhibitors such as doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposide, and bleomycin. Those agents that arrest G1 also spill over into S-phase arrest, for example, DNA alkylating agents such as tamoxifen, prednisone, dacarbazine, mechlorethamine, cisplatin, methotrexate, 5-fluorouracil, and ara-C. Further information can be found in *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" by Murakami *et al.*, (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13.

10 "Doxorubicin" is an anthracycline antibiotic. The full chemical name of doxorubicin is (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexapyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,12-naphthacenedione.

The term "cytokine" is a generic term for proteins released by one cell population which act on another cell as intercellular mediators. Examples of such cytokines are lymphokines, monokines, and traditional polypeptide hormones. Included among the cytokines are growth hormone such as human growth hormone, N-methionyl human growth hormone, and bovine growth hormone; parathyroid hormone; thyroxine; insulin; proinsulin; relaxin; prolactin; glycoprotein hormones such as follicle stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH), and luteinizing hormone (LH); hepatic growth factor; fibroblast growth factor; prolactin; placental lactogen; tumor necrosis factor- α and - β ; mullerian-inhibiting substance; mouse gonadotropin-associated peptide; inhibin; activin; vascular endothelial growth factor; integrin; thrombopoietin (TPO); nerve growth factors such as NGF- β ; platelet-growth factor; transforming growth factors (TGFs) such as TGF- α and TGF- β ; insulin-like growth factor-I and -II; erythropoietin (EPO); osteoinductive factors; interferons such as interferon- α , - β , and - γ ; colony stimulating factors (CSFs) such as macrophage-CSF (M-CSF); granulocyte-macrophage-CSF (GM-CSF); and granulocyte-CSF (G-CSF); interleukins (ILs) such as IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; a tumor necrosis factor such as TNF- α or TNF- β ; and other polypeptide factors including LIF and kit ligand (KL). As used herein, the term cytokine includes proteins from natural sources or from recombinant cell culture and biologically active equivalents of the native sequence cytokines.

The term "prodrug" as used in this application refers to a precursor or derivative form of a pharmaceutically active substance that is less cytotoxic to tumor cells compared to the parent drug and is capable of being enzymatically activated or converted into the more active parent form. See, e.g., Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", *Biochemical Society Transactions*, 14:375-382, 615th Meeting, Belfast (1986), and Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 147-267, Humana Press (1985). The prodrugs of this invention include, but are not limited to, phosphate-containing prodrugs, thiophosphate-containing prodrugs, sulfate-containing prodrugs, peptide-containing prodrugs, D-amino acid-modified prodrugs, glycosylated prodrugs, β -lactam-containing prodrugs, optionally substituted phenoxyacetamide-containing prodrugs or optionally substituted phenylacetamide-containing prodrugs, 5-fluorocytosine and other 5-fluorouridine prodrugs which can be converted into the more active cytotoxic free drug. Examples of cytotoxic drugs that can be derivatized into a prodrugs form for use in this invention include, but are not limited to, those chemotherapeutic agents described above.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

An "effective amount" of a polypeptide disclosed herein or an antagonist thereof, in reference to inhibition of neoplastic cell growth, tumor growth or cancer cell growth, is an amount capable of inhibiting, to some extent, the growth of target cells. The term includes an amount capable of invoking a growth inhibitory, cytostatic and/or cytotoxic effect and/or apoptosis of the target cells. An "effective amount" of a PRO polypeptide antagonist for purposes of inhibiting neoplastic cell growth, tumor growth or cancer cell growth, may be determined empirically and in a routine manner.

A "therapeutically effective amount", in reference to the treatment of tumor, refers to an amount capable of invoking one or more of the following effects: (1) inhibition, to some extent, of tumor growth, including, slowing down and complete growth arrest; (2) reduction in the number of tumor cells; (3) reduction in tumor size; (4) inhibition (*i.e.*, reduction, slowing down or complete stopping) of tumor cell infiltration into peripheral organs; (5) inhibition (*i.e.*, reduction, slowing down or complete stopping) of metastasis; (6) enhancement of anti-tumor immune response, which may, but does not have to, result in the regression or rejection of the tumor; and/or (7) relief, to some extent, of one or more symptoms associated with the disorder. A "therapeutically effective amount" of a PRO polypeptide antagonist for purposes of treatment of tumor may be determined empirically and in a routine manner.

A "growth inhibitory amount" of a PRO antagonist is an amount capable of inhibiting the growth of a cell, especially tumor, *e.g.*, cancer cell, either *in vitro* or *in vivo*. A "growth inhibitory amount" of a PRO antagonist for purposes of inhibiting neoplastic cell growth may be determined empirically and in a routine manner.

A "cytotoxic amount" of a PRO antagonist is an amount capable of causing the destruction of a cell, especially tumor, *e.g.*, cancer cell, either *in vitro* or *in vivo*. A "cytotoxic amount" of a PRO antagonist for purposes of inhibiting neoplastic cell growth may be determined empirically and in a routine manner.

The terms "PRO polypeptide" and "PRO" as used herein and when immediately followed by a numerical designation refer to various polypeptides, wherein the complete designation (*i.e.*, PRO/number) refers to specific polypeptide sequences as described herein. The terms "PRO/number polypeptide" and "PRO/number" wherein the term "number" is provided as an actual numerical designation as used herein encompass native sequence polypeptides and polypeptide variants (which are further defined herein). The PRO polypeptides described herein may be isolated from a variety of sources, such as from human tissue types or from another source, or prepared by recombinant or synthetic methods.

A "native sequence PRO polypeptide" comprises a polypeptide having the same amino acid sequence as the corresponding PRO polypeptide derived from nature. Such native sequence PRO polypeptides can be isolated from nature or can be produced by recombinant or synthetic means. The term "native sequence PRO polypeptide" specifically encompasses naturally-occurring truncated or secreted forms of the specific PRO polypeptide (*e.g.*, an extracellular domain sequence), naturally-occurring variant forms (*e.g.*, alternatively spliced forms) and naturally-occurring allelic variants of the polypeptide. In various embodiments of the invention, the native sequence PRO polypeptides disclosed herein are mature or full-length native sequence polypeptides comprising the full-length amino acids sequences shown in the accompanying figures. Start and stop codons are shown in bold font and underlined in the figures. However, while the PRO polypeptide disclosed in the accompanying figures are shown to begin with methionine residues designated herein as amino acid position 1 in the figures, it is conceivable and possible that other methionine residues located either upstream or downstream from the amino acid position 1 in

WO 01/53486

PCT/US00/03565

the figures may be employed as the starting amino acid residue for the PRO polypeptides.

The PRO polypeptide "extracellular domain" or "ECD" refers to a form of the PRO polypeptide which is essentially free of the transmembrane and cytoplasmic domains. Ordinarily, a PRO polypeptide ECD will have less than 1% of such transmembrane and/or cytoplasmic domains and preferably, will have less than 0.5% of such domains. It will be understood that any transmembrane domains identified for the PRO polypeptides of the present invention are identified pursuant to criteria routinely employed in the art for identifying that type of hydrophobic domain. The exact boundaries of a transmembrane domain may vary but most likely by no more than about 5 amino acids at either end of the domain as initially identified herein. Optionally, therefore, an extracellular domain of a PRO polypeptide may contain from about 5 or fewer amino acids on either side of the transmembrane domain/extracellular domain boundary as identified in the Examples or specification and such polypeptides, with or without the associated signal peptide, and nucleic acid encoding them, are contemplated by the present invention.

The approximate location of the "signal peptides" of the various PRO polypeptides disclosed herein are shown in the present specification and/or the accompanying figures. It is noted, however, that the C-terminal boundary of a signal peptide may vary, but most likely by no more than about 5 amino acids on either side of the signal peptide C-terminal boundary as initially identified herein, wherein the C-terminal boundary of the signal peptide may be identified pursuant to criteria routinely employed in the art for identifying that type of amino acid sequence element (e.g., Nielsen *et al.*, Prot. Eng., 10:1-6 (1997) and von Heinje *et al.*, Nucl. Acids Res., 14:4683-4690 (1986)). Moreover, it is also recognized that, in some cases, cleavage of a signal sequence from a secreted polypeptide is not entirely uniform, resulting in more than one secreted species. These mature polypeptides, where the signal peptide is cleaved within no more than about 5 amino acids on either side of the C-terminal boundary of the signal peptide as identified herein, and the polynucleotides encoding them, are contemplated by the present invention.

"PRO polypeptide variant" means an active PRO polypeptide as defined above or below having at least about 80% amino acid sequence identity with a full-length native sequence PRO polypeptide sequence as disclosed herein, a PRO polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a PRO polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other fragment of a full-length PRO polypeptide sequence as disclosed herein. Such PRO polypeptide variants include, for instance, PRO polypeptides wherein one or more amino acid residues are added, or deleted, at the N- or C-terminus of the full-length native amino acid sequence. Ordinarily, a PRO polypeptide variant will have at least about 80% amino acid sequence identity, preferably at least about 81% amino acid sequence identity, more preferably at least about 82% amino acid sequence identity, more preferably at least about 83% amino acid sequence identity, more preferably at least about 84% amino acid sequence identity, more preferably at least about 85% amino acid sequence identity, more preferably at least about 86% amino acid sequence identity, more preferably at least about 87% amino acid sequence identity, more preferably at least about 88% amino acid sequence identity, more preferably at least about 89% amino acid sequence identity, more preferably at least about 90% amino acid sequence identity, more preferably at least about 91% amino acid sequence identity, more preferably at least about 92% amino acid sequence identity, more preferably at least about 93% amino acid sequence identity, more preferably at least about 94% amino acid sequence identity, more preferably at least about 95% amino acid sequence identity, more preferably at least about 96% amino acid sequence identity, more preferably at least about 97% amino acid sequence identity, more preferably at least

WO 01/53486

PCT/US00/03565

about 98% amino acid sequence identity and most preferably at least about 99% amino acid sequence identity with a full-length native sequence PRO polypeptide sequence as disclosed herein, a PRO polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a PRO polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other specifically defined fragment of a full-length PRO polypeptide sequence as disclosed herein. Ordinarily, PRO variant polypeptides are at least about 10 amino acids in length, often at least about 20 amino acids in length, more often at least about 30 amino acids in length, more often at least about 40 amino acids in length, more often at least about 50 amino acids in length, more often at least about 60 amino acids in length, more often at least about 70 amino acids in length, more often at least about 80 amino acids in length, more often at least about 90 amino acids in length, more often at least about 100 amino acids in length, more often at least about 150 amino acids in length, more often at least about 200 amino acids in length, more often at least about 300 amino acids in length, or more.

As shown below, Table 1 provides the complete source code for the ALIGN-2 sequence comparison computer program. This source code may be routinely compiled for use on a UNIX operating system to provide the ALIGN-2 sequence comparison computer program.

15 In addition, Tables 2A-2D show hypothetical exemplifications for using the below described method to determine % amino acid sequence identity (Tables 2A-2B) and % nucleic acid sequence identity (Tables 2C-2D) using the ALIGN-2 sequence comparison computer program, wherein "PRO" represents the amino acid sequence of a hypothetical PRO polypeptide of interest, "Comparison Protein" represents the amino acid sequence of a polypeptide against which the "PRO" polypeptide of interest is being compared, "PRO-DNA" represents a
20 hypothetical PRO-encoding nucleic acid sequence of interest, "Comparison DNA" represents the nucleotide sequence of a nucleic acid molecule against which the "PRO-DNA" nucleic acid molecule of interest is being compared, "X", "Y", and "Z" each represent different hypothetical amino acid residues and "N", "L" and "V" each represent different hypothetical nucleotides.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

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

```

WO 01/53486

PCT/US00/03565

```

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

#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max jumps in an path */
#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 del) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

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

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

char *ofile; /* output file name */
char *names[2]; /* seq names: getseqs() */
char *prog; /* prog name for err msgs */
char *seqs[2]; /* seqs: getseqs() */
int dmax; /* best diag: nw() */
int dmax0; /* final diag */
int 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 ppl[2]; /* holds path for seqs */

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

```

Page 1 of nw.h

WO 01/53486

PCT/US00/03565

```

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

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

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

main(ac, av)                                main
{
    int      ac;
    char     *av[];

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

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

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

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

```

Page 1 of nw.c

WO 01/53486

PCT/US00/03565

```

/* 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 diag", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    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

Page 2 of nw.c

WO 01/53486

PCT/US00/03565

```

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

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

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

```

Page 3 of nw.c

WO 01/53486

PCT/US00/03565

```

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

```

Page 4 of nw.c

WO 01/53486

PCT/US00/03565

```

/*
 *
 * 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_LUNE 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].spe = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spe;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spe = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spe;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

print

Page 1 of nwprint.c

WO 01/53486

PCT/US00/03565

```

/*
 * 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 = seqs[0] + pp[1].spe;
        p1 = seqs[1] + pp[0].spe;
        n0 = pp[1].spe + 1;
        n1 = pp[0].spe + 1;

        nm = 0;
        while ( *p0 && *p1 ) {
            if (siz0) {
                p1++;
                n1++;
                siz0--;
            }
            else if (siz1) {
                p0++;
                n0++;
                siz1--;
            }
            else {
                if (xhbm["p0-'A'"]&xhbm["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);
    }
}

```

Page 2 of nwprint.c

WO 01/53486

PCT/US00/03565

```

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

    fprintf(fx, "< gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) printf(outx, " (< %d %s %s)",
            gapy, (dna)? "base": "residue", (gapy == 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 int nm; /* matches in core -- for checking */
static int lmax; /* lengths of stripped file names */
static int ij[2]; /* jmp index for a path */
static int nc[2]; /* number at start of current line */
static int sz[2]; /* current elem number -- for gapping */
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 nm; /* char count */
    int more;
    register i;

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

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        sz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seq[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

pr_align

Page 3 of nwprint.c

WO 01/53486

PCT/US00/03565

```

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

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

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

```

...pr_align

dumpblock

Page 4 of nwprint.c

WO 01/53486

PCT/US00/03565

```

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

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

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

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

```

...dumpblock

nums

putline

Page 5 of nwprint.c

WO 01/53486

PCT/US00/03565

```

    int          i;
    register char *px;

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

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

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

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

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

```

...putline

stars

WO 01/53486

PCT/US00/03565

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

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

stripname

WO 01/53486

PCT/US00/03565

```

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

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

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

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup()
{
    int i;

    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

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

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

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

```

cleanup

getseq

Page 1 of nwsubr.c

WO 01/53486

PCT/US00/03565

```

...getseq
    py = pseq + 4;
    *len =rlen;
    rewind(fp);

    while (fgetc(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 > (rlen/3);
        return(pseq+4);
    }
}

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

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

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

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

```

g_alloc

readjumps

Page 2 of nwsubr.c

WO 01/53486

PCT/US00/03565

...readjumps

```

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

```

Page 3 of nwsubr.c

WO 01/53486

PCT/US00/03565

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix)
{
    int ix;
    char *mktmp0;

    if (!fj) {
        if (mktmp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktmp0 %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}
```

writejumps

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 2A

PRO	XXXXXXXXXXXXXXXX	(Length = 15 amino acids)
Comparison Protein	XXXXXXXXYYYYYY	(Length = 12 amino acids)

% amino acid sequence identity =

(the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the PRO polypeptide) =

5 divided by 15 = 33.3%

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 2B

PRO	XXXXXXXXXX	(Length = 10 amino acids)
Comparison Protein	XXXXXXXXYYZZYZ	(Length = 15 amino acids)

% amino acid sequence identity =

(the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the PRO polypeptide) =

5 divided by 10 = 50%

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 2C

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(Length = 14 nucleotides)
Comparison DNA	NNNNNNLLLLLLLL	(Length = 16 nucleotides)

% nucleic acid sequence identity =

(the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of nucleotides of the PRO-DNA nucleic acid sequence) =

6 divided by 14 = 42.9%

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 2D

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNN	(Length = 12 nucleotides)
Comparison DNA	NNNNLLLVV	(Length = 9 nucleotides)

% nucleic acid sequence identity =

(the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of nucleotides of the PRO-DNA nucleic acid sequence) =

4 divided by 12 = 33.3%

WO 01/53486

PCT/US00/03565

"Percent (%) amino acid sequence identity" with respect to the PRO polypeptide sequences identified herein is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in a PRO sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full-length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % amino acid sequence identity values are obtained as described below by using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table 1. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc., and the source code shown in Table 1 has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in Table 1. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

For purposes herein, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A. As examples of % amino acid sequence identity calculations, Tables 2A-2B demonstrate how to calculate the % amino acid sequence identity of the amino acid sequence designated "Comparison Protein" to the amino acid sequence designated "PRO".

Unless specifically stated otherwise, all % amino acid sequence identity values used herein are obtained as described above using the ALIGN-2 sequence comparison computer program. However, % amino acid sequence identity may also be determined using the sequence comparison program NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)). The NCBI-BLAST2 sequence comparison program may be downloaded from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCBI-BLAST2 uses several search parameters, wherein all of those search parameters are set to default values including, for example, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final

WO 01/53486

PCT/US00/03565

gapped alignment = 25 and scoring matrix = BLOSUM62.

In situations where NCBI-BLAST2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program NCBI-BLAST2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A.

In addition, % amino acid sequence identity may also be determined using the WU-BLAST-2 computer program (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)). Most of the WU-BLAST-2 search parameters are set to the default values. Those not set to default values, *i.e.*, the adjustable parameters, are set with the following values: overlap span = 1, overlap fraction = 0.125, word threshold (T) = 11, and scoring matrix = BLOSUM62. For purposes herein, a % amino acid sequence identity value is determined by dividing (a) the number of matching identical amino acids residues between the amino acid sequence of the PRO polypeptide of interest having a sequence derived from the native PRO polypeptide and the comparison amino acid sequence of interest (*i.e.*, the sequence against which the PRO polypeptide of interest is being compared which may be a PRO variant polypeptide) as determined by WU-BLAST-2 by (b) the total number of amino acid residues of the PRO polypeptide of interest. For example, in the statement "a polypeptide comprising an amino acid sequence A which has or having at least 80% amino acid sequence identity to the amino acid sequence B", the amino acid sequence A is the comparison amino acid sequence of interest and the amino acid sequence B is the amino acid sequence of the PRO polypeptide of interest.

"PRO variant polypeptide" or "PRO variant nucleic acid sequence" means a nucleic acid molecule which encodes an active PRO polypeptide as defined below and which has at least about 80% nucleic acid sequence identity with a nucleotide acid sequence encoding a full-length native sequence PRO polypeptide sequence as disclosed herein, a full-length native sequence PRO polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a PRO polypeptide, with or without the signal peptide, as disclosed herein or any other fragment of a full-length PRO polypeptide sequence as disclosed herein. Ordinarily, a PRO variant polynucleotide will have at least about 80% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 81% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 82% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 83% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 84% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 85% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 86% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 87% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 88% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 89% nucleic acid sequence identity, more

WO 01/53486

PCT/US00/03565

preferably at least about 90% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 91% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 92% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 93% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 94% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 95% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 96% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 97% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 98% nucleic acid sequence identity and yet more preferably at least about 99% nucleic acid sequence identity with the nucleic acid sequence encoding a full-length native sequence PRO polypeptide sequence as disclosed herein, a full-length native sequence PRO polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of a PRO polypeptide, with or without the signal sequence, as disclosed herein or any other fragment of a full-length PRO polypeptide sequence as disclosed herein. Variants do not encompass the native nucleotide sequence.

Ordinarily, PRO variant polynucleotides are at least about 30 nucleotides in length, often at least about 60 nucleotides in length, more often at least about 90 nucleotides in length, more often at least about 120 nucleotides in length, more often at least about 150 nucleotides in length, more often at least about 180 nucleotides in length, more often at least about 210 nucleotides in length, more often at least about 240 nucleotides in length, more often at least about 270 nucleotides in length, more often at least about 300 nucleotides in length, more often at least about 450 nucleotides in length, more often at least about 600 nucleotides in length, more often at least about 900 nucleotides in length, or more.

"Percent (%) nucleic acid sequence identity" with respect to the PRO polypeptide-encoding nucleic acid sequences identified herein is defined as the percentage of nucleotides in a candidate sequence that are identical with the nucleotides in a PRO polypeptide-encoding nucleic acid sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. Alignment for purposes of determining percent nucleic acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full-length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % nucleic acid sequence identity values are obtained as described below by using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table 1. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc., and the source code shown in Table 1 has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXUS10087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in Table 1. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

For purposes herein, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D)

WO 01/53486

PCT/US00/03565

is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } W/Z$$

where W is the number of nucleotides scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of C and D, and where Z is the total number of nucleotides in D. It will be appreciated that where the length of nucleic acid sequence C is not equal to the length of nucleic acid sequence D, the % nucleic acid sequence identity of C to D will not equal the % nucleic acid sequence identity of D to C. As examples of % nucleic acid sequence identity calculations, Tables 2C-2D demonstrate how to calculate the % nucleic acid sequence identity of the nucleic acid sequence designated "Comparison DNA" to the nucleic acid sequence designated "PRO-DNA".

Unless specifically stated otherwise, all % nucleic acid sequence identity values used herein are obtained as described above using the ALIGN-2 sequence comparison computer program. However, % nucleic acid sequence identity may also be determined using the sequence comparison program NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1997)). The NCBI-BLAST2 sequence comparison program may be downloaded from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCBI-BLAST2 uses several search parameters, wherein all of those search parameters are set to default values including, for example, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 and scoring matrix = BLOSUM62.

In situations where NCBI-BLAST2 is employed for sequence comparisons, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } W/Z$$

where W is the number of nucleotides scored as identical matches by the sequence alignment program NCBI-BLAST2 in that program's alignment of C and D, and where Z is the total number of nucleotides in D. It will be appreciated that where the length of nucleic acid sequence C is not equal to the length of nucleic acid sequence D, the % nucleic acid sequence identity of C to D will not equal the % nucleic acid sequence identity of D to C.

In addition, % nucleic acid sequence identity values may also be generated using the WU-BLAST-2 computer program (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)). Most of the WU-BLAST-2 search parameters are set to the default values. Those not set to default values, *i.e.*, the adjustable parameters, are set with the following values: overlap span = 1, overlap fraction = 0.125, word threshold (T) = 11, and scoring matrix = BLOSUM62. For purposes herein, a % nucleic acid sequence identity value is determined by dividing (a) the number of matching identical nucleotides between the nucleic acid sequence of the PRO polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest having a sequence derived from the native sequence PRO polypeptide-encoding nucleic acid and the comparison nucleic acid molecule of interest (*i.e.*, the sequence against which the PRO

WO 01/53486

PCT/US00/03565

polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest is being compared which may be a variant PRO polynucleotide) as determined by WU-BLAST-2 by (b) the total number of nucleotides of the PRO polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest. For example, in the statement "an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence A which has or having at least 80% nucleic acid sequence identity to the nucleic acid sequence B", the nucleic acid sequence A is the comparison nucleic acid molecule of interest and the nucleic acid sequence B is the nucleic acid sequence of the PRO polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest.

In other embodiments, PRO variant polynucleotides are nucleic acid molecules that encode an active PRO polypeptide and which are capable of hybridizing, preferably under stringent hybridization and wash conditions, to nucleotide sequences encoding the full-length PRO polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), or Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), Figure 34 (SEQ ID NO:34), Figure 36 (SEQ ID NO:36), Figure 38 (SEQ ID NO:38), Figure 40 (SEQ ID NO:40), Figure 42 (SEQ ID NO:42), Figure 44 (SEQ ID NO:44), Figure 46 (SEQ ID NO:46), Figure 48 (SEQ ID NO:48), Figure 50 (SEQ ID NO:50), Figure 52 (SEQ ID NO:52), Figure 54 (SEQ ID NO:54), Figure 56 (SEQ ID NO:56), Figure 58 (SEQ ID NO:58), Figure 60 (SEQ ID NO:60), Figure 62 (SEQ ID NO:62), Figure 64 (SEQ ID NO:64), Figure 66 (SEQ ID NO:66), Figure 68 (SEQ ID NO:68) or Figure 70 (SEQ ID NO:70), respectively. PRO variant polypeptides may be those that are encoded by a PRO variant polynucleotide.

The term "positives", in the context of the amino acid sequence identity comparisons performed as described above, includes amino acid residues in the sequences compared that are not only identical, but also those that have similar properties. Amino acid residues that score a positive value to an amino acid residue of interest are those that are either identical to the amino acid residue of interest or are a preferred substitution (as defined in Table 3 below) of the amino acid residue of interest.

For purposes herein, the % value of positives of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % positives to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

where X is the number of amino acid residues scoring a positive value as defined above by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % positives of A to B will not equal the % positives of B to A.

"Isolated," when used to describe the various polypeptides disclosed herein, means polypeptide that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Preferably, the isolated polypeptide is free of association with all components with which it is naturally associated. Contaminant components of its natural environment are materials that would typically interfere with diagnostic or therapeutic

WO 01/53486

PCT/US00/03565

uses for the polypeptide, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous solutes. In preferred embodiments, the polypeptide will be purified (1) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (2) to homogeneity by SDS-PAGE under non-reducing or reducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain.

- 5 Isolated polypeptide includes polypeptide *in situ* within recombinant cells, since at least one component of the PRO natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated polypeptide will be prepared by at least one purification step.

- An "isolated" nucleic acid molecule encoding a PRO polypeptide or an "isolated" nucleic acid encoding an anti-PRO antibody, is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the PRO-encoding nucleic acid or the anti-PRO-encoding nucleic acid. Preferably, the isolated nucleic acid is free of association with all components with which it is naturally associated. An isolated PRO-encoding nucleic acid molecule or an anti-PRO-encoding nucleic acid molecule is other than in the form or setting in which it is found in nature. Isolated nucleic acid molecules therefore are distinguished from the PRO-encoding nucleic acid molecule or the anti-PRO-encoding nucleic acid molecule as it exists in natural cells. However, an isolated nucleic acid molecule encoding a PRO polypeptide or an anti-PRO antibody includes PRO-nucleic acid molecules and anti-PRO-nucleic acid molecules contained in cells that ordinarily express PRO polypeptides or express anti-PRO antibodies where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

- The term "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

- Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

- The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers, for example, single anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 monoclonal antibodies (including antagonist, and neutralizing antibodies), anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody compositions with polypeptidic specificity, single chain anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibodies, and fragments of anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibodies (see below). The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally-occurring mutations that may be present in minor amounts.

"Stringency" of hybridization reactions is readily determinable by one of ordinary skill in the art, and generally is an empirical calculation dependent upon probe length, washing temperature, and salt concentration. In general, longer probes require higher temperatures for proper annealing, while shorter probes need lower temperatures. Hybridization generally depends on the ability of denatured DNA to reanneal when complementary strands are present in an environment below their melting temperature. The higher the degree of desired homology between the probe and hybridizable sequence, the higher the relative temperature which can be used. As a result, it follows that higher relative temperatures would tend to make the reaction conditions more stringent, while lower temperatures less so. For additional details and explanation of stringency of hybridization reactions, see Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Stringent conditions" or "high stringency conditions", as defined herein, may be identified by those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42°C; or (3) employ 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55°C, followed by a high-stringency wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55°C.

"Moderately stringent conditions" may be identified as described by Sambrook *et al.*, Molecular Cloning;

WO 01/53486

PCT/US00/03565

A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, and include the use of washing solution and hybridization conditions (e.g., temperature, ionic strength and % SDS) less stringent than those described above. An example of moderately stringent conditions is overnight incubation at 37°C in a solution comprising: 20% formamide, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5 x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 mg/ml denatured sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 1 x SSC at about 35°C-50°C. The skilled artisan will recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc. as necessary to accommodate factors such as probe length and the like.

The term "epitope tagged" when used herein refers to a chimeric polypeptide comprising a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide fused to a "tag polypeptide". The tag polypeptide has enough residues to provide an epitope against which an antibody can be made, yet is short enough such that it does not interfere with activity of the polypeptide to which it is fused. The tag polypeptide preferably also is fairly unique so that the antibody does not substantially cross-react with other epitopes. Suitable tag polypeptides generally have at least six amino acid residues and usually between about 8 and 50 amino acid residues (preferably, between about 10 and 20 amino acid residues).

"Active" or "activity" for the purposes herein refers to form(s) of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptides which retain a biological and/or an immunological activity/property of a native or naturally-occurring PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide other than the ability to induce the production of an antibody against an antigenic epitope possessed by a native or naturally-occurring PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide and an "immunological" activity refers to the ability to induce the production of an antibody against an antigenic epitope possessed by a native or naturally-occurring PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide.

“Biological activity” in the context of an antibody or another antagonist molecule that can be identified by the screening assays disclosed herein (e.g., an organic or inorganic small molecule, peptide, etc.) is used to refer to the ability of such molecules to bind or complex with the polypeptides encoded by the amplified genes identified herein, or otherwise interfere with the interaction of the encoded polypeptides with other cellular proteins or otherwise interfere with the transcription or translation of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide. A preferred biological activity is growth inhibition of a target tumor cell. Another preferred biological activity is cytotoxic activity resulting in the death of the target tumor cell.

The term “biological activity” in the context of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide means the ability of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide to induce neoplastic cell growth or uncontrolled cell growth.

The phrase “immunological activity” means immunological cross-reactivity with at least one epitope of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide.

“Immunological cross-reactivity” as used herein means that the candidate polypeptide is capable of competitively inhibiting the qualitative biological activity of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide having this activity with polyclonal antisera raised against the known active PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide. Such antisera are prepared in conventional fashion by injecting goats or rabbits, for example, subcutaneously with the known active analogue in complete Freund's adjuvant, followed by booster intraperitoneal or subcutaneous injection in incomplete Freund's. The immunological cross-reactivity preferably is “specific”, which means that the binding

WO 01/53486

PCT/US00/03565

affinity of the immunologically cross-reactive molecule (*e.g.*, antibody) identified, to the corresponding PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide is significantly higher (preferably at least about 2-times, more preferably at least about 4-times, even more preferably at least about 8-times, most preferably at least about 10-times higher) than the binding affinity of that molecule to any other known native polypeptide.

The term "antagonist" is used in the broadest sense, and includes any molecule that partially or fully blocks, inhibits, or neutralizes a biological activity of a native PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide disclosed herein or the transcription or translation thereof. Suitable antagonist molecules specifically include antagonist antibodies or antibody fragments, fragments, peptides, small organic molecules, anti-sense nucleic acids, etc. Included are methods for identifying antagonists of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide with a candidate antagonist molecule and measuring a detectable change in one or more biological activities normally associated with the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide.

A "small molecule" is defined herein to have a molecular weight below about 500 Daltons.

"Antibodies" (Abs) and "immunoglobulins" (Igs) are glycoproteins having the same structural characteristics. While antibodies exhibit binding specificity to a specific antigen, immunoglobulins include both antibodies and other antibody-like molecules which lack antigen specificity. Polypeptides of the latter kind are, for example, produced at low levels by the lymph system and at increased levels by myelomas. The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers, without limitation, intact monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, multispecific antibodies (*e.g.*, bispecific antibodies) formed from at least two intact antibodies, and antibody fragments so long as they exhibit the desired biological activity.

"Native antibodies" and "native immunoglobulins" are usually heterotetrameric glycoproteins of about 150,000 daltons, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages varies among the heavy chains of different immunoglobulin isotypes. Each heavy and light chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain (V_H) followed by a number of constant domains. Each light chain has a variable domain at one end (V_L) and a constant domain at its other end; the constant domain of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light-chain variable

WO 01/53486

PCT/US00/03565

domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light- and heavy-chain variable domains.

The term "variable" refers to the fact that certain portions of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies and are used in the binding and specificity of each particular antibody for its particular antigen. However, the variability is not evenly distributed throughout the variable domains of antibodies. It is concentrated in three segments called complementarity-determining regions (CDRs) or hypervariable regions both in the light-chain and the heavy-chain variable domains. The more highly conserved portions of variable domains are called the framework (FR) regions. The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FR regions, largely adopting a β -sheet configuration, connected by three CDRs, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β -sheet structure. The CDRs in each chain are held together in close proximity by the FR regions and, with the CDRs from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies (see Kabat *et al.*, NIH Publ. No.91-3242, Vol. I, pages 647-669 (1991)). The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody-dependent cellular toxicity.

The term "hypervariable region" when used herein refers to the amino acid residues of an antibody which are responsible for antigen-binding. The hypervariable region comprises amino acid residues from a "complementarity determining region" or "CDR" (*i.e.*, residues 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3) in the light chain variable domain and 31-35 (H1), 50-65 (H2) and 95-102 (H3) in the heavy chain variable domain; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD, [1991]) and/or those residues from a "hypervariable loop" (*i.e.*, residues 26-32 (L1), 50-52 (L2) and 91-96 (L3) in the light chain variable domain and 26-32 (H1), 53-55 (H2) and 96-101 (H3) in the heavy chain variable domain; Clothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 [1987]). "Framework" or "FR" residues are those variable domain residues other than the hypervariable region residues as herein defined.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably the antigen binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂ and Fv fragments; diabodies; linear antibodies (Zapata *et al.*, Protein Eng., 8(10):1057-1062 [1995]); single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, whose name reflects its ability to crystallize readily. Pepsin treatment yields an F(ab')₂ fragment that has two antigen-combining sites and is still capable of cross-linking antigen.

"Fv" is the minimum antibody fragment which contains a complete antigen-recognition and -binding site. This region consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable domain in tight, non-covalent association. It is in this configuration that the three CDRs of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the V_H-V_L dimer. Collectively, the six CDRs confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH1)

WO 01/53486

PCT/US00/03565

of the heavy chain. Fab fragments differ from Fab' fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group. F(ab')₂ antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

The "light chains" of antibodies (immunoglobulins) from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa (κ) and lambda (λ), based on the amino acid sequences of their constant domains.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgA2. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called α, δ, ε, γ, and μ, respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to conventional (polyclonal) antibody preparations which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they are synthesized by the hybridoma culture, uncontaminated by other immunoglobulins. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 [1975], or may be made by recombinant DNA methods (see, e.g., U.S. Patent No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 [1991] and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), for example.

The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies (immunoglobulins) in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 [1984]).

"Humanized" forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen-binding subsequences of antibodies) which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a CDR of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, Fv FR residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. These modifications are made to further refine and maximize antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see, Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 [1988]; and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). The humanized antibody includes a PRIMATIZED™ antibody wherein the antigen-binding region of the antibody is derived from an antibody produced by immunizing macaque monkeys with the antigen of interest.

"Single-chain Fv" or "sFv" antibody fragments comprise the V_H and V_L domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Preferably, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V_H and V_L domains which enables the sFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of sFv see Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain variable domain (V_L) in the same polypeptide chain (V_H-V_L). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; and Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

An "isolated" antibody is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody *in situ* within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

The word "label" when used herein refers to a detectable compound or composition which is conjugated directly or indirectly to the antibody so as to generate a "labeled" antibody. The label may be detectable by itself (*e.g.*, radioisotope labels or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration

WO 01/53486

PCT/US00/03565

of a substrate compound or composition which is detectable. Radionuclides that can serve as detectable labels include, for example, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, and Pd-109. The label may also be a non-detectable entity such as a toxin.

By "solid phase" is meant a non-aqueous matrix to which the antibody of the present invention can adhere.

5 Examples of solid phases encompassed herein include those formed partially or entirely of glass (*e.g.*, controlled pore glass), polysaccharides (*e.g.*, agarose), polyacrylamides, polystyrene, polyvinyl alcohol and silicones. In certain embodiments, depending on the context, the solid phase can comprise the well of an assay plate; in others it is a purification column (*e.g.*, an affinity chromatography column). This term also includes a discontinuous solid phase of discrete particles, such as those described in U.S. Patent No. 4,275,149.

10 A "liposome" is a small vesicle composed of various types of lipids, phospholipids and/or surfactant which is useful for delivery of a drug (such as a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide or antibody thereto and, 15 optionally, a chemotherapeutic agent) to a mammal. The components of the liposome are commonly arranged in a bilayer formation, similar to the lipid arrangement of biological membranes.

As used herein, the term "immunoadhesin" designates antibody-like molecules which combine the binding specificity of a heterologous protein (an "adhesin") with the effector functions of immunoglobulin constant domains. Structurally, the immunoadhesins comprise a fusion of an amino acid sequence with the desired binding 20 specificity which is other than the antigen recognition and binding site of an antibody (*i.e.*, is "heterologous"), and an immunoglobulin constant domain sequence. The adhesin part of an immunoadhesin molecule typically is a contiguous amino acid sequence comprising at least the binding site of a receptor or a ligand. The immunoglobulin constant domain sequence in the immunoadhesin may be obtained from any immunoglobulin, such as IgG-1, IgG-2, IgG-3, or IgG-4 subtypes, IgA (including IgA-1 and IgA-2), IgE, IgD or IgM.

25 II. Compositions and Methods of the Invention

A. Full-length PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 and PRO4980 polypeptides

30 The present invention provides newly identified and isolated nucleotide sequences encoding polypeptides referred to in the present application as PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 and PRO4980. In particular, cDNA encoding 35 PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO539, PRO4316 and PRO4980 polypeptides has been identified and isolated, as disclosed in further detail in the Examples below. It is noted that proteins produced in separate expression rounds may be given different PRO numbers but the UNQ number is unique for any given DNA and the encoded protein, and will not be changed. However, for sake of simplicity, in the present specification the proteins encoded by the herein disclosed nucleic acid sequences as well as all further native homologues and variants included in the foregoing definition of

5 PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 and PRO4980 will be referred to as "PRO197", "PRO207", "PRO226", "PRO232", "PRO243",

10 "PRO256", "PRO269", "PRO274", "PRO304", "PRO339", "PRO1558", "PRO779", "PRO1185", "PRO1245", "PRO1759", "PRO5775", "PRO7133", "PRO7168", "PRO5725", "PRO202", "PRO206", "PRO264", "PRO313", "PRO342", "PRO542", "PRO773", "PRO861", "PRO1216", "PRO1686", "PRO1800", "PRO3562", "PRO9850", "PRO539", "PRO4316" or "PRO4980", regardless of their origin or mode of preparation.

As disclosed in the Examples below, cDNA clones have been deposited with the ATCC, with the exception

15 of known clones: DNA30869, DNA34405, DNA36995, DNA43320, DNA38649, DNA56505, DNA48303, DNA50798, DNA66489, DNA80896, DNA96791, and DNA58725. The actual nucleotide sequence of the clones can readily be determined by the skilled artisan by sequencing of the deposited clone using routine methods in the art. The predicted amino acid sequences can be determined from the nucleotide sequences using routine skill. For the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558,

20 PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptides and encoding nucleic acid described herein, Applicants have identified what are believed to be the reading frames best identifiable with the sequence information available at the time.

25 B. PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 and PRO4980 Variants

In addition to the full-length native sequence PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 and PRO4980 polypeptides described herein, it is contemplated that PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725,

30 PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 and PRO4980 variants can be prepared. PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245,

35

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 and PRO4980 variants can be prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 DNA, and/or by synthesis of the desired PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide. Those skilled in the art will appreciate that amino acid changes may alter post-translational processes of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980, such as changing the number or position of glycosylation sites or altering the membrane anchoring characteristics.

Variations in the native full-length sequence PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 or in various domains of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 described herein, can be made, for example, using any of the techniques and guidelines for conservative and non-conservative mutations set forth, for instance, in U.S. Patent No. 5,364,934. Variations may be a substitution, deletion or insertion of one or more codons encoding the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 that results in a change in the amino acid sequence of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 as compared with the native sequence PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980. Optionally the variation is by substitution of at least one amino acid with any other amino acid in one or more of the domains of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980. Guidance in determining which amino acid residue may be inserted, substituted or deleted without adversely affecting the desired activity may be found by comparing the sequence of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 with that of homologous known protein molecules and minimizing the number of amino acid sequence changes made in regions of high homology. Amino acid substitutions can be the result of replacing one amino acid with another amino acid having similar structural and/or chemical properties, such as the replacement of a leucine with a serine, *i.e.*, conservative amino acid replacements. Insertions or deletions may optionally be in the range of about 1 to 5 amino acids. The variation allowed may be determined by systematically making insertions, deletions or substitutions of amino acids in the sequence and testing the resulting variants for activity exhibited by the full-length or mature native sequence.

PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 and PRO4980 polypeptide fragments are provided herein. Such fragments may be truncated at the N-terminus or C-terminus, or may lack internal residues, for example, when compared with a full-length native protein. Certain fragments lack amino acid residues that are not essential for a desired biological activity of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide.

PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 fragments may be prepared by any of a number of conventional techniques. Desired peptide fragments may be chemically synthesized. An alternative approach involves generating PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 fragments by enzymatic digestion, *e.g.*, by treating the protein with an enzyme known to cleave proteins at sites defined by particular amino acid residues, or by digesting the DNA with suitable restriction enzymes and isolating the desired fragment. Yet another suitable technique involves isolating and amplifying a DNA fragment encoding a desired polypeptide fragment, by polymerase chain reaction (PCR). Oligonucleotides that define the desired termini of the DNA fragment are employed at the 5' and 3' primers in the PCR. Preferably, PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide fragments share at least one biological and/or immunological activity with the native PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, 5 PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide.

In particular embodiments, conservative substitutions of interest are shown in Table 3 under the heading of preferred substitutions. If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated exemplary substitutions in Table 3, or as further described below in reference to amino acid 10 classes, are introduced and the products screened.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 3

	Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
5	Ala (A)	val; leu; ile	val
	Arg (R)	lys; gln; asn	lys
	Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
	Asp (D)	glu	glu
	Cys (C)	ser	ser
10	Gln (Q)	asn	asn
	Glu (E)	asp	asp
	Gly (G)	pro; ala	ala
	His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
	Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
15	Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
	Lys (K)	arg; gln; asn	arg
	Met (M)	leu; phe; ile	leu
	Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
	Pro (P)	ala	ala
20	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; norleucine	leu

Substantial modifications in function or immunological identity of the polypeptide are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

- (1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;
- (3) acidic: asp, glu;
- (4) basic: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and
- (6) aromatic: trp, tyr, phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class. Such substituted residues also may be introduced into the conservative substitution sites or, more preferably, into the remaining (non-conserved) sites.

The variations can be made using methods known in the art such as oligonucleotide-mediated (site-directed) mutagenesis, alanine scanning, and PCR mutagenesis. Site-directed mutagenesis [Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], cassette mutagenesis [Wells *et al.*, Gene, 34:315 (1985)], restriction selection mutagenesis [Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415

WO 01/53486

PCT/US00/03565

(1986)] or other known techniques can be performed on the cloned DNA to produce the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or

5 PRO4980 variant DNA.

Scanning amino acid analysis can also be employed to identify one or more amino acids along a contiguous sequence. Among the preferred scanning amino acids are relatively small, neutral amino acids. Such amino acids include alanine, glycine, serine, and cysteine. Alanine is typically a preferred scanning amino acid among this group because it eliminates the side-chain beyond the beta-carbon and is less likely to alter the main-chain conformation of the variant [Cunningham and Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989)]. Alanine is also typically preferred because it is the most common amino acid. Further, it is frequently found in both buried and exposed positions [Creighton, *The Proteins* (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. If alanine substitution does not yield adequate amounts of variant, an isoteric amino acid can be used.

C. Modifications of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 and PRO4980

Covalent modifications of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 and PRO4980 are included within the scope of this invention. One type of covalent modification includes reacting targeted amino acid residues of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the N- or C-terminal residues of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980. Derivatization with bifunctional agents is useful, for instance, for crosslinking PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 to a water-insoluble support matrix or surface for use in the method for purifying anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibodies, and vice-versa. Commonly used crosslinking agents include, *e.g.*, 1,1-bis(diazoacetyl)-2-phenylethane, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimide esters, for example, esters with 4-azidosalicylic acid, homobifunctional imidoesters, including

5 disuccinimidyl esters such as 3,3'-dithiobis(succinimidylpropionate), bifunctional maleimides such as bis-N-maleimido-1,8-octane and agents such as methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propionimide.

Other modifications include deamidation of glutaminyl and asparaginyl residues to the corresponding glutamyl and aspartyl residues, respectively, hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl or threonyl residues, methylation of the α -amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains

10 [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], acetylation of the N-terminal amine, and amidation of any C-terminal carboxyl group.

Another type of covalent modification of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216,

15 PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide included within the scope of this invention comprises altering the native glycosylation pattern of the polypeptide. "Altering the native glycosylation pattern" is intended for purposes herein to mean deleting one or more carbohydrate moieties found in native sequence PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725,

20 PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 (either by removing the underlying glycosylation site or by deleting the glycosylation by chemical and/or enzymatic means), and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the native sequence PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133,

25 PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980. In addition, the phrase includes qualitative changes in the glycosylation of the native proteins, involving a change in the nature and proportions of the various carbohydrate moieties present.

Addition of glycosylation sites to the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269,

30 PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide may be accomplished by altering the amino acid sequence. The alteration may be made, for example, by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the native sequence PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243,

35 PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 (for O-linked glycosylation sites). The PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

- PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 amino acid sequence may optionally be altered through changes at the DNA level, particularly by mutating the DNA encoding the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide at preselected bases such that codons are generated that will translate into the desired amino acids.
- Another means of increasing the number of carbohydrate moieties on the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide is by chemical or enzymatic coupling of glycosides to the polypeptide. Such methods are described in the art, e.g., in WO 87/05330 published 11 September 1987, and in Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 15 pp. 259-306 (1981).
- Removal of carbohydrate moieties present on the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide may be accomplished chemically or enzymatically or by mutational substitution of codons encoding for amino acid residues that serve as targets for glycosylation. Chemical deglycosylation techniques are known in the art and described, for instance, by Hakimuddin, *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) and by Edge *et al.*, Anal. Biochem., 118:131 (1981). Enzymatic cleavage of carbohydrate moieties on polypeptides can be achieved by the use of a variety of endo- and exo-glycosidases as described by Thotakura *et al.*, Meth. Enzymol., 138:350 (1987).
- Another type of covalent modification of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 comprises linking the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol, or polyoxyalkylenes, in the manner set forth in U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337.
- The PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 of the present invention may also be modified in a way to form a

WO 01/53486

PCT/US00/03565

chimeric molecule comprising PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 fused to another, heterologous polypeptide or amino acid sequence.

In one embodiment, such a chimeric molecule comprises a fusion of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 with a tag polypeptide which provides an epitope to which an anti-tag antibody can selectively bind. The epitope tag is generally placed at the amino- or carboxyl-terminus of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980. The presence of such epitope-tagged forms of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 can be detected using an antibody against the tag polypeptide. Also, provision of the epitope tag enables the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 to be readily purified by affinity purification using an anti-tag antibody or another type of affinity matrix that binds to the epitope tag. Various tag polypeptides and their respective antibodies are well known in the art. Examples include poly-histidine (poly-His) or poly-histidine-glycine (poly-His-gly) tags; the flu HA tag polypeptide and its antibody 12CA5 [Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; the c-myc tag and the 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 and 9E10 antibodies thereto [Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; and the Herpes Simplex virus glycoprotein D (gD) tag and its antibody [Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Other tag polypeptides include the Flag-peptide [Hopp *et al.*, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; the KT3 epitope peptide [Martin *et al.*, Science, 255:192-194 (1992)]; an α -tubulin epitope peptide [Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; and the T7 gene 10 protein peptide tag [Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

In an alternative embodiment, the chimeric molecule may comprise a fusion of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 with an immunoglobulin or a particular region of an immunoglobulin. For a bivalent form of the chimeric molecule (also referred to as an "immunoadhesin"), such a fusion could be to the Fc region of an IgG molecule.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

The Ig fusions preferably include the substitution of a soluble (transmembrane domain deleted or inactivated) form of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide in place of at least one variable region within an Ig molecule. In a particularly preferred embodiment, the immunoglobulin fusion includes the hinge, CH2 and CH3, or the hinge, CH1, CH2 and CH3 regions of an IgG1 molecule. For the production of immunoglobulin fusions *see* also, US Patent No. 5,428,130 issued June 27, 1995.

D. Preparation of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304,

10 PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 Polypeptides

The description below relates primarily to production of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 by culturing cells transformed or transfected with a vector containing PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 nucleic acid. It is, of course, contemplated that alternative methods, which are well known in the art, may be employed to prepare PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980. For instance, the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 sequence, or portions thereof, may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques [*see, e.g., Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963)]. *In vitro* protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be accomplished, for instance, using an Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) using manufacturer's instructions. Various portions of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 may be chemically synthesized separately and combined using chemical or enzymatic methods to produce the full-length PRO197, PRO207,

15
20
25
30
35

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980.

- 5 a. Isolation of DNA Encoding a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 Polypeptide
- DNA encoding PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 may be obtained from a cDNA library prepared from tissue believed to possess the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 mRNA and to express it at a detectable level. Accordingly, human PRO197, human PRO207, human PRO226, human PRO232, human PRO243, human PRO256, human PRO269, human PRO274, human PRO304, human PRO339, human PRO1558, human PRO779, human PRO1185, human PRO1245, human PRO1759, human PRO5775, human PRO7133, human PRO7168, human PRO5725, human PRO202, human PRO206, human PRO264, human PRO313, human PRO342, human PRO542, human PRO773, human PRO861, human PRO1216, human PRO1686, human PRO1800, human PRO3562, human PRO9850, human PRO539, human PRO4316 or human PRO4980 DNA can be conveniently obtained from a cDNA library prepared from human tissue, such as described in the Examples. PRO197-, PRO207-, PRO226-, PRO232-, PRO243-, PRO256-, PRO269-, PRO274-, PRO304-, PRO339-, PRO1558-, PRO779-, PRO1185-, PRO1245-, PRO1759-, PRO5775-, PRO7133-, PRO7168-, PRO5725-, PRO202-, PRO206-, PRO264-, PRO313-, PRO342-, PRO542-, PRO773-, PRO861-, PRO1216-, PRO1686-, PRO1800-, PRO3562-, PRO9850-, PRO539-, PRO4316- or PRO4980-encoding gene may also be obtained from a genomic library or by oligonucleotide synthesis.
- Libraries can be screened with probes (such as antibodies to the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, or oligonucleotides of at least about 20-80 bases) designed to identify the gene of interest or the protein encoded by it. Screening the cDNA or genomic library with the selected probe may be conducted using standard procedures, such as described in Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). An alternative means to isolate the gene encoding PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 is to use PCR methodology [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

The Examples below describe techniques for screening a cDNA library. The oligonucleotide sequences selected as probes should be of sufficient length and sufficiently unambiguous that false positives are minimized. The oligonucleotide is preferably labeled such that it can be detected upon hybridization to DNA in the library being screened. Methods of labeling are well known in the art, and include the use of radiolabels like ³²P-labeled ATP, biotinylation or enzyme labeling. Hybridization conditions, including moderate stringency and high stringency, are provided in Sambrook *et al.*, *supra*.

Sequences identified in such library screening methods can be compared and aligned to other known sequences deposited and available in public databases such as GenBank or other private sequence databases. Sequence identity (at either the amino acid or nucleotide level) within defined regions of the molecule or across the full-length sequence can be determined using methods known in the art and as described herein.

Nucleic acid having protein coding sequence may be obtained by screening selected cDNA or genomic libraries using the deduced amino acid sequence disclosed herein for the first time, and, if necessary, using conventional primer extension procedures as described in Sambrook *et al.*, *supra*, to detect precursors and processing intermediates of mRNA that may not have been reverse-transcribed into cDNA.

b. Selection and Transformation of Host Cells

Host cells are transfected or transformed with expression or cloning vectors described herein for PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences. The culture conditions, such as media, temperature, pH and the like, can be selected by the skilled artisan without undue experimentation. In general, principles, protocols, and practical techniques for maximizing the productivity of cell cultures can be found in Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) and Sambrook *et al.*, *supra*.

Methods of eukaryotic cell transfection and prokaryotic cell transformation are known to the ordinarily skilled artisan, for example, CaCl_2 , CaPO_4 , liposome-mediated and electroporation. Depending on the host cell used, transformation is performed using standard techniques appropriate to such cells. The calcium treatment employing calcium chloride, as described in Sambrook *et al.*, *supra*, or electroporation is generally used for prokaryotes. Infection with *Agrobacterium tumefaciens* is used for transformation of certain plant cells, as described by Shaw *et al.*, Gene, 23:315 (1983) and WO 89/05859 published 29 June 1989. For mammalian cells without such cell walls, the calcium phosphate precipitation method of Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978) can be employed. General aspects of mammalian cell host system transfections have been described in U.S. Patent No. 4,399,216. Transformations into yeast are typically carried out according to the method of Van

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) and Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). However, other methods for introducing DNA into cells, such as by nuclear microinjection, electroporation, bacterial protoplast fusion with intact cells, or polycations, *e.g.*, polybrene, polyornithine, may also be used. For various techniques for transforming mammalian cells, *see*, Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) and Mansour *et al.*, *Nature*, 336:348-352 (1988).

Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein include prokaryote, yeast, or higher eukaryote cells. Suitable prokaryotes include but are not limited to eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms, for example, Enterobacteriaceae such as *E. coli*. Various *E. coli* strains are publicly available, such as *E. coli* K12 strain MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* strain W3110 (ATCC 27,325) and *E. coli* strain K5 772 (ATCC 53,635). Other suitable prokaryotic host cells include Enterobacteriaceae such as *Escherichia*, *e.g.*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *e.g.*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, *e.g.*, *Serratia marcescens*, and *Shigella*, as well as *Bacilli* such as *B. subtilis* and *B. licheniformis* (*e.g.*, *B. licheniformis* 41P disclosed in DD 266,710 published 12 April 1989), *Pseudomonas* such as *P. aeruginosa*, and *Streptomyces*. These examples are illustrative rather than limiting. Strain W3110 is one particularly preferred host or parent host because it is a common host strain for recombinant DNA product fermentations. Preferably, the host cell secretes minimal amounts of proteolytic enzymes. For example, strain W3110 may be modified to effect a genetic mutation in the genes encoding proteins endogenous to the host, with examples of such hosts including *E. coli* W3110 strain 1A2, which has the complete genotype *tonA*; *E. coli* W3110 strain 9E4, which has the complete genotype *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 strain 27C7 (ATCC 55,244), which has the complete genotype *tonA ptr3 phaA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan'*; *E. coli* W3110 strain 37D6, which has the complete genotype *tonA ptr3 phaA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan'*; *E. coli* W3110 strain 40B4, which is strain 37D6 with a non-kanamycin resistant *degP* deletion mutation; and an *E. coli* strain having mutant periplasmic protease disclosed in U.S. Patent No. 4,946,783 issued 7 August 1990. Alternatively, *in vitro* methods of cloning, *e.g.*, PCR or other nucleic acid polymerase reactions, are suitable.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning or expression hosts for PRO197-, PRO207-, PRO226-, PRO232-, PRO243-, PRO256-, PRO269-, PRO274-, PRO304, PRO339-, PRO1558-, PRO779-, PRO1185-, PRO1245-, PRO1759-, PRO5775-, PRO7133-, PRO7168-, PRO5725-, PRO202-, PRO206-, PRO264-, PRO313-, PRO342-, PRO542-, PRO773-, PRO861-, PRO1216-, PRO1686-, PRO1800-, PRO3562-, PRO9850-, PRO539-, PRO4316- or PRO4980-encoding vectors. *Saccharomyces cerevisiae* is a commonly used lower eukaryotic host microorganism. Others include *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; EP 139,383 published 2 May 1985); *Kluyveromyces* hosts (U.S. Patent No. 4,943,529; Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991)) such as, *e.g.*, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, *J. Bacteriol.*, 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilum* (ATCC 36,906; Vanden Berg *et al.*, *Bio/Technology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, and *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna *et al.*, *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesi* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* such as *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 published 31 October 1990); and filamentous fungi such as, *e.g.*,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Neurospora, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 published 10 January 1991), and *Aspergillus* hosts such as *A. nidulans* (Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn *et al.*, Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 [1984]) and *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Methylotrophic yeasts are suitable herein and include, but are not limited to, yeast capable of growth on methanol selected from the genera consisting of *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, and *Rhodotorula*. A list of specific species that are exemplary of this class of yeasts may be found in C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

Suitable host cells for the expression of glycosylated PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 are derived from multicellular organisms. Examples of invertebrate cells include insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9, as well as plant cells. Examples of useful mammalian host cell lines include Chinese hamster ovary (CHO) and COS cells. More specific examples include monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham *et al.*, J. Gen. Virol., 36:59 (1977)); Chinese hamster ovary cells/-DHFR (CHO), Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980); mouse sertoli cells (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); and mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51). The selection of the appropriate host cell is deemed to be within the skill in the art.

20 c. Selection and Use of a Replicable Vector

The nucleic acid (*e.g.*, cDNA or genomic DNA) encoding PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 may be inserted into a replicable vector for cloning (amplification of the DNA) or for expression. Various vectors are publicly available. The vector may, for example, be in the form of a plasmid, cosmid, viral particle, or phage. The appropriate nucleic acid sequence may be inserted into the vector by a variety of procedures. In general, DNA is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) using techniques known in the art. Vector components generally include, but are not limited to, one or more of a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence. Construction of suitable vectors containing one or more of these components employs standard ligation techniques which are known to the skilled artisan.

The PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 may be produced recombinantly not only directly, but also as a fusion polypeptide with a heterologous polypeptide, which may be a signal sequence or other polypeptide having a specific

WO 01/53486

PCT/US00/03565

cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide. In general, the signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of the PRO197-, PRO207-, PRO226-, PRO232-, PRO243-, PRO256-, PRO269-, PRO274-, PRO304-, PRO339-, PRO1558-, PRO779-, PRO1185-, PRO1245-, PRO1759-, PRO5775-, PRO7133-, PRO7168-, PRO5725-, PRO202-, PRO206-, PRO264-, PRO313-, PRO342-, PRO542-, PRO773-, PRO861-, PRO1216-, PRO1686-, PRO1800-, PRO3562-, PRO9850-, PRO539-, PRO4316- or PRO4980-encoding DNA that is inserted into the vector. The signal sequence may be a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, lpp, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion the signal sequence may be, e.g., the yeast invertase leader, alpha factor leader (including *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* α -factor leaders, the latter described in U.S. Patent No. 5,010,182), or acid phosphatase leader, the *C. albicans* glucoamylase leader (EP 362,179 published 4 April 1990), or the signal described in WO 90/13646 published 15 November 1990. In mammalian cell expression, mammalian signal sequences may be used to direct secretion of the protein, such as signal sequences from secreted polypeptides of the same or related species, as well as viral secretory leaders.

Both expression and cloning vectors contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. Such sequences are well known for a variety of bacteria, yeast, and viruses. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria, the 2 μ plasmid origin is suitable for yeast, and various viral origins (SV40, polyoma, adenovirus, VSV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells.

Expression and cloning vectors will typically contain a selection gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients not available from complex media, e.g., the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*.

An example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the PRO197-, PRO207-, PRO226-, PRO232-, PRO243-, PRO256-, PRO269-, PRO274-, PRO304-, PRO339-, PRO1558-, PRO779-, PRO1185-, PRO1245-, PRO1759-, PRO5775-, PRO7133-, PRO7168-, PRO5725-, PRO202-, PRO206-, PRO264-, PRO313-, PRO342-, PRO542-, PRO773-, PRO861-, PRO1216-, PRO1686-, PRO1800-, PRO3562-, PRO9850-, PRO539-, PRO4316- or PRO4980-encoding nucleic acid, such as DHFR or thymidine kinase. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the CHO cell line deficient in DHFR activity, prepared and propagated as described by Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). A suitable selection gene for use in yeast is the *trp1* gene present in the yeast plasmid YRp7 [Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10:157 (1980)]. The *trp1* gene provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example, ATCC No. 44076 or PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

Expression and cloning vectors usually contain a promoter operably linked to the PRO197-, PRO207-, PRO226-, PRO232-, PRO243-, PRO256-, PRO269-, PRO274-, PRO304-, PRO339-, PRO1558-, PRO779-, PRO1185-, PRO1245-, PRO1759-, PRO5775-, PRO7133-, PRO7168-, PRO5725-, PRO202-, PRO206-, PRO264-, PRO313-, PRO342-, PRO542-, PRO773-, PRO861-, PRO1216-, PRO1686-, PRO1800-, PRO3562-, PRO9850-, PRO539-, PRO4316- or PRO4980-encoding nucleic acid sequence to direct mRNA synthesis. Promoters

WO 01/53486

PCT/US00/03565

- recognized by a variety of potential host cells are well known. Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the β -lactamase and lactose promoter systems [Chang *et al.*, *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature*, 281:544 (1979)], alkaline phosphatase, a tryptophan (trp) promoter system [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36,776], and hybrid promoters such as the tac promoter [deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Promoters for use in bacterial systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980.
- Examples of suitable promoting sequences for use with yeast hosts include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase [Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] or other glycolytic enzymes [Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Res.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase.
- Other yeast promoters, which are inducible promoters having the additional advantage of transcription controlled by growth conditions, are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytchrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, metallothionein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in EP 73,657.
- PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 transcription from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus (UK 2,211,504 published 5 July 1989), adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40), from heterologous mammalian promoters, e.g., the actin promoter or an immunoglobulin promoter, and from heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.
- Transcription of a DNA encoding the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp, that act on a promoter to increase its transcription. Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase, albumin, α -fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side

WO 01/53486

PCT/US00/03565

of the replication origin, and adenovirus enhancers. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 coding sequence, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors used in eukaryotic host cells (yeast, fungi, insect, plant, animal, human, or nucleated cells from other multicellular organisms) will also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and, occasionally 3', untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980.

Still other methods, vectors, and host cells suitable for adaptation to the synthesis of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 in recombinant vertebrate cell culture are described in Gething *et al.*, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060; and EP 117,058.

d. Detecting Gene Amplification/Expression

Gene amplification and/or expression may be measured in a sample directly, for example, by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequences provided herein. Alternatively, antibodies may be employed that can recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes. The antibodies in turn may be labeled and the assay may be carried out where the duplex is bound to a surface, so that upon the formation of duplex on the surface, the presence of antibody bound to the duplex can be detected.

Gene expression, alternatively, may be measured by immunological methods, such as immunohistochemical staining of cells or tissue sections and assay of cell culture or body fluids, to quantitate directly the expression of gene product. Antibodies useful for immunohistochemical staining and/or assay of sample fluids may be either monoclonal or polyclonal, and may be prepared in any mammal. Conveniently, the antibodies may be prepared against a native sequence PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide or against a synthetic peptide based on the DNA sequences provided herein or against an exogenous sequence fused to PRO197,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 DNA and encoding a specific antibody epitope.

5 e. Purification of Polypeptide

Forms of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 may be recovered from culture medium or from host cell
10 lysates. If membrane-bound, it can be released from the membrane using a suitable detergent solution (e.g., Triton-X 100) or by enzymatic cleavage. Cells employed in expression of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 can be disrupted by
15 various physical or chemical means, such as freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or cell lysing agents.

It may be desired to purify PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686,
20 PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 from recombinant cell proteins or polypeptides. The following procedures are exemplary of suitable purification procedures: by fractionation on an ion-exchange column; ethanol precipitation; reverse phase HPLC; chromatography on silica or on a cation-exchange resin such as DEAE; chromatofocusing; SDS-PAGE; ammonium sulfate precipitation; gel filtration using, for example, Sephadex G-75; protein A Sepharose columns to remove contaminants such as IgG; and metal chelating columns to bind epitope-tagged forms of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274,
25 PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980. Various methods of protein purification may be employed and such methods are known in the art and described for example in Deutscher, Methods in
30 Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982). The purification step(s) selected will depend, for example, on the nature of the production process used and the particular PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562,
35 PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 produced.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

E. Amplification of Genes Encoding PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 Polypeptides in Tumor Tissues and

5 Cell Lines

The present invention is based on the identification and characterization of genes that are amplified in certain cancer cells.

The genome of prokaryotic and eukaryotic organisms is subjected to two seemingly conflicting requirements. One is the preservation and propagation of DNA as the genetic information in its original form, to
10 guarantee stable inheritance through multiple generations. On the other hand, cells or organisms must be able to adapt to lasting environmental changes. The adaptive mechanisms can include qualitative or quantitative modifications of the genetic material. Qualitative modifications include DNA mutations, in which coding sequences are altered resulting in a structurally and/or functionally different protein. Gene amplification is a quantitative modification, whereby the actual number of complete coding sequence, *i.e.*, a gene, increases, leading to an
15 increased number of available templates for transcription, an increased number of translatable transcripts, and, ultimately, to an increased abundance of the protein encoded by the amplified gene.

The phenomenon of gene amplification and its underlying mechanisms have been investigated *in vitro* in several prokaryotic and eukaryotic culture systems. The best-characterized example of gene amplification involves the culture of eukaryotic cells in medium containing variable concentrations of the cytotoxic drug methotrexate
20 (MTX). MTX is a folic acid analogue and interferes with DNA synthesis by blocking the enzyme dihydrofolate reductase (DHFR). During the initial exposure to low concentrations of MTX most cells (>99.9%) will die. A small number of cells survive, and are capable of growing in increasing concentrations of MTX by producing large amounts of DHFR-RNA and protein. The basis of this overproduction is the amplification of the single DHFR gene. The additional copies of the gene are found as extrachromosomal copies in the form of small, supernumerary
25 chromosomes (double minutes) or as integrated chromosomal copies.

Gene amplification is most commonly encountered in the development of resistance to cytotoxic drugs (antibiotics for bacteria and chemotherapeutic agents for eukaryotic cells) and neoplastic transformation. Transformation of a eukaryotic cell as a spontaneous event or due to a viral or chemical/environmental insult is typically associated with changes in the genetic material of that cell. One of the most common genetic changes
30 observed in human malignancies are mutations of the p53 protein. p53 controls the transition of cells from the stationary (G1) to the replicative (S) phase and prevents this transition in the presence of DNA damage. In other words, one of the main consequences of disabling p53 mutations is the accumulation and propagation of DNA damage, *i.e.*, genetic changes. Common types of genetic changes in neoplastic cells are, in addition to point mutations, amplifications and gross, structural alterations, such as translocations.

The amplification of DNA sequences may indicate a specific functional requirement as illustrated in the DHFR experimental system. Therefore, the amplification of certain oncogenes in malignancies points toward a causative role of these genes in the process of malignant transformation and maintenance of the transformed
35 phenotype. This hypothesis has gained support in recent studies. For example, the *bcl-2* protein was found to be

WO 01/53486

PCT/US00/03565

amplified in certain types of non-Hodgkin's lymphoma. This protein inhibits apoptosis and leads to the progressive accumulation of neoplastic cells. Members of the gene family of growth factor receptors have been found to be amplified in various types of cancers suggesting that overexpression of these receptors may make neoplastic cells less susceptible to limiting amounts of available growth factor. Examples include the amplification of the androgen
 5 receptor in recurrent prostate cancer during androgen deprivation therapy and the amplification of the growth factor receptor homologue ERB2 in breast cancer. Lastly, genes involved in intracellular signaling and control of cell cycle progression can undergo amplification during malignant transformation. This is illustrated by the amplification of the *bcl-1* and *ras* genes in various epithelial and lymphoid neoplasms.

These earlier studies illustrate the feasibility of identifying amplified DNA sequences in neoplasms, because this approach can identify genes important for malignant transformation. The case of ERB2 also demonstrates the feasibility from a therapeutic standpoint, since transforming proteins may represent novel and specific targets for tumor therapy.

Several different techniques can be used to demonstrate amplified genomic sequences. Classical cytogenetic analysis of chromosome spreads prepared from cancer cells is adequate to identify gross structural alterations, such as translocations, deletions and inversions. Amplified genomic regions can only be visualized, if
 15 they involve large regions with high copy numbers or are present as extrachromosomal material. While cytogenetics was the first technique to demonstrate the consistent association of specific chromosomal changes with particular neoplasms, it is inadequate for the identification and isolation of manageable DNA sequences. The more recently developed technique of comparative genomic hybridization (CGH) has illustrated the widespread phenomenon of genomic amplification in neoplasms. Tumor and normal DNA are hybridized simultaneously onto metaphases of
 20 normal cells and the entire genome can be screened by image analysis for DNA sequences that are present in the tumor at an increased frequency. (WO 93/18,186; Gray *et al.*, *Radiation Res.*, 137:275-289 [1994]). As a screening method, this type of analysis has revealed a large number of recurring amplicons (a stretch of amplified DNA) in a variety of human neoplasms. Although CGH is more sensitive than classical cytogenetic analysis in identifying
 25 amplified stretches of DNA, it does not allow a rapid identification and isolation of coding sequences within the amplicon by standard molecular genetic techniques.

The most sensitive methods to detect gene amplification are polymerase chain reaction (PCR)-based assays. These assays utilize very small amount of tumor DNA as starting material, are exquisitely sensitive, provide DNA that is amenable to further analysis, such as sequencing and are suitable for high-volume throughput analysis.

The above-mentioned assays are not mutually exclusive, but are frequently used in combination to identify
 30 amplifications in neoplasms. While cytogenetic analysis and CGH represent screening methods to survey the entire genome for amplified regions, PCR-based assays are most suitable for the final identification of coding sequences, *i.e.*, genes in amplified regions.

According to the present invention, such genes have been identified by quantitative PCR (S. Gelmini *et al.*, *Clin. Chem.*, 43:752 [1997]), by comparing DNA from a variety of primary tumors, including breast, lung, colon, prostate, brain, liver, kidney, pancreas, spleen, thymus, testis, ovary, uterus, etc., tumor, or tumor cell lines, with pooled DNA from healthy donors. Quantitative PCR was performed using a TaqMan™ instrument (ABI). Gene-specific primers and fluorogenic probes were designed based upon the coding sequences of the DNAs.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Human lung carcinoma cell lines include A549 (SRCC768), Calu-1 (SRCC769), Calu-6 (SRCC770), H157 (SRCC771), H441 (SRCC772), H460 (SRCC773), SKMES-1 (SRCC774), SW900 (SRCC775), H522 (SRCC832), and H810 (SRCC833), all available from ATCC. Primary human lung tumor cells usually derive from adenocarcinomas, squamous cell carcinomas, large cell carcinomas, non-small cell carcinomas, small cell carcinomas, and broncho alveolar carcinomas, and include, for example, SRCC724 (adenocarcinoma, abbreviated as "AdenoCa") (LT1), SRCC725 (squamous cell carcinoma, abbreviated as "SqCCa") (LT1a), SRCC726 (adenocarcinoma) (LT2), SRCC727 (adenocarcinoma) (LT3), SRCC728 (adenocarcinoma) (LT4), SRCC729 (squamous cell carcinoma) (LT6), SRCC730 (adeno/squamous cell carcinoma) (LT7), SRCC731 (adenocarcinoma) (LT9), SRCC732 (squamous cell carcinoma) (LT10), SRCC733 (squamous cell carcinoma) (LT11), SRCC734 (adenocarcinoma) (LT12), SRCC735 (adeno/squamous cell carcinoma) (LT13), SRCC736 (squamous cell carcinoma) (LT15), SRCC737 (squamous cell carcinoma) (LT16), SRCC738 (squamous cell carcinoma) (LT17), SRCC739 (squamous cell carcinoma) (LT18), SRCC740 (squamous cell carcinoma) (LT19), SRCC741 (lung cell carcinoma, abbreviated as "LCCa") (LT21), SRCC811 (adenocarcinoma) (LT22), SRCC825 (adenocarcinoma) (LT8), SRCC886 (adenocarcinoma) (LT25), SRCC887 (squamous cell carcinoma) (LT26), SRCC888 (adeno-BAC carcinoma) (LT27), SRCC889 (squamous cell carcinoma) (LT28), SRCC890 (squamous cell carcinoma) (LT29), SRCC891 (adenocarcinoma) (LT30), SRCC892 (squamous cell carcinoma) (LT31), SRCC894 (adenocarcinoma) (LT33). Also included are human lung tumors designated SRCC1125 [HF-000631], SRCC1127 [HF-000641], SRCC1129 [HF-000643], SRCC1133 [HF-000840], SRCC1135 [HF-000842], SRCC1227 [HF-001291], SRCC1229 [HF-001293], SRCC1230 [HF-001294], SRCC1231 [HF-001295], SRCC1232 [HF-001296], SRCC1233 [HF-001297], SRCC1235 [HF-001299], and SRCC1236 [HF-001300].

Colon cancer cell lines include, for example, ATCC cell lines SW480 (adenocarcinoma, SRCC776), SW620 (lymph node metastasis of colon adenocarcinoma, SRCC777), Colo320 (carcinoma, SRCC778), HT29 (adenocarcinoma, SRCC779), HM7 (a high mucin producing variant of ATCC colon adenocarcinoma cell line, SRCC780, obtained from Dr. Robert Warren, UCSF), CaWiDr (adenocarcinoma, SRCC781), HCT116 (carcinoma, SRCC782), SKCO1 (adenocarcinoma, SRCC783), SW403 (adenocarcinoma, SRCC784), LS174T (carcinoma, SRCC785), Colo205 (carcinoma, SRCC828), HCT15 (carcinoma, SRCC829), HCC2998 (carcinoma, SRCC830), and KM12 (carcinoma, SRCC831). Primary colon tumors include colon adenocarcinomas designated CT2 (SRCC742), CT3 (SRCC743), CT8 (SRCC744), CT10 (SRCC745), CT12 (SRCC746), CT14 (SRCC747), CT15 (SRCC748), CT16 (SRCC749), CT17 (SRCC750), CT1 (SRCC751), CT4 (SRCC752), CT5 (SRCC753), CT6 (SRCC754), CT7 (SRCC755), CT9 (SRCC756), CT11 (SRCC757), CT18 (SRCC758), CT19 (adenocarcinoma, SRCC906), CT20 (adenocarcinoma, SRCC907), CT21 (adenocarcinoma, SRCC908), CT22 (adenocarcinoma, SRCC909), CT23 (adenocarcinoma, SRCC910), CT24 (adenocarcinoma, SRCC911), CT25 (adenocarcinoma, SRCC912), CT26 (adenocarcinoma, SRCC913), CT27 (adenocarcinoma, SRCC914), CT28 (adenocarcinoma, SRCC915), CT29 (adenocarcinoma, SRCC916), CT30 (adenocarcinoma, SRCC917), CT31 (adenocarcinoma, SRCC918), CT32 (adenocarcinoma, SRCC919), CT33 (adenocarcinoma, SRCC920), CT35 (adenocarcinoma, SRCC921), and CT36 (adenocarcinoma, SRCC922). Also included are human colon tumor centers designated SRCC1051 [HF-000499], SRCC1052 [HF-000539], SRCC1053 [HF-000575], SRCC1054 [HF-000698], SRCC1059 [HF-000755], SRCC1060 [HF-000756], SRCC1142 [HF-000762], SRCC1144 [HF-000789],

WO 01/53486

PCT/US00/03565

SRCC1146 [HF-000795] and SRCC1148[HF-000811].

Human breast carcinoma cell lines include, for example, HBL100 (SRCC759), MB435s (SRCC760), T47D (SRCC761), MB468 (SRCC762), MB175 (SRCC763), MB361 (SRCC764), BT20 (SRCC765), MCF7 (SRCC766), and SKBR3 (SRCC767), and human breast tumor center designated SRCC1057 [HF-000545]. Also included are
 5 human breast tumors designated SRCC1094, SRCC1095, SRCC1096, SRCC1097, SRCC1098, SRCC1099, SRCC1100, SRCC1101, and human breast-met-lung-NS tumor designated SRCC893 [LT 32].

Human rectum tumors include SRCC981 [HF-000550] and SRCC982 [HF-000551].

Human kidney tumor centers include SRCC989 [HF-000611] and SRCC1014 [HF-000613].

Human testis tumor center include SRCC1001 [HF-000733] and testis tumor margin SRCC999 [HF-
 10 000716].

Human parathyroid tumors include SRCC1002 [HF-000831] and SRCC1003 [HF-000832].

Human lymph node tumors include SRCC1004 [HF-000854], SRCC1005 [HF-000855], and SRCC1006 [HF-000856].

F. Tissue Distribution

15 The results of the gene amplification assays herein can be verified by further studies, such as, by determining mRNA expression in various human tissues.

As noted before, gene amplification and/or gene expression in various tissues may be measured by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 [1980]), dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately
 20 labeled probe, based on the sequences provided herein. Alternatively, antibodies may be employed that can recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes.

Gene expression in various tissues, alternatively, may be measured by immunological methods, such as immunohistochemical staining of tissue sections and assay of cell culture or body fluids, to quantitate directly the
 25 expression of gene product. Antibodies useful for immunohistochemical staining and/or assay of sample fluids may be either monoclonal or polyclonal, and may be prepared in any mammal. Conveniently, the antibodies may be prepared against a native sequence PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686,
 30 PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide or against a synthetic peptide based on the DNA sequences provided herein or against exogenous sequence fused to sequence PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or
 35 PRO4980 DNA and encoding a specific antibody epitope. General techniques for generating antibodies, and special protocols for Northern blotting and *in situ* hybridization are provided hereinbelow.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

G. Chromosome Mapping

If the amplification of a given gene is functionally relevant, then that gene should be amplified more than neighboring genomic regions which are not important for tumor survival. To test this, the gene can be mapped to a particular chromosome, *e.g.*, by radiation-hybrid analysis. The amplification level is then determined at the location identified, and at the neighboring genomic region. Selective or preferential amplification at the genomic region to which the gene has been mapped is consistent with the possibility that the gene amplification observed promotes tumor growth or survival. Chromosome mapping includes both framework and epicenter mapping. For further details see, *e.g.*, Stewart *et al.*, Genome Research, 7:422-433 (1997).

H. Antibody Binding Studies

The results of the gene amplification study can be further verified by antibody binding studies, in which the ability of anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibodies to inhibit the expression of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptides on tumor (cancer) cells is tested. Exemplary antibodies include polyclonal, monoclonal, humanized, bispecific, and heteroconjugate antibodies, the preparation of which will be described hereinbelow.

Antibody binding studies may be carried out in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

Competitive binding assays rely on the ability of a labeled standard to compete with the test sample analyte for binding with a limited amount of antibody. The amount of target protein (encoded by a gene amplified in a tumor cell) in the test sample is inversely proportional to the amount of standard that becomes bound to the antibodies. To facilitate determining the amount of standard that becomes bound, the antibodies preferably are insolubilized before or after the competition, so that the standard and analyte that are bound to the antibodies may conveniently be separated from the standard and analyte which remain unbound.

Sandwich assays involve the use of two antibodies, each capable of binding to a different immunogenic portion, or epitope, of the protein to be detected. In a sandwich assay, the test sample analyte is bound by a first antibody which is immobilized on a solid support, and thereafter a second antibody binds to the analyte, thus forming an insoluble three-part complex. See, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,376,110. The second antibody may itself be labeled with a detectable moiety (direct sandwich assays) or may be measured using an anti-immunoglobulin antibody that is labeled with a detectable moiety (indirect sandwich assay). For example, one type of sandwich assay is an ELISA assay, in which case the detectable moiety is an enzyme.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

For immunohistochemistry, the tumor sample may be fresh or frozen or may be embedded in paraffin and fixed with a preservative such as formalin, for example.

I. Cell-Based Tumor Assays

Cell-based assays and animal models for tumors (*e.g.*, cancers) can be used to verify the findings of the gene amplification assay, and further understand the relationship between the genes identified herein and the development and pathogenesis of neoplastic cell growth. The role of gene products identified herein in the development and pathology of tumor or cancer can be tested by using primary tumor cells or cells lines that have been identified to amplify the genes herein. Such cells include, for example, the breast, colon and lung cancer cells and cell lines listed above.

In a different approach, cells of a cell type known to be involved in a particular tumor are transfected with the cDNAs herein, and the ability of these cDNAs to induce excessive growth is analyzed. Suitable cells include, for example, stable tumor cells lines such as, the B104-1-1 cell line (stable NIH-3T3 cell line transfected with the *neu* protooncogene) and *ras*-transfected NIH-3T3 cells, which can be transfected with the desired gene, and monitored for tumorigenic growth. Such transfected cell lines can then be used to test the ability of poly- or monoclonal antibodies or antibody compositions to inhibit tumorigenic cell growth by exerting cytostatic or cytotoxic activity on the growth of the transformed cells, or by mediating antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Cells transfected with the coding sequences of the genes identified herein can further be used to identify drug candidates for the treatment of cancer.

In addition, primary cultures derived from tumors in transgenic animals (as described below) can be used in the cell-based assays herein, although stable cell lines are preferred. Techniques to derive continuous cell lines from transgenic animals are well known in the art (*see, e.g.*, Small *et al.*, Mol. Cell. Biol., 5:642-648 [1985]).

J. Animal Models

A variety of well known animal models can be used to further understand the role of the genes identified herein in the development and pathogenesis of tumors, and to test the efficacy of candidate therapeutic agents, including antibodies, and other antagonists of the native polypeptides, including small molecule antagonists. The *in vivo* nature of such models makes them particularly predictive of responses in human patients. Animal models of tumors and cancers (*e.g.*, breast cancer, colon cancer, prostate cancer, lung cancer, etc.) include both non-recombinant and recombinant (transgenic) animals. Non-recombinant animal models include, for example, rodent, *e.g.*, murine models. Such models can be generated by introducing tumor cells into syngeneic mice using standard techniques, *e.g.*, subcutaneous injection, tail vein injection, spleen implantation, intraperitoneal implantation, implantation under the renal capsule, or orthopin implantation, *e.g.*, colon cancer cells implanted in colonic tissue. (*See, e.g.*, PCT publication No. WO 97/33551, published September 18, 1997).

Probably the most often used animal species in oncological studies are immunodeficient mice and, in particular, nude mice. The observation that the nude mouse with hypo/aplasia could successfully act as a host for human tumor xenografts has lead to its widespread use for this purpose. The autosomal recessive *nu* gene has been introduced into a very large number of distinct congenic strains of nude mouse, including, for example, A^{SW}, A/He,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

AKR, BALB/c, B10.LP, C17, C3H, C57BL, C57, CBA, DBA, DDD, *I/st*, NC, NFR, NFS, NFS/N, NZB, NZC, NZW, P, RIII and SJL. In addition, a wide variety of other animals with inherited immunological defects other than the nude mouse have been bred and used as recipients of tumor xenografts. For further details see, e.g., The Nude Mouse in Oncology Research, E. Boven and B. Winograd, eds., CRC Press, Inc., 1991.

5 The cells introduced into such animals can be derived from known tumor/cancer cell lines, such as, any of the above-listed tumor cell lines, and, for example, the B104-1-1 cell line (stable NIH-3T3 cell line transfected with the *neu* protooncogene); *ras*-transfected NIH-3T3 cells; Caco-2 (ATCC HTB-37); a moderately well-differentiated grade II human colon adenocarcinoma cell line, HT-29 (ATCC HTB-38), or from tumors and cancers. Samples of tumor or cancer cells can be obtained from patients undergoing surgery, using standard conditions, involving freezing and storing in liquid nitrogen (Karmali *et al.*, Br. J. Cancer, 48:689-696 [1983]).

10 Tumor cells can be introduced into animals, such as nude mice, by a variety of procedures. The subcutaneous (s.c.) space in mice is very suitable for tumor implantation. Tumors can be transplanted s.c. as solid blocks, as needle biopsies by use of a trocar, or as cell suspensions. For solid block or trocar implantation, tumor tissue fragments of suitable size are introduced into the s.c. space. Cell suspensions are freshly prepared from primary tumors or stable tumor cell lines, and injected subcutaneously. Tumor cells can also be injected as subdermal implants. In this location, the inoculum is deposited between the lower part of the dermal connective tissue and the s.c. tissue. Boven and Winograd (1991), *supra*.

Animal models of breast cancer can be generated, for example, by implanting rat neuroblastoma cells (from which the *neu* oncogene was initially isolated), or *neu*-transformed NIH-3T3 cells into nude mice, essentially as described by Drebin *et al.*, PNAS USA, 83:9129-9133 (1986).

20 Similarly, animal models of colon cancer can be generated by passaging colon cancer cells in animals, e.g., nude mice, leading to the appearance of tumors in these animals. An orthotopic transplant model of human colon cancer in nude mice has been described, for example, by Wang *et al.*, Cancer Research, 54:4726-4728 (1994) and Too *et al.*, Cancer Research, 55:681-684 (1995). This model is based on the so-called "METAMOUSE" sold by AntiCancer, Inc., (San Diego, California).

25 Tumors that arise in animals can be removed and cultured *in vitro*. Cells from the *in vitro* cultures can then be passaged to animals. Such tumors can serve as targets for further testing or drug screening. Alternatively, the tumors resulting from the passage can be isolated and RNA from pre-passage cells and cells isolated after one or more rounds of passage analyzed for differential expression of genes of interest. Such passaging techniques can be performed with any known tumor or cancer cell lines.

30 For example, Meth A, CMS4, CMS5, CMS21, and WEHI-164 are chemically induced fibrosarcomas of BALB/c female mice (DeLeo *et al.*, J. Exp. Med., 146:720 [1977]), which provide a highly controllable model system for studying the anti-tumor activities of various agents (Palladino *et al.*, J. Immunol., 138:4023-4032 [1987]). Briefly, tumor cells are propagated *in vitro* in cell culture. Prior to injection into the animals, the cell lines are washed and suspended in buffer, at a cell density of about 10×10^6 to 10×10^7 cells/ml. The animals are then infected subcutaneously with 10 to 100 μ l of the cell suspension, allowing one to three weeks for a tumor to appear.

In addition, the Lewis lung (3LL) carcinoma of mice, which is one of the most thoroughly studied experimental tumors, can be used as an investigational tumor model. Efficacy in this tumor model has been

WO 01/53486

PCT/US00/03565

correlated with beneficial effects in the treatment of human patients diagnosed with small cell carcinoma of the lung (SCCL). This tumor can be introduced in normal mice upon injection of tumor fragments from an affected mouse or of cells maintained in culture (Zupi *et al.*, Br. J. Cancer, 41:suppl. 4:309 [1980]), and evidence indicates that tumors can be started from injection of even a single cell and that a very high proportion of infected tumor cells survive. For further information about this tumor model see, Zacharski, Haemostasis, 16:300-320 [1986].

One way of evaluating the efficacy of a test compound in an animal model on an implanted tumor is to measure the size of the tumor before and after treatment. Traditionally, the size of implanted tumors has been measured with a slide caliper in two or three dimensions. The measure limited to two dimensions does not accurately reflect the size of the tumor, therefore, it is usually converted into the corresponding volume by using a mathematical formula. However, the measurement of tumor size is very inaccurate. The therapeutic effects of a drug candidate can be better described as treatment-induced growth delay and specific growth delay. Another important variable in the description of tumor growth is the tumor volume doubling time. Computer programs for the calculation and description of tumor growth are also available, such as the program reported by Rygaard and Spang-Thomsen, Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals, Wu and Sheng eds., Basel, 1989, 301. It is noted, however, that necrosis and inflammatory responses following treatment may actually result in an increase in tumor size, at least initially. Therefore, these changes need to be carefully monitored, by a combination of a morphometric method and flow cytometric analysis.

Recombinant (transgenic) animal models can be engineered by introducing the coding portion of the genes identified herein into the genome of animals of interest, using standard techniques for producing transgenic animals. Animals that can serve as a target for transgenic manipulation include, without limitation, mice, rats, rabbits, guinea pigs, sheep, goats, pigs, and non-human primates, *e.g.*, baboons, chimpanzees and monkeys. Techniques known in the art to introduce a transgene into such animals include pronuclear microinjection (Hoppe and Wanger, U.S. Patent No. 4,873,191); retrovirus-mediated gene transfer into germ lines (*e.g.*, Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6148-615 [1985]); gene targeting in embryonic stem cells (Thompson *et al.*, Cell, 56:313-321 [1989]); electroporation of embryos (Lo, Mol. Cell Biol., 3:1803-1814 [1983]); sperm-mediated gene transfer (Lavitrano *et al.*, Cell, 57:717-73 [1989]). For review, see, for example, U.S. Patent No. 4,736,866.

For the purpose of the present invention, transgenic animals include those that carry the transgene only in part of their cells ("mosaic animals"). The transgene can be integrated either as a single transgene, or in concatamers, *e.g.*, head-to-head or head-to-tail tandems. Selective introduction of a transgene into a particular cell type is also possible by following, for example, the technique of Lasko *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6232-636 (1992).

The expression of the transgene in transgenic animals can be monitored by standard techniques. For example, Southern blot analysis or PCR amplification can be used to verify the integration of the transgene. The level of mRNA expression can then be analyzed using techniques such as *in situ* hybridization, Northern blot analysis, PCR, or immunocytochemistry. The animals are further examined for signs of tumor or cancer development.

Alternatively, "knock out" animals can be constructed which have a defective or altered gene encoding a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide identified herein, as a result of homologous recombination between the endogenous gene encoding the polypeptide and altered genomic DNA encoding the same polypeptide introduced

5 into an embryonic cell of the animal. For example, cDNA encoding a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide can be used to clone genomic DNA encoding that polypeptide in accordance with established techniques. A portion

10 of the genomic DNA encoding a particular PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide can be deleted or replaced with another gene, such as a gene encoding a selectable marker which can be used to monitor integration.

15 Typically, several kilobases of unaltered flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the vector [see, e.g., Thomas and Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) for a description of homologous recombination vectors]. The vector is introduced into an embryonic stem cell line (e.g., by electroporation) and cells in which the introduced DNA has homologously recombined with the endogenous DNA are selected [see, e.g., Li *et al.*, *Cell*, 69:915 (1992)]. The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (e.g., a mouse or rat) to form aggregation

20 chimeras [see, e.g., Bradley, in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal and the embryo brought to term to create a "knock out" animal. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be identified by standard techniques and used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously recombined DNA. Knockout animals

25 can be characterized for instance, by their ability to defend against certain pathological conditions and by their development of pathological conditions due to absence of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide.

30 The efficacy of antibodies specifically binding the polypeptides identified herein and other drug candidates, can be tested also in the treatment of spontaneous animal tumors. A suitable target for such studies is the feline oral squamous cell carcinoma (SCC). Feline oral SCC is a highly invasive, malignant tumor that is the most common oral malignancy of cats, accounting for over 60% of the oral tumors reported in this species. It rarely metastasizes to distant sites, although this low incidence of metastasis may merely be a reflection of the short survival times for

35 cats with this tumor. These tumors are usually not amenable to surgery, primarily because of the anatomy of the feline oral cavity. At present, there is no effective treatment for this tumor. Prior to entry into the study, each cat undergoes complete clinical examination, biopsy, and is scanned by computed tomography (CT). Cats diagnosed with sublingual oral squamous cell tumors are excluded from the study. The tongue can become paralyzed as a

WO 01/53486

PCT/US00/03565

result of such tumor, and even if the treatment kills the tumor, the animals may not be able to feed themselves. Each cat is treated repeatedly, over a longer period of time. Photographs of the tumors will be taken daily during the treatment period, and at each subsequent recheck. After treatment, each cat undergoes another CT scan. CT scans and thoracic radiographs are evaluated every 8 weeks thereafter. The data are evaluated for differences in survival, response and toxicity as compared to control groups. Positive response may require evidence of tumor regression, preferably with improvement of quality of life and/or increased life span.

In addition, other spontaneous animal tumors, such as fibrosarcoma, adenocarcinoma, lymphoma, chondroma, leiomyosarcoma of dogs, cats, and baboons can also be tested. Of these mammary adenocarcinoma in dogs and cats is a preferred model as its appearance and behavior are very similar to those in humans. However, the use of this model is limited by the rare occurrence of this type of tumor in animals.

K. Screening Assays for Drug Candidates

Screening assays for drug candidates are designed to identify compounds that bind or complex with the polypeptides encoded by the genes identified herein, or otherwise interfere with the interaction of the encoded polypeptides with other cellular proteins. Such screening assays will include assays amenable to high-throughput screening of chemical libraries, making them particularly suitable for identifying small molecule drug candidates. Small molecules contemplated include synthetic organic or inorganic compounds, including peptides, preferably soluble peptides, (poly)peptide-immunoglobulin fusions, and, in particular, antibodies including, without limitation, poly- and monoclonal antibodies and antibody fragments, single-chain antibodies, anti-idiotypic antibodies, and chimeric or humanized versions of such antibodies or fragments, as well as human antibodies and antibody fragments. The assays can be performed in a variety of formats, including protein-protein binding assays, biochemical screening assays, immunoassays and cell based assays, which are well characterized in the art.

All assays are common in that they call for contacting the drug candidate with a polypeptide encoded by a nucleic acid identified herein under conditions and for a time sufficient to allow these two components to interact.

In binding assays, the interaction is binding and the complex formed can be isolated or detected in the reaction mixture. In a particular embodiment, the polypeptide encoded by the gene identified herein or the drug candidate is immobilized on a solid phase, *e.g.*, on a microtiter plate, by covalent or non-covalent attachments. Non-covalent attachment generally is accomplished by coating the solid surface with a solution of the polypeptide and drying. Alternatively, an immobilized antibody, *e.g.*, a monoclonal antibody, specific for the polypeptide to be immobilized can be used to anchor it to a solid surface. The assay is performed by adding the non-immobilized component, which may be labeled by a detectable label, to the immobilized component, *e.g.*, the coated surface containing the anchored component. When the reaction is complete, the non-reacted components are removed, *e.g.*, by washing, and complexes anchored on the solid surface are detected. When the originally non-immobilized component carries a detectable label, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexing occurred. Where the originally non-immobilized component does not carry a label, complexing can be detected, for example, by using a labeled antibody specifically binding the immobilized complex.

If the candidate compound interacts with but does not bind to a particular PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide encoded by a gene identified herein, its interaction with that polypeptide can be assayed by methods well known for detecting protein-protein interactions. Such assays include traditional approaches, such as, cross-linking, co-immunoprecipitation, and co-purification through gradients or chromatographic columns. In addition, protein-protein interactions can be monitored by using a yeast-based genetic system described by Fields and co-workers [Fields and Song, *Nature*, 340:245-246 (1989); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9578-9582 (1991)] as disclosed by Chevray and Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5789-5793 (1991)]. Many transcriptional activators, such as yeast GAL4, consist of two physically discrete modular domains, one acting as the DNA-binding domain, while the other one functioning as the transcription activation domain. The yeast expression system described in the foregoing publications (generally referred to as the "two-hybrid system") takes advantage of this property, and employs two hybrid proteins, one in which the target protein is fused to the DNA-binding domain of GAL4, and another, in which candidate activating proteins are fused to the activation domain. The expression of a *GAL1-lacZ* reporter gene under control of a GAL4-activated promoter depends on reconstitution of GAL4 activity via protein-protein interaction. Colonies containing interacting polypeptides are detected with a chromogenic substrate for β -galactosidase. A complete kit (MATCHMAKER™) for identifying protein-protein interactions between two specific proteins using the two-hybrid technique is commercially available from Clontech. This system can also be extended to map protein domains involved in specific protein interactions as well as to pinpoint amino acid residues that are crucial for these interactions.

Compounds that interfere with the interaction of a PRO197-, PRO207-, PRO226-, PRO232-, PRO243-, PRO256-, PRO269-, PRO274-, PRO304-, PRO339-, PRO1558-, PRO779-, PRO1185-, PRO1245-, PRO1759-, PRO5775-, PRO7133-, PRO7168-, PRO5725-, PRO202-, PRO206-, PRO264-, PRO313-, PRO342-, PRO542-, PRO773-, PRO861-, PRO1216-, PRO1686-, PRO1800-, PRO3562-, PRO9850-, PRO539-, PRO4316- or PRO4980-encoding gene identified herein and other intra- or extracellular components can be tested as follows: usually a reaction mixture is prepared containing the product of the amplified gene and the intra- or extracellular component under conditions and for a time allowing for the interaction and binding of the two products. To test the ability of a test compound to inhibit binding, the reaction is run in the absence and in the presence of the test compound. In addition, a placebo may be added to a third reaction mixture, to serve as positive control. The binding (complex formation) between the test compound and the intra- or extracellular component present in the mixture is monitored as described hereinabove. The formation of a complex in the control reaction(s) but not in the reaction mixture containing the test compound indicates that the test compound interferes with the interaction of the test compound and its reaction partner.

To assay for antagonists, the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide may be added to a cell along with the compound to be screened for a particular activity and the ability of the compound to inhibit the activity of interest in the presence of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide indicates that the compound is an antagonist to the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide. Alternatively, antagonists may be detected by combining the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide and a potential antagonist with membrane-bound PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide receptors or recombinant receptors under appropriate conditions for a competitive inhibition assay. The PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide can be labeled, such as by radioactivity, such that the number of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide molecules bound to the receptor can be used to determine the effectiveness of the potential antagonist. The gene encoding the receptor can be identified by numerous methods known to those of skill in the art, for example, ligand panning and FACS sorting. Coligan *et al.*, Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991). Preferably, expression cloning is employed wherein polyadenylated RNA is prepared from a cell responsive to the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide and a cDNA library created from this RNA is divided into pools and used to transfect COS cells or other cells that are not responsive to the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide. Transfected cells that are grown on glass slides are exposed to labeled PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216,

PCT/US00/03565

5 PRO4980 polypeptide can be labeled by a variety of means including iodination or inclusion of a recognition site for a site-specific protein kinase. Following fixation and incubation, the slides are subjected to autoradiographic analysis. Positive pools are identified and sub-pools are prepared and re-transfected using an interactive sub-pooling and re-screening process, eventually yielding a single clone that encodes the putative receptor.

10 PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide can be photoaffinity-linked with cell membrane or extract preparations that express the receptor molecule. Cross-linked material is resolved by PAGE and exposed to X-ray film. The labeled complex containing the receptor can be excised, resolved into peptide fragments, and subjected to protein micro-sequencing. The amino acid sequence obtained from micro-sequencing would be used to design a set of degenerate oligonucleotide probes to screen a cDNA library to identify the gene encoding the putative receptor.

20 PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide in the presence of the candidate compound. The ability of the compound to enhance or block this interaction could then be measured.

25 immunoglobulin with the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO1768, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, and, in particular, antibodies including, without
30 limitation, poly- and monoclonal antibodies and antibody fragments, single-chain antibodies, anti-idiotypic antibodies, and chimeric or humanized versions of such antibodies or fragments, as well as human antibodies and antibody fragments. Alternatively, a potential antagonist may be a closely related protein, for example, a mutated form of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO1768, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide that recognizes the receptor but imparts no effect, thereby
35 competitively inhibiting the action of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO1768, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide.

Another potential PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide antagonist is an antisense RNA or DNA construct prepared using antisense technology, where, e.g., an antisense RNA or DNA molecule acts to block directly the translation of mRNA by hybridizing to targeted mRNA and preventing protein translation. Antisense technology can be used to control gene expression through triple-helix formation or antisense DNA or RNA, both of which methods are based on binding of a polynucleotide to DNA or RNA. For example, the 5' coding portion of the polynucleotide sequence, which encodes the mature PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide herein, is used to design an antisense RNA oligonucleotide of from about 10 to 40 base pairs in length. A DNA oligonucleotide is designed to be complementary to a region of the gene involved in transcription (triple helix - see, Lee *et al.*, Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, Science, 241: 456 (1988); Dervan *et al.*, Science, 251:1360 (1991)), thereby preventing transcription and the production of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide. The antisense RNA oligonucleotide hybridizes to the mRNA *in vivo* and blocks translation of the mRNA molecule into the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide (antisense - Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). The oligonucleotides described above can also be delivered to cells such that the antisense RNA or DNA may be expressed *in vivo* to inhibit production of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide. When antisense DNA is used, oligodeoxyribonucleotides derived from the translation-initiation site, e.g., between about -10 and +10 positions of the target gene nucleotide sequence, are preferred.

Antisense RNA or DNA molecules are generally at least about 5 bases in length, about 10 bases in length, about 15 bases in length, about 20 bases in length, about 25 bases in length, about 30 bases in length, about 35 bases in length, about 40 bases in length, about 45 bases in length, about 50 bases in length, about 55 bases in length, about 60 bases in length, about 65 bases in length, about 70 bases in length, about 75 bases in length, about 80 bases in length, about 85 bases in length, about 90 bases in length, about 95 bases in length, about 100 bases in length,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

or more.

Potential antagonists include small molecules that bind to the active site, the receptor binding site, or growth factor or other relevant binding site of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, thereby blocking the normal biological activity of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide. Examples of small molecules include, but are not limited to, small peptides or peptide-like molecules, preferably soluble peptides, and synthetic non-peptidyl organic or inorganic compounds.

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. Ribozymes act by sequence-specific hybridization to the complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Specific ribozyme cleavage sites within a potential RNA target can be identified by known techniques. For further details see, e.g., Rossi, *Current Biology*, 4:469-471 (1994), and PCT publication No. WO 97/33551 (published September 18, 1997).

Nucleic acid molecules in triple-helix formation used to inhibit transcription should be single-stranded and composed of deoxynucleotides. The base composition of these oligonucleotides is designed such that it promotes triple-helix formation via Hoogsteen base-pairing rules, which generally require sizeable stretches of purines or pyrimidines on one strand of a duplex. For further details see, e.g., PCT publication No. WO 97/33551, *supra*.

These small molecules can be identified by any one or more of the screening assays discussed hereinabove and/or by any other screening techniques well known for those skilled in the art.

L. Compositions and Methods for the Treatment of Tumors

The compositions useful in the treatment of tumors associated with the amplification of the genes identified herein include, without limitation, antibodies, small organic and inorganic molecules, peptides, phosphopeptides, antisense and ribozyme molecules, triple helix molecules, etc., that inhibit the expression and/or activity of the target gene product.

For example, antisense RNA and RNA molecules act to directly block the translation of mRNA by hybridizing to targeted mRNA and preventing protein translation. When antisense DNA is used, oligodeoxynucleotides derived from the translation initiation site, e.g., between about -10 and +10 positions of the target gene nucleotide sequence, are preferred.

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. Ribozymes act by sequence-specific hybridization to the complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Specific ribozyme cleavage sites within a potential RNA target can be identified by known techniques. For further details see, e.g., Rossi, *Current Biology*, 4:469-471 (1994), and PCT publication No. WO 97/33551 (published September 18, 1997).

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Nucleic acid molecules in triple helix formation used to inhibit transcription should be single-stranded and composed of deoxynucleotides. The base composition of these oligonucleotides is designed such that it promotes triple helix formation via Hoogsteen base pairing rules, which generally require sizeable stretches of purines or pyrimidines on one strand of a duplex. For further details *see, e.g.*, PCT publication No. WO 97/33551, *supra*.

5 These molecules can be identified by any or any combination of the screening assays discussed hereinabove and/or by any other screening techniques well known for those skilled in the art.

M. Antibodies

Some of the most promising drug candidates according to the present invention are antibodies and antibody fragments which may inhibit the production or the gene product of the amplified genes identified herein and/or
10 reduce the activity of the gene products.

1. Polyclonal Antibodies

Methods of preparing polyclonal antibodies are known to the skilled artisan. Polyclonal antibodies can be raised in a mammal, for example, by one or more injections of an immunizing agent and, if desired, an adjuvant. Typically, the immunizing agent and/or adjuvant will be injected in the mammal by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections. The immunizing agent may include the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243,
15 PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide or a fusion protein thereof. It may be useful to conjugate the immunizing agent to a protein known to be immunogenic in the
20 mammal being immunized. Examples of such immunogenic proteins include but are not limited to keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, and soybean trypsin inhibitor. Examples of adjuvants which may be employed include Freund's complete adjuvant and MPL-TDM adjuvant (monophosphoryl Lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate). The immunization protocol may be selected by one skilled in the art without undue experimentation.

2. Monoclonal Antibodies

The anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686,
30 anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibodies may, alternatively, be monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies may be prepared using hybridoma methods, such as those described by Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). In a hybridoma method, a mouse, hamster, or other appropriate host animal, is typically immunized with an immunizing agent to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the immunizing agent. Alternatively, the
35 lymphocytes may be immunized *in vitro*.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

The immunizing agent will typically include the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, including fragments, or a fusion protein of such protein or a fragment thereof. Generally, either peripheral blood lymphocytes ("PBLs") are used if cells of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used if non-human mammalian sources are desired. The lymphocytes are then fused with an immortalized cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Immortalized cell lines are usually transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine and human origin. Usually, rat or mouse myeloma cell lines are employed. The hybridoma cells may be cultured in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, immortalized cells. For example, if the parental cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine ("HAT medium"), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred immortalized cell lines are those that fuse efficiently, support stable high level expression of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. More preferred immortalized cell lines are murine myeloma lines, which can be obtained, for instance, from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginia. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63].

The culture medium in which the hybridoma cells are cultured can then be assayed for the presence of monoclonal antibodies directed against PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Such techniques and assays are known in the art. The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

After the desired hybridoma cells are identified, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods [Goding, *supra*]. Suitable culture media for this purpose include, for example, Dulbecco's Modified Eagle's Medium and RPMI-1640 medium. Alternatively, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites in a mammal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones may be isolated or purified from the culture medium or ascites fluid by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

The monoclonal antibodies may also be made by recombinant DNA methods, such as those described in U.S. Patent No. 4,816,567. DNA encoding the monoclonal antibodies of the invention can be readily isolated and sequenced using conventional procedures (*e.g.*, by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells of the invention serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences [U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, *supra*] or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. Such a non-immunoglobulin polypeptide can be substituted for the constant domains of an antibody of the invention, or can be substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent antibody.

The antibodies may be monovalent antibodies. Methods for preparing monovalent antibodies are well known in the art. For example, one method involves recombinant expression of immunoglobulin light chain and modified heavy chain. The heavy chain is truncated generally at any point in the Fc region so as to prevent heavy chain crosslinking. Alternatively, the relevant cysteine residues are substituted with another amino acid residue or are deleted so as to prevent crosslinking.

In vitro methods are also suitable for preparing monovalent antibodies. Digestion of antibodies to produce fragments thereof, particularly, Fab fragments, can be accomplished using routine techniques known in the art.

3. Human and Humanized Antibodies

The anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibodies may further comprise humanized antibodies or human antibodies. Humanized forms of non-human (*e.g.*, murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab)', or other antigen-binding subsequences of antibodies) which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. Humanized antibodies include human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementary determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, Fv framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Humanized antibodies may also comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those

WO 01/53486

PCT/US00/03565

of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

- 5 Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*,
10 *Science*, 239:1534-1536 (1988)], by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567), wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous
15 sites in rodent antibodies.

- Human antibodies can also be produced using various techniques known in the art, including phage display libraries [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. The techniques of Cole *et al.*, and Boerner *et al.*, are also available for the preparation of human monoclonal antibodies (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) and Boerner *et al.*,
20 *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)]. Similarly, human antibodies can be made by introducing of human immunoglobulin loci into transgenic animals, e.g., mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. Upon challenge, human antibody production is observed, which closely resembles that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and antibody repertoire. This approach is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126;
25 5,633,425; 5,661,016, and in the following scientific publications: Marks *et al.*, *BioTechnology*, 10:779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature*, 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368:812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14:826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995).

4. Antibody Dependent Enzyme Mediated Prodrug Therapy (ADEPT)

- 30 The antibodies of the present invention may also be used in ADEPT by conjugating the antibody to a prodrug-activating enzyme which converts a prodrug (e.g., a peptidyl chemotherapeutic agent, *see* WO 81/01145) to an active anti-cancer drug. *See*, for example, WO 88/07378 and U. S. Patent No. 4,975,278.

The enzyme component of the immunoconjugate useful for ADEPT includes any enzyme capable of acting on a prodrug in such as way so as to convert it into its more active, cytotoxic form.

- 35 Enzymes that are useful in the method of this invention include, but are not limited to, glycosidase, glucose oxidase, human lysosyme, human glucuronidase, alkaline phosphatase useful for converting phosphate-containing prodrugs into free drugs; arylsulfatase useful for converting sulfate-containing prodrugs into free drugs; cytosine

WO 01/53486

PCT/US00/03565

deaminase useful for converting non-toxic 5-fluorocytosine into the anti-cancer drug 5-fluorouracil; proteases, such as serratio protease, thermolysin, subtilisin, carboxypeptidases (*e.g.*, carboxypeptidase G2 and carboxypeptidase A) and cathepsins (such as cathepsins B and L), that are useful for converting peptide-containing prodrugs into free drugs; D-alanylcarboxypeptidases, useful for converting prodrugs that contain D-amino acid substituents;

5 carbohydrate-cleaving enzymes such as β -galactosidase and neuraminidase useful for converting glycosylated prodrugs into free drugs; β -lactamase useful for converting drugs derivatized with β -lactams into free drugs; and penicillin amidases, such as penicillin Vamidase or penicillin G amidase, useful for converting drugs derivatized at their amine nitrogens with phenoxyacetyl or phenylacetyl groups, respectively, into free drugs. Alternatively, antibodies with enzymatic activity, also known in the art as "abzymes" can be used to convert the prodrugs of the

10 invention into free active drugs (*see, e.g.*, Massey, *Nature*, 328:457-458 (1987)). Antibody-abzyme conjugates can be prepared as described herein for delivery of the abzyme to a tumor cell population.

The enzymes of this invention can be covalently bound to the anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773,

15 anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibodies by techniques well known in the art such as the use of the heterobifunctional cross-linking agents discussed above. Alternatively, fusion proteins comprising at least the antigen binding region of the antibody of the invention linked to at least a functionally active portion of an enzyme of the invention can be constructed using recombinant DNA techniques well known in the art (*see, e.g.*, Neuberger *et al.*, *Nature*, 312:604-608 (1984)).

20

5. Bispecific Antibodies

Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present case, one of the binding specificities is for the

25 PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 the other one is for any other antigen, and preferably for a cell-surface protein or receptor or receptor subunit.

30 Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chains have different specificities (Milstein and Cuello, *Nature*, 305:537-539 [1983]). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The

35 purification of the correct molecule is usually accomplished by affinity chromatography steps. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829, published 13 May 1993, and in Trautnecker *et al.*, *EMBO L*, 10:3655-3659 (1991).

Antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) can

WO 01/53486

PCT/US00/03565

be fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy-chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light-chain binding present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy-chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

According to another approach described in WO 96/27011, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the CH3 region of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (*e.g.*, tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (*e.g.*, alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments (*e.g.*, F(ab')₂ bispecific antibodies). Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate F(ab')₂ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

Fab' fragments may be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody F(ab')₂ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain

WO 01/53486

PCT/US00/03565

variable domain (V_L) by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V_H and V_L domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See, Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt *et al.*, *J. Immunol.*, 147:60 (1991).

Exemplary bispecific antibodies may bind to two different epitopes on a given polypeptide herein. Alternatively, an anti-polypeptide arm may be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (*e.g.*, CD2, CD3, CD28, or B7), or Fc receptors for IgG (FcγR), such as FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the cell expressing the particular polypeptide. Bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to cells which express a particular polypeptide. These antibodies possess a polypeptide-binding arm and an arm which binds a cytotoxic agent or a radionuclide chelator, such as EOTUBE, DPTA, DOTA, or TETA. Another bispecific antibody of interest binds the polypeptide and further binds tissue factor (TF).

6. Heteroconjugate Antibodies

Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells [U.S. Patent No. 4,676,980], and for treatment of HIV infection [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. It is contemplated that the antibodies may be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iodoacetamide and methyl-4-mercaptobutyrimidate and those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 4,676,980.

7. Effector function engineering

It may be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, so as to enhance the effectiveness of the antibody in treating cancer, for example. For example, cysteine residue(s) may be introduced in the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated may have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See, Caron *et al.*, *J. Exp. Med.*, 176:1191-1195 (1992) and Shopes, *J. Immunol.*, 148:2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity may also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff *et al.*, *Cancer Research*, 53:2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered which has dual Fc regions and may thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. See, Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230 (1989).

WO 01/53486

PCT/US00/03565

8. Immunokonjugates

The invention also pertains to immunokonjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, toxin (e.g., an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant or animal origin, or fragments thereof, or a small molecule toxin), or a radioactive isotope (i.e., a radioconjugate).

- 5 Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunokonjugates have been described above. Enzymatically active protein toxins and fragments thereof which can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, cholera toxin, botulinus toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcain, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, saporin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin and the tricothecenes. Small molecule toxins include, for example, calicheamicins, maytansinoids, palytoxin and CC1065. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include ^{213}Bi , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y and ^{186}Re .

- 15 Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta *et al.*, Science, **238**:1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionuclide to the antibody. See, WO94/11026.

- 25 In another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such as streptavidin) for utilization in tumor pretargeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (e.g., avidin) which is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a radionuclide).

9. Immunoliposomes

- The antibodies disclosed herein may also be formulated as immunoliposomes. Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**:3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**:4030 (1980); and U.S. Patent Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556.

- 35 Particularly useful liposomes can be generated by the reverse phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of the antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in Martin *et al.*, J. Biol. Chem., **257**:286-288 (1982) via a disulfide interchange reaction. A chemotherapeutic agent (such as Doxorubicin) is optionally contained within the liposome. See, Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst., **81**(19):1484

WO 01/53486

PCT/US00/03565

(1989).

N. Pharmaceutical Compositions

Antibodies specifically binding the product of an amplified gene identified herein, as well as other molecules identified by the screening assays disclosed hereinbefore, can be administered for the treatment of tumors, including cancers, in the form of pharmaceutical compositions.

If the protein encoded by the amplified gene is intracellular and whole antibodies are used as inhibitors, internalizing antibodies are preferred. However, lipofections or liposomes can also be used to deliver the antibody, or an antibody fragment, into cells. Where antibody fragments are used, the smallest inhibitory fragment which specifically binds to the binding domain of the target protein is preferred. For example, based upon the variable region sequences of an antibody, peptide molecules can be designed which retain the ability to bind the target protein sequence. Such peptides can be synthesized chemically and/or produced by recombinant DNA technology (see, e.g., Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893 [1993]).

Therapeutic formulations of the antibody are prepared for storage by mixing the antibody having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. [1980]), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and *m*-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g., Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN™, PLURONICS™ or polyethylene glycol (PEG).

Non-antibody compounds identified by the screening assays of the present invention can be formulated in an analogous manner, using standard techniques well known in the art.

The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Alternatively, or in addition, the composition may comprise a cytotoxic agent, cytokine or growth inhibitory agent. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. (1980).

WO 01/53486

PCT/US00/03565

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, *e.g.*, films or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOTTM (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. When encapsulated antibodies remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37°C, resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies can be devised for stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying

15 sulfhydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

O. Methods of Treatment

It is contemplated that the antibodies and other anti-tumor compounds of the present invention may be used to treat various conditions, including those characterized by overexpression and/or activation of the amplified genes identified herein. Exemplary conditions or disorders to be treated with such antibodies and other compounds, including, but not limited to, small organic and inorganic molecules, peptides, antisense molecules, etc., include benign or malignant tumors (*e.g.*, renal, liver, kidney, bladder, breast, gastric, ovarian, colorectal, prostate, pancreatic, lung, vulval, thyroid, hepatic carcinomas; sarcomas; glioblastomas; and various head and neck tumors); leukemias and lymphoid malignancies; other disorders such as neuronal, glial, astrocytal, hypothalamic and other glandular, macrophagal, epithelial, stromal and blastocoelic disorders; and inflammatory, angiogenic and immunologic disorders.

The anti-tumor agents of the present invention, *e.g.*, antibodies, are administered to a mammal, preferably a human, in accord with known methods, such as intravenous administration as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation routes. Intravenous administration of the antibody is preferred.

Other therapeutic regimens may be combined with the administration of the anti-cancer agents, *e.g.*, antibodies of the instant invention. For example, the patient to be treated with such anti-cancer agents may also receive radiation therapy. Alternatively, or in addition, a chemotherapeutic agent may be administered to the patient. Preparation and dosing schedules for such chemotherapeutic agents may be used according to manufacturers' instructions or as determined empirically by the skilled practitioner. Preparation and dosing schedules for such chemotherapy are also described in Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Baltimore, MD (1992). The chemotherapeutic agent may precede, or follow administration of the anti-tumor agent, *e.g.*, antibody, or may be given simultaneously therewith. The antibody may be combined with an anti-oestrogen compound such as tamoxifen or an anti-progesterone such as onapristone (*see*, EP 616812) in dosages known for such molecules.

5 It may be desirable to also administer antibodies against other tumor associated antigens, such as antibodies which bind to the ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, or vascular endothelial factor (VEGF). Alternatively, or in addition, two or more antibodies binding the same or two or more different antigens disclosed herein may be co-administered to the patient. Sometimes, it may be beneficial to also administer one or more cytokines to the patient. In a preferred embodiment, the antibodies herein are co-administered with a growth inhibitory agent. For example, 10 the growth inhibitory agent may be administered first, followed by an antibody of the present invention. However, simultaneous administration or administration of the antibody of the present invention first is also contemplated. Suitable dosages for the growth inhibitory agent are those presently used and may be lowered due to the combined action (synergy) of the growth inhibitory agent and the antibody herein.

For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of an anti-tumor agent, *e.g.*, an antibody 15 herein will depend on the type of disease to be treated, as defined above, the severity and course of the disease, whether the agent is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the agent, and the discretion of the attending physician. The agent is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments.

For example, depending on the type and severity of the disease, about 1 $\mu\text{g/kg}$ to 15 mg/kg (*e.g.*, 0.1-20 20 mg/kg) of antibody is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. A typical daily dosage might range from about 1 $\mu\text{g/kg}$ to 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs. However, other dosage regimens may be useful. The progress of this therapy is easily monitored by 25 conventional techniques and assays.

P. Articles of Manufacture

In another embodiment of the invention, an article of manufacture containing materials useful for the diagnosis or treatment of the disorders described above is provided. The article of manufacture comprises a container and a label. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, and test tubes. The 30 containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds a composition which is effective for diagnosing or treating the condition and may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). The active agent in the composition is usually an anti-tumor agent capable of interfering with the activity of a gene product identified herein, *e.g.*, an antibody. The label on, or associated with, the container indicates that 35 the composition is used for diagnosing or treating the condition of choice. The article of manufacture may further comprise a second container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user

WO 01/53486

PCT/US00/03565

standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, syringes, and package inserts with instructions for use.

Q. Diagnosis and Prognosis of Tumors

While cell surface proteins, such as growth receptors overexpressed in certain tumors are excellent targets for drug candidates or tumor (e.g., cancer) treatment, the same proteins along with secreted proteins encoded by the genes amplified in tumor cells find additional use in the diagnosis and prognosis of tumors. For example, antibodies directed against the protein products of genes amplified in tumor cells can be used as tumor diagnostics or prognostics.

For example, antibodies, including antibody fragments, can be used to qualitatively or quantitatively detect the expression of proteins encoded by the amplified genes ("marker gene products"). The antibody preferably is equipped with a detectable, e.g., fluorescent label, and binding can be monitored by light microscopy, flow cytometry, fluorimetry, or other techniques known in the art. These techniques are particularly suitable, if the amplified gene encodes a cell surface protein, e.g., a growth factor. Such binding assays are performed essentially as described in section 5 above.

In situ detection of antibody binding to the marker gene products can be performed, for example, by immunofluorescence or immunoelectron microscopy. For this purpose, a histological specimen is removed from the patient, and a labeled antibody is applied to it, preferably by overlaying the antibody on a biological sample. This procedure also allows for determining the distribution of the marker gene product in the tissue examined. It will be apparent for those skilled in the art that a wide variety of histological methods are readily available for *in situ* detection.

The following examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

All patent and literature references cited in the present specification are hereby incorporated by reference in their entirety.

EXAMPLES

Commercially available reagents referred to in the examples were used according to manufacturer's instructions unless otherwise indicated. The source of those cells identified in the following examples, and throughout the specification, by ATCC accession numbers is the American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209. All original deposits referred to in the present application were made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty). This assures maintenance of a viable culture of the deposit for 30 years from the date of deposit. The deposit will be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an agreement between Genentech, Inc., and ATCC, which assures permanent and unrestricted availability of the progeny of the culture of the deposit to the public upon issuance of the pertinent U.S. patent or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures availability of the progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto according to 35 USC § 122 and the Commissioner's rules pursuant

WO 01/53486

PCT/US00/03565

thereto (including 37 CFR § 1.14 with particular reference to 886 OG 638).

Unless otherwise noted, the present invention uses standard procedures of recombinant DNA technology, such as those described hereinabove and in the following textbooks: Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press N.Y., 1989; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989; Innis *et al.*, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., N.Y., 1990; Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988; Gait, Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1984; R.I. Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan *et al.*, Current Protocols in Immunology, 1991.

EXAMPLE 1

10 Extracellular Domain Homology Screening to Identify Novel Polypeptides and cDNA Encoding Therefor

The extracellular domain (ECD) sequences (including the secretion signal sequence, if any) from about 950 known secreted proteins from the Swiss-Prot public database were used to search EST databases. The EST databases included public databases (*e.g.*, Dayhoff, GenBank), and proprietary databases (*e.g.* LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). The search was performed using the computer program BLAST or BLAST-2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)) as a comparison of the ECD protein sequences to a 6 frame translation of the EST sequences. Those comparisons with a BLAST score of 70 (or in some cases 90) or greater that did not encode known proteins were clustered and assembled into consensus DNA sequences with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

20 Using this extracellular domain homology screen, consensus DNA sequences were assembled relative to the other identified EST sequences using phrap. In addition, the consensus DNA sequences obtained were often (but not always) extended using repeated cycles of BLAST or BLAST-2 and phrap to extend the consensus sequence as far as possible using the sources of EST sequences discussed above.

Based upon the consensus sequences obtained as described above, oligonucleotides were then synthesized and used to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest and for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for a PRO polypeptide. Forward and reverse PCR primers generally range from 20 to 30 nucleotides and are often designed to give a PCR product of about 100-1000 bp in length. The probe sequences are typically 40-55 bp in length. In some cases, additional oligonucleotides are synthesized when the consensus sequence is greater than about 1-1.5 kbp. In order to screen several libraries for a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification, as per Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, with the PCR primer pair. A positive library was then used to isolate clones encoding the gene of interest using the probe oligonucleotide and one of the primer pairs.

35 The cDNA libraries used to isolate the cDNA clones were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to SalI hemikinased adaptors, cleaved with NotI, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRKB or pRKD; pRK5B is a precursor of pRK5D that does not contain the SfiI site; *see*, Holmes *et al.*, Science, 253:1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NotI sites.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

EXAMPLE 2Isolation of cDNA Clones Using Signal Algorithm Analysis

Various polypeptide-encoding nucleic acid sequences were identified by applying a proprietary signal sequence finding algorithm developed by Genentech, Inc., (South San Francisco, CA) upon ESTs as well as clustered and assembled EST fragments from public (e.g., GenBank) and/or private (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA) databases. The signal sequence algorithm computes a secretion signal score based on the character of the DNA nucleotides surrounding the first and optionally the second methionine codon(s) (ATG) at the 5'-end of the sequence or sequence fragment under consideration. The nucleotides following the first ATG must code for at least 35 unambiguous amino acids without any stop codons. If the first ATG has the required amino acids, the second is not examined. If neither meets the requirement, the candidate sequence is not scored. In order to determine whether the EST sequence contains an authentic signal sequence, the DNA and corresponding amino acid sequences surrounding the ATG codon are scored using a set of seven sensors (evaluation parameters) known to be associated with secretion signals. Use of this algorithm resulted in the identification of numerous polypeptide-encoding nucleic acid sequences.

EXAMPLE 3Isolation of cDNA clones encoding Human PRO197

PRO197 was identified by screening the GenBank database using the computer program BLAST (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)). The PRO197 sequence was shown to have homology with known EST sequences T08223, AA122061, and M62290. None of the known EST sequences have been identified as full-length sequences, or described as ligands associated with TIE receptors. Following identification, PRO197 was cloned from a human fetal lung library prepared from mRNA purchased from Clontech, Inc., (Palo Alto, CA), catalog # 6528-1, following the manufacturer's instructions. The library was screened by hybridization with synthetic oligonucleotide probes.

Based on the ESTs found in the GenBank database, the oligonucleotide sequences used were as follows:

25 5'-ATGAGGTGGCCAAAGCCTGCCGAAGAAAGAGGC-3' (SEQ ID NO:71)
 5'-CAACTGGCTGGGCCATCTCGGGCAGCCTCTTCTTCGGG-3' (SEQ ID NO:72)
 5'-CCCAGCCAGAACTCGCCGTGGGGA-3' (SEQ ID NO:73)

A cDNA clone was identified and sequenced in entirety. The entire nucleotide sequence of DNA22780-1078 is shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1). Clone DNA22780-1078 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 23-25, and a stop codon at nucleotide positions 1382-1384 (Figure 1; SEQ ID NO:1). The predicted polypeptide precursor is 453 amino acids long. The full-length PRO197 protein is shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2).

Analysis of the full-length PRO197 sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2) evidences the presence of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO197 sequence shown in Figure 2 evidences the presence of the following: a transmembrane domain from about amino acid 51 to about amino acid 70; an N-glycosylation site from about amino acid 224 to about amino acid 228; cAMP- and cGMP-dependent protein kinase

WO 01/53486

PCT/US00/03565

phosphorylation sites from about amino acid 46 to about amino acid 50 and from about amino acid 118 to about amino acid 122; N-myristoylation sites from about amino acid 50 to about amino acid 56, from about amino acid 129 to about amino acid 135, from about amino acid 341 to about amino acid 347, and from about amino acid 357 to about amino acid 363; and a fibrinogen beta and gamma chains C-terminal domain signature from about amino acid 396 to about amino acid 409.

Clone DNA22780-1078 has been deposited with ATCC on September 18, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209284. It is understood that the deposited clone has the actual correct sequence rather than the representations provided herein.

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using the ALIGN-2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), evidenced homology between the PRO197 amino acid sequence and ligands associated with TIE receptors. The abbreviation "TIE" is an acronym which stands for "tyrosine kinase containing Ig and EGF homology domains" and was coined to designate a new family of receptor tyrosine kinases.

EXAMPLE 4

Isolation of cDNA clones Encoding Human PRO207

An expressed sequence tag (EST) DNA database (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) was searched and an EST was identified which showed homology to human Apo-2 ligand. A human fetal kidney cDNA library was then screened. mRNA isolated from human fetal kidney tissue (Clontech) was used to prepare the cDNA library. This RNA was used to generate an oligo dT primed cDNA library in the vector pRK5D using reagents and protocols from Life Technologies, Gaithersburg, MD (Super Script Plasmid System). In this procedure, the double stranded cDNA was sized to greater than 1000 bp and the SalI/NotI linker cDNA was cloned into XhoI/NotI cleaved vector. pRK5D is a cloning vector that has an sp6 transcription initiation site followed by an SfiI restriction enzyme site preceding the XhoI/NotI cDNA cloning sites. The library was screened by hybridization with a synthetic oligonucleotide probe:

5'-CCAGCCCTCTGCGCTACAACGCCAGATCGGGGAGTTTATAGTCACCCGG-3' (SEQ ID NO:74) based on the EST.

A cDNA clone was sequenced in entirety. A nucleotide sequence of the full-length DNA30879-1152 is shown in Figure 3 (SEQ ID NO:3). Clone DNA30879-1152 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 58-60 (Figure 3; SEQ ID NO:3) and an apparent stop codon at nucleotide positions 805-807. The predicted polypeptide precursor is 249 amino acids long.

Analysis of the full-length PRO207 sequence shown in Figure 4 (SEQ ID NO:4) evidences the presence of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO207 sequence shown in Figure 4 evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 40; an N-glycosylation site from about amino acid 139 to about amino acid 143; N-myristoylation sites from about amino acid 27 to about amino acid 33, from about amino acid 29 to about amino acid 35, from about amino acid 36 to about amino acid 42, from about amino acid 45 to about amino acid 51, from about amino acid 118 to about amino acid 124, from

WO 01/53486

PCT/US00/03565

about amino acid 121 to about amino acid 127, from about amino acid 125 to about amino acid 131, and from about amino acid 128 to about amino acid 134; amidation sites from about amino acid 10 to about amino acid 14 and from about amino acid 97 to about amino acid 101; and a prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site from about amino acid 24 to about amino acid 35. Clone DNA30879-1152 has been deposited with ATCC on October 10, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209358.

Based on a BLAST and FastA sequence alignment analysis (using the ALIGN-2 computer program) of the full-length PRO207 sequence shown in Figure 4 (SEQ ID NO:4), PRO207 shows amino acid sequence identity to several members of the TNF cytokine family, and particularly, to human lymphotoxin-beta (23.4%) and human CD40 ligand (19.8%).

10

EXAMPLE 5**Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO226**

A consensus DNA sequence was assembled relative to other EST sequences using phrap as described in Example 1 above. This assembled consensus sequence encoding an EGF-like homologue is herein identified as DNA28744. Based on the DNA28744 consensus sequence, oligonucleotides were synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for PRO226.

PCR primers (forward and reverse) were synthesized:

forward PCR primer (28744.f) (OL1556):

5'-ATTCTGCGTGAACTGAGGGC-3' (SEQ ID NO:75)

20

reverse PCR primer (28744.r) (OL1557):

5'-ATCTGCTTGTAGCCCTCGGCAC-3' (SEQ ID NO:76)

Additionally, a synthetic oligonucleotide hybridization probe was constructed from the DNA28744 consensus sequence which had the following nucleotide sequence:

hybridization probe (28744.p) (OL1555):

25 5'-CCTGGCTATCAGCAGGTGGGCTCCAAGTGTCTCGATGTGGATGAGTGTGA-3' (SEQ ID NO:77)

In order to screen several libraries for a source of a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification with the PCR primer pairs identified above. A positive library was then used to isolate clones encoding the PRO226 gene using the probe oligonucleotide and one of the PCR primers. RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from human fetal lung tissue.

30

DNA sequencing of the isolated clones isolated as described above gave the full-length DNA sequence for DNA33460-1166 [Figure 5, SEQ ID NO:5]; and the derived protein sequence for PRO226.

The entire coding sequence of DNA33460-1166 is included in Figure 5 (SEQ ID NO:5). Clone DNA33460-1166 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 62-64, and an apparent stop codon at nucleotide positions 1391-1393. The predicted polypeptide precursor is 443 amino acids long. Analysis of the full-length PRO226 sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those

35

WO 01/53486

PCT/US00/03565

important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO226 polypeptide shown in Figure 6 evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 25; N-glycosylation sites from about amino acid 198 to about amino acid 202 and from about amino acid 394 to about amino acid 398; N-myristoylation sites from about amino acid 76 to about amino acid 82, from about amino acid 145 to about amino acid 151, from about amino acid 182 to about amino acid 188, from about amino acid 222 to about amino acid 228, from about amino acid 290 to about amino acid 296, from about amino acid 305 to about amino acid 311, from about amino acid 371 to about amino acid 377 and from about amino acid 381 to about amino acid 387; and aspartic acid and asparagine hydroxylation sites from about amino acid 140 to about amino acid 152, from about amino acid 177 to about amino acid 189, from about amino acid 217 to about amino acid 229, and from about amino acid 258 to about amino acid 270. Clone DNA33460-1166 has been deposited with the ATCC on October 16, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209376.

Based on a BLAST and FastA sequence alignment analysis of the full-length PRO226 sequence shown in Figure 6 (SEQ ID NO:6), BGF-like homolog DNA33460-1166 shows amino acid sequence identity to HT protein and/or Fibulin (49% and 38%, respectively).

15

EXAMPLE 6Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO232

A consensus DNA sequence was assembled relative to other EST sequences using phrap as described in Example 1 above. This assembled consensus sequence is herein identified as DNA30935, wherein the polypeptide showed similarity to one or more stem cell antigens. Based on the DNA30935 consensus sequence, oligonucleotides were synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for PRO232.

PCR primers (forward and reverse) were synthesized:

forward PCR primer:

5'-TGCTGTGCTACTCTGCAAAGCCC-3' (SEQ ID NO:78)

25

reverse PCR primer:

5'-TGCACAAGTCGGTGTACAGCACG-3' (SEQ ID NO:79)

Additionally, a synthetic oligonucleotide hybridization probe was constructed from the DNA30935 consensus sequence which had the following nucleotide sequence:

hybridization probe:

30 5'-AGCAACGAGGACTGCCTGCAGGTGGAGAACTGCACCCAGCTGGG-3' (SEQ ID NO:80)

In order to screen several libraries for a source of a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification with the PCR primer pairs identified above. A positive library was then used to isolate clones encoding the PRO232 gene using the probe oligonucleotide and one of the PCR primers. RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from human fetal kidney tissue.

35

DNA sequencing of the isolated clones isolated as described above gave the full-length DNA sequence for DNA34435-1140 [Figure 7, SEQ ID NO:7]; and the derived protein sequence for PRO232.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

The entire coding sequence of DNA34435-1140 is included in Figure 7 (SEQ ID NO:7). Clone DNA34435-1140 contains a single open reading frame with apparent stop codon at nucleotide positions 359-361. The predicted polypeptide precursor is 119 amino acids long. Analysis of the full-length PRO232 sequence shown in Figure 8 (SEQ ID NO:8) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the

5 locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO232 polypeptide shown in Figure 8 evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 16; N-glycosylation sites from about amino acid 36 to about amino acid 40, from about amino acid 79 to about amino acid 83, and from about amino acid 89 to about amino acid 93; an N-myristoylation site from about amino acid 61 to about amino acid 67; and an amidation site from about amino acid

10 75 to about amino acid 79. Clone DNA34435-1140 has been deposited with the ATCC on September 16, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209250.

An analysis of the full-length PRO232 sequence shown in Figure 8 (SEQ ID NO:8) suggests that it possesses 35% sequence identity with a stem cell surface antigen from *Gallus gallus*.

EXAMPLE 7

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO243 by Genomic Walking

Introduction:

Human thrombopoietin (THPO) is a glycosylated hormone of 352 amino acids consisting of two domains. The N-terminal domain, sharing 50% similarity to erythropoietin, is responsible for the biological activity. The C-terminal region is required for secretion. The gene for thrombopoietin (THPO) maps to human chromosome 3q27-q28 where the six exons of this gene span 7 kilobase base pairs of genomic DNA (Gurney *et al.*, Blood, 85:981-988 (1995)). In order to determine whether there were any genes encoding THPO homologues located in close proximity to THPO, genomic DNA fragments from this region were identified and sequenced. Three P1 clones and one PAC clone (Genome Systems, Inc., St. Louis, MO; cat. Nos. P1-2535 and PAC-6539) encompassing the THPO locus were isolated and a 140 kb region was sequenced using the ordered shotgun strategy (Chen *et al.* Genomics, 17:651-656 (1993)), coupled with a PCR-based gap filling approach. Analysis reveals that the region is gene-rich with four

20 additional genes located very close to THPO: tumor necrosis factor-receptor type 1 associated protein 2 (TRAP2) and elongation initiation factor gamma (eIF4g), chloride channel 2 (CLCN2) and RNA polymerase II subunit hRPB17. While no THPO homolog was found in the region, four novel genes have been predicted by computer-assisted gene detection (GRAIL)(Xu *et al.*, Gen. Engin., 16:241-253 (1994)), the presence of CpG islands (Cross, S. and Bird, A., Curr. Opin. Genet. & Devel., 5:109-314 (1995)), and homology to known genes (as detected by WU-BLAST2.0) (Altschul and Gish, Methods Enzymol., 266:460-480 (1996)).

25 30

Procedures:

P1 and PAC clones:

The initial human P1 clone was isolated from a genomic P1 library (Genome Systems, Inc., St. Louis, MO; cat no.: P1-2535) screened with PCR primers designed from the THPO genomic sequence (A. L. Gurney, *et al.*, Blood, 85:981-988 (1995)). PCR primers were designed from the end sequences derived from this P1 clone were

35

WO 01/53486

PCT/US00/03565

then used to screen P1 and PAC libraries (Genome Systems, Cat Nos.: P1-2535 & PAC-6539) to identify overlapping clones.

Ordered Shotgun Strategy:

The Ordered Shotgun Strategy (OSS) (Chen *et al.*, *Genomics*, 17:651-656 (1993)) involves the mapping and sequencing of large genomic DNA clones with a hierarchical approach. The P1 or PAC clone was sonicated and the fragments subcloned into lambda vector (*λ*BlueStar) (Novagen, Inc., Madison, WI; cat no. 69242-3). The lambda subclone inserts were isolated by long-range PCR (Baroes, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:2216-2220 (1994) and the ends sequenced. The lambda-end sequences were overlapped to create a partial map of the original clone. Those lambda clones with overlapping end-sequences were identified, the inserts subcloned into a plasmid vector (pUC9 or pUC18) and the ends of the plasmid subclones were sequenced and assembled to generate a contiguous sequence. This directed sequencing strategy minimizes the redundancy required while allowing one to scan for and concentrate on interesting regions.

In order to identify better the *THPO* locus and to search for other genes related to the hematopoietin family, four genomic clones were isolated from this region by PCR screening of human P1 and PAC libraries (Genome System, Inc., Cat. Nos.: P1-2535 and PAC-6539). The sizes of the genomic fragments are as follows: P1.t is 40 kb; P1.g is 70 kb; P1.u is 70 kb; and PAC.z is 200 kb. Approximately 80% of the 200 kb genomic DNA region was sequenced by the Ordered Shotgun Strategy (OSS) (Chen *et al.*, *Genomics*, 17:651-56 (1993) and assembled into contigs using AutoAssembler™ (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Foster City, CA, cat no. 903227). The preliminary order of these contigs was determined by manual analysis. There were 46 contigs and filling in the gaps was employed. Table 4 summarizes the number and sizes of the gaps.

Table 4

Summary of the gaps in the 140 kb region

	Size of gap	Number
	<50 bp	13
25	50-150 bp	7
	150-300 bp	7
	300-1000 bp	10
	1000-5000 bp	7
	>5000 bp	2 (=15,000 bp)

30 DNA sequencing:

ABI DYE-primer™ chemistry (PE Applied Biosystems, Foster City, CA; Cat. No.: 402112) was used to end-sequence the lambda and plasmid subclones. ABI DYE-terminator™ chemistry (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat. No: 403044) was used to sequence the PCR products with their respective PCR primers. The sequences were collected with an ABI377 instrument. For PCR products larger than 1kb, walking primers were used. The sequences of contigs generated by the OSS strategy in AutoAssembler™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA; Cat. No: 903227) and the gap-filling sequencing trace files were imported into Sequencer™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI) for overlapping and editing.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PCR-Based gap filling Strategy:

Primers were designed based on the 5'- and 3'-end sequence of each contig, avoiding repetitive and low quality sequence regions. All primers were designed to be 19-24-mers with 50%-70% G/C content. Oligos were synthesized and gel-purified by standard methods.

- 5 Since the orientation and order of the contigs were unknown, permutations of the primers were used in the amplification reactions. Two PCR kits were used: first, XL PCR kit (Perkin Elmer, Norwalk, CT; Cat No.: N8080205), with extension times of approximately 10 minutes; and second, the Taq polymerase PCR kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA; Cat. No.: 201223) was used under high stringency conditions if smeared or multiple products were observed with the XL PCR kit. The main PCR product from each successful reaction was extracted from a
- 10 0.9% low melting agarose gel and purified with the GeneClean DNA Purification kit prior to sequencing.

Analysis:

- The identification and characterization of coding regions was carried out as follows: First, repetitive sequences were masked using RepeatMasker (A.F.A. Smit & P.Green, http://ftp.genome.washington.edu/RM/RM_details.html) which screens DNA sequences in FastA format against a library of repetitive elements and returns a masked query sequence. Repeats not masked were identified by
- 15 comparing the sequence to the GenBank database using WUBLAST (Altschul, S. & Gish, W., *Methods Enzymol.*, 265:460-480 (1996)) and were masked manually.

- Next, known genes were revealed by comparing the genomic regions against Genentech's protein database using the WUBLAST2.0 algorithm and then annotated by aligning the genomic and cDNA sequences for each gene, respectively, using a Needleman-Wunch (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443-453 (1970)) algorithm to find regions of local identity between sequences which are otherwise largely dissimilar. The strategy results in
- 20 detection of all exons of the five known genes in the region, THPO, TRAP2, e1F4g, CLCN2, and hRPB17 (Table 5).

Table 5

- 25 Summary of known genes located in the 140 kb region analyzed

Known genes	Map position
eukaryotic translation initiation factor 4 gamma	3q27-qter
thrombopoietin	3q26-q27
chloride channel 2	3q26-qter
30 TNF receptor associated protein 2	not previously mapped
RNA polymerase II subunit hRPB17	not previously mapped

- Finally, novel transcription units were predicted using a number of approaches. CpG islands (S. Cross & Bird, A., *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 5:109-314 (1995)) islands were used to define promoter regions and were identified as clusters of sites cleaved by enzymes recognizing GC-rich, 6 or 8-mer palindromic sequences. CpG
- 35 islands are usually associated with promoter regions of genes. WUBLAST2.0 analysis of short genomic regions (10-20 kb) versus GenBank revealed matches to ESTs. The individual EST sequences (or where possible, their sequence chromatogram files) were retrieved and assembled with Sequencher to provide a theoretical cDNA

PCT/US00/03565

Isolation:

pGACTAGTTCTAGATCGCGAGCGGCCGCCCTTTTTTTTTTTTTT (SEQ ID NO:81)

10 pCGGACGCGTGGGGCCCTGCGACCCAGCT (SEQ ID NO:82)

were designed to introduce SalI and NotI restriction sites. Clones were screened with oligonucleotide probes designed from the putative human chordin cDNA sequence (DNA34415) deduced by manually "splicing" together the proposed genomic exons of the gene. PCR primers flanking the probes were used to confirm the identity of the cDNA clones prior to sequencing.

OLI5640 34415.p1:

OLI5642 34415.p2:

20 and the flanking probes used were the following:

OLI5639 34415.f1:

OLI5643 34415.r

5'-GCAGGGTGCTCAACAGGACAC-3' (SEQ ID NO:86)

-115-

WO 01/53486

PCT/US00/03565

79, from about amino acid 232 to about amino acid 238, from about amino acid 236 to about amino acid 242, from about amino acid 390 to about amino acid 396, from about amino acid 422 to about amino acid 428, from about amino acid 473 to about amino acid 479, from about amino acid 477 to about amino acid 483, from about amino acid 483 to about amino acid 489, from about amino acid 489 to about amino acid 495, from about amino acid 573 to about amino acid 579, from about amino acid 576 to about amino acid 582, from about amino acid 580 to about amino acid 586, from about amino acid 635 to about amino acid 641, from about amino acid 670 to about amino acid 676, from about amino acid 773 to about amino acid 779, from about amino acid 887 to about amino acid 813, from about amino acid 871 to about amino acid 877, and from about amino acid 905 to about amino acid 911; an amidation site from about amino acid 87 to about amino acid 91; a cell attachment sequence from about amino acid 165 to about amino acid 168; and a leucine zipper pattern from about amino acid 315 to about amino acid 337. Clone DNA35917-1207 has been deposited with the ATCC on September 3, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209508. The full-length PRO243 protein shown in Figure 10 has an estimated molecular weight of about 101,960 daltons and a pI of about 8.21.

EXAMPLE 815 Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO256

A consensus DNA sequence was assembled relative to other EST sequences using phrap as described in Example 1 above. This assembled consensus sequence is herein identified as DNA28725. Based on the DNA28725 consensus sequence, oligonucleotides were synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for PRO256.

A pair of PCR primers (forward and reverse) were synthesized:

forward PCR primer:

5'-TGTCACCAAGCAGACAGAAG-3' (SEQ ID NO:87)

reverse PCR primer:

25 5'-ACTGGATGGCGCCTTCCATG-3' (SEQ ID NO:88)

Additionally, two synthetic oligonucleotide hybridization probes were constructed from the consensus DNA28725 sequence which had the following nucleotide sequences:

hybridization probes:

5'-CTGACAGTGACTAGCTCAGACCAACCCAGAGGACACGGCCAACGTCACAGT-3' (SEQ ID NO:89)

30 5'-GGGCTCTTTCCACGCTGGTACTATGACCCACGGAGCAGATCTG-3' (SEQ ID NO:90)

In order to screen several libraries for a source of a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification with the PCR primer pair identified above. A positive library was then used to isolate clones encoding the PRO256 gene using one of the probe oligonucleotides and one of the PCR primers.

RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from human placenta tissue. The cDNA libraries

WO 01/53486

PCT/US00/03565

used to isolate the cDNA clones were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to SalI hemikinased adaptors, cleaved with NotI, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRKB or pRKD; pRK5B is a precursor of pRK5D that

5 does not contain the SfiI site; see, Holmes *et al.*, *Science*, 253:1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NotI sites.

DNA sequencing of the clones isolated as described above gave the full-length DNA sequence for PRO256, herein designated as DNA35880-1160 [Figure 11; SEQ ID NO:11] and the derived protein sequence for PRO256.

The entire nucleotide sequence of DNA35880-1160 is shown in Figure 11 (SEQ ID NO:11). Clone

10 DNA35880-1160 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 188-190 and ending at the stop codon at nucleotide positions 1775-1777. The predicted polypeptide, precursor is 529 amino acids long (Figure 12). Analysis of the full-length PRO256 sequence shown in Figure 12 (SEQ ID NO:12) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO256

15 polypeptide shown in Figure 12 evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 35; a transmembrane domain from about amino acid 466 to about amino acid 483; N-glycosylation sites from about amino acid 66 to about amino acid 70, from about amino acid 235 to about amino acid 239, and from about amino acid 523 to about amino acid 527; N-myristoylation sites from about amino acid 29 to about amino acid 35, from about amino acid 43 to about amino acid 49, from about amino acid 161 to about

20 amino acid 167, from about amino acid 212 to about amino acid 218, from about amino acid 281 to about amino acid 287, from about amino acid 282 to about amino acid 288, from about amino acid 285 to about amino acid 291, from about amino acid 310 to about amino acid 316, from about amino acid 313 to about amino acid 319, from about amino acid 422 to about amino acid 428, from about amino acid 423 to about amino acid 429, and from about amino acid 426 to about amino acid 432; a cell attachment sequence from about amino acid 193 to about amino acid

25 199; and pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz) family signatures from about amino acid 278 to about amino acid 298 and from about amino acid 419 to about amino acid 438. Clone DNA35880-1160 has been deposited with ATCC on October 16, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209379.

Analysis of the amino acid sequence of the full-length PRO256 polypeptide suggests that portions of it possess significant homology to the human bikunin protein, thereby indicating that PRO256 may be a novel

30 proteinase inhibitor.

EXAMPLE 9

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO269

A consensus DNA sequence was assembled relative to other EST sequences using phrap as described in Example 1 above. This consensus sequence is designated herein as DNA35705. Based on the assembled

35 DNA35705 consensus sequence, oligonucleotides were synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for PRO269.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PCR primers (three forward and two reverse) were synthesized:

forward PCR primer 1:

5'-TGGAAGGAGATGCGATGCCACCTG-3' (SEQ ID NO:91)

forward PCR primer 2:

5 5'-TGACCAAGTGGGAAGGACAG-3' (SEQ ID NO:92)

forward PCR primer 3:

5'-ACAGAGCAGAGGGTGCCTTG-3' (SEQ ID NO:93)

reverse PCR primer 1

5'-TCAGGGACAAGTGGTGTCTCTCCC-3' (SEQ ID NO:94)

10 reverse PCR primer 2:

5'-TCAGGGAAGGAGTGTGCACTTCTG-3' (SEQ ID NO:95)

Additionally, a synthetic oligonucleotide hybridization probe was constructed from the DNA35705 consensus sequence which had the following nucleotide sequence:

hybridization probe:

15 5'-ACAGCTCCCGATCTCAGTTACTTGCATCGCGGACGAAATCGGCGCTCGCT-3' (SEQ ID NO:96)

In order to screen several libraries for a source of a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification with the PCR primers identified above. A positive library was then used to isolate clones encoding the PRO269 gene using the probe oligonucleotide and one of the PCR primers. RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from human fetal kidney tissue.

20 DNA sequencing of the isolated clones isolated as described above gave the full-length DNA sequence for DNA38260-1180 [Figure 13, SEQ ID NO:13]; and the derived protein sequence for PRO269.

The entire coding sequence of DNA38260-1180 is included in Figure 13 (SEQ ID NO:13). Clone DNA38260-1180 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 314-316, and an apparent stop codon at nucleotide positions 1784-1786. The predicted polypeptide precursor is 490 amino acids long with a molecular weight of approximately 51,636 daltons and an estimated pI of about 6.29. Analysis of the full-length PRO269 sequence shown in Figure 14 (SEQ ID NO:14) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO269 polypeptide shown in Figure 14 evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 16; a transmembrane domain from about amino acid 397 to about amino acid 418; N-glycosylation sites from about amino acid 189 to about amino acid 193, and from about amino acid 381 to about amino acid 385; a glycosaminoglycan attachment site from about amino acid 289 to about amino acid 293; cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites from about amino acid 98 to about amino acid 102, and from about amino acid 434 to about amino acid 438; N-myristoylation sites from about amino acid 30 to about amino acid 36, from about amino acid 35 to about amino acid 41, from about amino acid 58 to about amino acid 64, from about amino acid 59 to about amino acid 65, from about amino acid 121 to about amino acid 127, from about amino acid 151 to about amino acid

WO 01/53486

PCT/US00/03565

157, from about amino acid 185 to about amino acid 191, from about amino acid 209 to about amino acid 215, from about amino acid 267 to about amino acid 273, from about amino acid 350 to about amino acid 356, from about amino acid 374 to about amino acid 380, from about amino acid 453 to about amino acid 459, from about amino acid 463 to about amino acid 469, and from about amino acid 477 to about amino acid 483; and an aspartic acid and asparagine hydroxylation site from about amino acid 262 to about amino acid 274. Clone DNA38260-1180 has been deposited with the ATCC on October 17, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209397.

Analysis of the amino acid sequence of the full-length PRO269 sequence shown in Figure 14 (SEQ ID NO:14), suggests that portions of it possess significant homology to the human thrombomodulin proteins, thereby indicating that PRO269 may possess one or more thrombomodulin-like domains.

10

EXAMPLE 10**Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO274**

A consensus DNA sequence was assembled relative to other EST sequences using phrap as described in Example 1 above. This consensus sequence is designated herein as DNA36469. The DNA36469 consensus sequence was then extended using repeated cycles of BLAST and phrap to extend the consensus sequence as far as possible using the sources of EST sequences discussed above. The extended assembly consensus sequence is herein designated <consent01>. ESTs proprietary to Genentech were employed in the second consensus assembly and are herein designated DNA17873, DNA36157 and DNA28929. Based on the assembled DNA36469 and <consent01> consensus sequences, oligonucleotides were synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for PRO274.

Pairs of PCR primers (forward and reverse) were synthesized:

forward PCR primer 1 (36469.f1):
5'-CTGATCCGGTCTTGGTGCCCTG-3' (SEQ ID NO:97)

forward PCR primer 2 (36469.f2):
5'-GCTCTGTCACTACGCTC-3' (SEQ ID NO:98)

forward PCR primer 3 (36469.f3):
5'-TCATCTCTCCCTCTCCC-3' (SEQ ID NO:99)

forward PCR primer 4 (36469.f4):
5'-CCTTCCGCCACGAGTTC-3' (SEQ ID NO:100)

reverse PCR primer 1 (36469.r1):
5'-GGCAAAGTCCACTCCGATGATGTC-3' (SEQ ID NO:101)

reverse PCR primer 2 (36469.r2):
5'-GCCGTGCTGGTTCACAGGTCTCCG-3' (SEQ ID NO:102)

Additionally, a synthetic oligonucleotide hybridization probe was constructed from the DNA36469 and <consent01> consensus sequences which had the following nucleotide sequence:

WO 01/53486

PCT/US00/03565

hybridization probe (36469.p1):

5'-TCGGGGGAGCAGCCCTTGAACCGGGGCATTGCTGTCTGCAAGGAGG-3' (SEQ ID NO:103)

In order to screen several libraries for a source of a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification with the PCR primers identified above. A positive library was then used to isolate clones encoding the PRO274 gene using the probe oligonucleotide and one of the PCR primers. RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from human fetal liver tissue (LJB229).

DNA sequencing of the isolated clones isolated as described above gave the full-length DNA sequence for DNA39987-1184 [Figure 15, SEQ ID NO:15]; and the derived protein sequence for PRO274.

The entire coding sequence of DNA39987-1184 is included in Figure 15 (SEQ ID NO:15). Clone DNA39987-1184 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 83-85, and an apparent stop codon at nucleotide positions 1559-1561. The predicted polypeptide precursor is 492 amino acids long with a molecular weight of approximately 54,241 daltons and an estimated pI of about 8.21. Analysis of the full-length PRO274 sequence shown in Figure 16 (SEQ ID NO:16) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO274 polypeptide shown in Figure 16 evidences the presence of the following: transmembrane domains from about amino acid 86 to about amino acid 105, from about amino acid 162 to about amino acid 178, from about amino acid 327 to about amino acid 345, from about amino acid 359 to about amino acid 374, and from about amino acid 403 to about amino acid 423; N-glycosylation sites from about amino acid 347 to about amino acid 351, and from about amino acid 461 to about amino acid 465; a cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site from about amino acid 325 to about amino acid 329; and N-myristoylation sites from about amino acid 53 to about amino acid 59, from about amino acid 94 to about amino acid 100, from about amino acid 229 to about amino acid 235, from about amino acid 267 to about amino acid 273, from about amino acid 268 to about amino acid 274, from about amino acid 358 to about amino acid 364, from about amino acid 422 to about amino acid 428, from about amino acid 425 to about amino acid 431, and from about amino acid 431 to about amino acid 437. Clone DNA39987-1184 has been deposited with the ATCC on April 21, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 209786.

Analysis of the amino acid sequence of the full-length PRO274 sequence shown in Figure 16 (SEQ ID NO:16), suggests that portions of it possess significant homology to the Fn54 protein. More specifically, an analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35) evidenced significant homology between the PRO274 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: MMFN54S2_I, MMFN54S1_I, CELF48C1_8, CEF38B7_6, PRP3_RAT, INL3_PIG, MTCY07A7_13, YNAX_KLEAE, A47234 and HME2_MOUSE.

EXAMPLE 11

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO304

A consensus DNA sequence was assembled relative to other EST sequences using phrap as described in Example 1 above. This consensus sequence is designated herein as DNA35958. Based on the assembled DNA35958 consensus sequence, oligonucleotides were synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that

WO 01/53486

PCT/US00/03565

contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for PRO304.

Pairs of PCR primers (forward and reverse) were synthesized:

- forward PCR primer 1:
 5 5'-GCGGAAGGGCAGAAATGGGACTCCAAG-3' (SEQ ID NO:104)
forward PCR primer 2:
 5'-CAGCCCTGCCACATGTGC-3' (SEQ ID NO:105)
forward PCR primer 3:
 5'-TACTGGGTGGTCAGCAAC-3' (SEQ ID NO:106)
 10 reverse PCR primer 1:
 5'-GGCGAAGAGCAGGGTGAGACCCCG-3' (SEQ ID NO:107)

Additionally, a synthetic oligonucleotide hybridization probe was constructed from the DNA35958 consensus sequence which had the following nucleotide sequence:

- hybridization probe:
 15 5'-GCCCTCATCTCTCTCTGGCAAATGCAGTTACAGCCCGAGCCCGAC-3' (SEQ ID NO:108)

In order to screen several libraries for a source of a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification with the PCR primers identified above. A positive library was then used to isolate clones encoding the PRO304 gene using the probe oligonucleotide and one of the PCR primers. RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from 22 week human fetal brain tissue (LIB153).

- 20 DNA sequencing of the isolated clones isolated as described above gave the full-length DNA sequence for DNA39520-1217 [Figure 17, SEQ ID NO:17]; and the derived protein sequence for PRO304.

- The entire coding sequence of DNA39520-1217 is included in Figure 17 (SEQ ID NO:17). Clone DNA39520-1217 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 34-36, and an apparent stop codon at nucleotide positions 1702-1704. The predicted polypeptide precursor is 556 amino acids long. Analysis of the full-length PRO304 sequence shown in Figure 18 (SEQ ID NO:18) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO304 polypeptide shown in Figure 18 evidences the presence of the following: a signal sequence from about amino acid 1 to about amino acid 16; N-glycosylation sites from about amino acid 210 to about amino acid 214, from about amino acid 222 to about amino acid 226, from about amino acid 286 to about amino acid 290, from about amino acid 313 to about amino acid 317, and from about amino acid 443 to about amino acid 447; glycosaminoglycan attachment sites from about amino acid 361 to about amino acid 365, from about amino acid 408 to about amino acid 412, and from about amino acid 538 to about amino acid 542; and N-myristoylation sites from about amino acid 2 to about amino acid 8, from about amino acid 107 to about amino acid 113, from about amino acid 195 to about amino acid 201, from about amino acid 199 to about amino acid 205, from about amino acid 217 to about amino acid 223, from about amino acid 219 to about amino acid 225, from about amino acid 248 to about amino

WO 01/53486

PCT/US00/03565

acid 254, from about amino acid 270 to about amino acid 276, from about amino acid 284 to about amino acid 290, from about amino acid 409 to about amino acid 415, from about amino acid 410 to about amino acid 416, from about amino acid 473 to about amino acid 479, from about amino acid 482 to about amino acid 488, from about amino acid 521 to about amino acid 527, from about amino acid 533 to about amino acid 539, and from about amino acid 549 to about amino acid 555. Clone DNA39520-1217 has been deposited with the ATCC on November 21, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209482.

EXAMPLE 12**Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO339**

An expressed sequence tag (EST) DNA database (LJFESEQ[®], Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) was searched and an EST was identified. An assembly of Incyte clones and a consensus sequence was formed from which 4 forward primers, two reverse primers and another primer was formed. Human fetal liver cDNA libraries were screened by hybridization with a synthetic oligonucleotide probe based on the identified EST. The cDNA libraries used to isolate the cDNA clones encoding human PRO339 were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to SalI hemikinased adaptors, cleaved with NotI, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRKB or pRKD; pRKB is a precursor of pRK5D that does not contain the SfiI site; see, Holmes *et al.*, *Science*, 253:1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NotI.

The following oligonucleotide probes were used:

forward PCR primer 1:
5'-GGGATGCAGGTGGTGTCTCATGGGG-3' (SEQ ID NO:109)
forward PCR primer 2:
5'-CCCTCATGTACCGGCTCC-3' (SEQ ID NO:110)
forward PCR primer 3:
5'-GTGTGACACAGCGTGGGC-3' (SEQ ID NO:111)
forward PCR primer 4:
5'-GACCGGCAGGCTTCTGCG-3' (SEQ ID NO:112)
reverse PCR primer 1:
5'-CAGCAGCTTCAGCCACCAGGAGTGG-3' (SEQ ID NO:113)
reverse PCR primer 2:
5'-CTGAGCCGTGGGCTGCAGTCTCGC-3' (SEQ ID NO:114)
primer:
5'-CCGACTACGACTGGTCTTCATCATGCAGGATGACACATATGTGC-3' (SEQ ID NO:115)

A full length clone DNA43466-1225 [Figure 19; SEQ ID NO:19] was identified and sequenced in entirety that contained a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 333-335 and a stop signal at nucleotide positions 2649-2651 (Figure 19, SEQ ID NO:19). The predicted polypeptide precursor is 772 amino acids long and has a calculated molecular weight of approximately 86,226 daltons. Analysis

WO 01/53486

PCT/US00/03565

of the full-length PRO339 sequence shown in Figure 20 (SEQ ID NO:20) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO339 polypeptide shown in Figure 20 evidences the presence of the following: a signal sequence from about amino acid 1 to about amino acid 15; a transmembrane domain from about amino acid 489 to about amino acid 510; N-glycosylation sites from about amino acid 121 to about amino acid 125 and from about amino acid 342 to about amino acid 346; cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites from about amino acid 319 to about amino acid 323 and from about amino acid 464 to about amino acid 468; a tyrosine kinase phosphorylation site from about amino acid 736 to about amino acid 743; N-myristoylation sites from about amino acid 19 to about amino acid 25, from about amino acid 23 to about amino acid 29, from about amino acid 136 to about amino acid 142, from about amino acid 397 to about amino acid 403, from about amino acid 441 to about amino acid 447, from about amino acid 544 to about amino acid 550, from about amino acid 558 to about amino acid 564, from about amino acid 651 to about amino acid 657, from about amino acid 657 to about amino acid 663, and from about amino acid 672 to about amino acid 678; a prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site from about amino acid 14 to about amino acid 25; and a cell attachment site from about amino acid 247 to about amino acid 250. Clone DNA43466-1225 has been deposited with ATCC on November 21, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209490.

Based on a BLAST and FastA sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 20 (SEQ ID NO:20), PRO339 shows amino acid sequence identity to *C. elegans* proteins and collagen-like polymer sequences as well as to fringe, thereby indicating that PRO339 may be involved in development or tissue growth.

20

EXAMPLE 13**Isolation of cDNAs Encoding Human PRO1558**

DNA71282-1668 was identified by applying the proprietary signal sequence finding algorithm described in Example 2 above. Use of the above described signal sequence algorithm allowed identification of an EST cluster sequence from the LIFESEQ® database, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, designated Incyte EST cluster no. 86390. This EST cluster sequence was then compared to a variety of expressed sequence tag (EST) databases which included public EST databases (e.g., GenBank) and a proprietary EST DNA database (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) to identify existing homologies. The homology search was performed using the computer program BLAST or BLAST2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)). Those comparisons resulting in a BLAST score of 70 (or in some cases 90) or greater that did not encode known proteins were clustered and assembled into a consensus DNA sequence with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington). The consensus sequence obtained therefrom is herein designated as DNA58842.

In light of an observed sequence homology between the DNA58842 sequence and Incyte EST clone no. 3746964, Incyte EST no. 3746974 was purchased and the cDNA insert was obtained and sequenced. The sequence of this cDNA insert is shown in Figure 21 (SEQ ID NO:21) and is herein designated as DNA71282-1668.

The entire coding sequence of DNA71282-1668 is included in Figure 21 (SEQ ID NO:21). Clone DNA71282-1668 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide

WO 01/53486

PCT/US00/03565

positions 84-86 and ending at the stop codon at nucleotide positions 870-872 (Figure 21). The predicted polypeptide precursor is 262 amino acids long (Figure 22; SEQ ID NO:22). The full-length PRO1558 protein shown in Figure 22 has an estimated molecular weight of about 28,809 daltons and a pI of about 8.80. Analysis of the full-length PRO1558 sequence shown in Figure 22 (SEQ ID NO:22) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO1558 sequence shown in Figure 22 evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 25; transmembrane domains from about amino acid 8 to about amino acid 30 and from about amino acid 109 to about amino acid 130; an N-glycosylation site from about amino acid 190 to about amino acid 194; a tyrosine kinase phosphorylation site from about amino acid 238 to about amino acid 247; N-myristoylation sites from about amino acid 22 to about amino acid 28, from about amino acid 28 to about amino acid 34, from about amino acid 110 to about amino acid 116, from about amino acid 205 to about amino acid 211, and from about amino acid 255 to about amino acid 261; and amidation sites from about amino acid 31 to about amino acid 35 and from about amino acid 39 to about amino acid 43. Clone DNA71282-1668 has been deposited with ATCC on October 6, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203312.

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using a WU-BLAST2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 22 (SEQ ID NO:22), evidenced significant sequence identity between the PRO1558 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: AF075724_2, MXU24657_3, CAMT_EUCGU, MSU20736_1, P_R29515, B70431, JC4004, CEY32B12A_3, CELF53B3_2 and P_R13543.

EXAMPLE 14

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO779

Human fetal heart and human fetal lung lgt10 bacteriophage cDNA libraries (both purchased from Clontech) were screened by hybridization with synthetic oligonucleotide probes based on an EST (GenBank locus W71984), which showed some degree of homology to the intracellular domain (ICD) of human TNFR1 and CD95. W71984 is a 523 bp EST, which in its -1 reading frame has 27 identities to a 43 amino acid long sequence in the ICD of human TNFR1. The oligonucleotide probes used in the screening were 27 and 25 bp long, respectively, with the following sequences:

5'-GGCGCTCTGGTGGCCCTTGCAGAAGCC-3' (SEQ ID NO:116)
 5'-TTCGGCCGAGAAGTIGAGAAATGTC-3' (SEQ ID NO:117)

Hybridization was done with a 1:1 mixture of the two probes overnight at room temperature in buffer containing 20% formamide, 5X SSC, 10% dextran sulfate, 0.1% NaPiPO₄, 0.05 M NaPO₄, 0.05 mg salmon sperm DNA, and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), followed consecutively by one wash at room temperature in 6X SSC, two washes at 37°C in 1X SSC/0.1% SDS, two washes at 37°C in 0.5X SSC/0.1% SDS, and two washes at 37°C in 0.2X SSC/0.1% SDS. One positive clone from each of the fetal heart (FH20A.57) and fetal lung (FL8A.53) libraries were confirmed to be specific by PCR using the respective above hybridization probes as

WO 01/53486

PCT/US00/03565

primers. Single phage plaques containing each of the positive clones were isolated by limiting dilution and the DNA was purified using a Wizard lambda prep DNA purification kit (Promega).

The cDNA inserts were excised from the lambda vector arms by digestion with EcoRI, gel-purified, and subcloned into pRK5 that was predigested with EcoRI. The clones were then sequenced in entirety.

- 5 Clone (FH20A.57) DNA58801-1052 (also referred to as Apo 3 clone FH20.57 deposited as ATCC 55820, as indicated below) contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 103-105 and ending at the stop codon found at nucleotide positions 1354-1356 [Figure 23, SEQ ID NO:23]. The predicted polypeptide precursor is 417 amino acids long (Figure 24; SEQ ID NO:24). The full-length PRO779 protein shown in Figure 24 has an estimated molecular weight of about 45,000 daltons and a pI of about 6.40. Analysis of the full-length PRO779 sequence shown in Figure 24 (SEQ ID NO:24) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO779 sequence shown in Figure 24 evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 24; a transmembrane domain from about amino acid 199 to about amino acid 219; N-glycosylation sites from about amino acid 67 to about amino acid 71 and from about amino acid 106 to about amino acid 110; a cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site from about amino acid 157 to about amino acid 161; a tyrosine kinase phosphorylation site from about amino acid 370 to about amino acid 377; N-myristoylation sites from about amino acid 44 to about amino acid 50, from about amino acid 50 to about amino acid 56, from about amino acid 66 to about amino acid 72, from about amino acid 116 to about amino acid 122, from about amino acid 217 to about amino acid 223, from about amino acid 355 to about amino acid 361, from about amino acid 391 to about amino acid 397, and from about amino acid 401 to about amino acid 407; and a prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site from about amino acid 177 to about amino acid 188. Clone DNA58801-1052 has been deposited with ATCC on September 5, 1996 and is assigned ATCC deposit no. 55820.

- 25 The ECD contains 4 cysteine-rich repeats which resemble the corresponding regions of human TNFR1 (4 repeats), of human CD95 (3 repeats) and of the other known TNFR family members. The ICD contains a death domain sequence that resembles the death domains found in the ICD of TNFR1 and CD95 and in the cytoplasmic death signalling proteins such as human FADD/MORT1, TRADD, RIP, and Drosophila Reaper. Both globally and in individual regions, PRO779 (Apo 3) is more closely related to TNFR1 than to CD95; the respective amino acid identities are 29.3% and 22.8% overall, 28.2% and 24.7% in the ECD, 31.6% and 18.3% in the ICD, and 47.5% and 20% in the death domain.

EXAMPLE 15

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO1185

- DNA62881-1515 was identified by applying the proprietary signal sequence finding algorithm described in Example 2 above. Use of the above described signal sequence algorithm allowed identification of an EST cluster sequence from the LIFESEQ® database, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA. This EST cluster sequence was then compared to a variety of expressed sequence tag (EST) databases which included public EST databases (e.g., GenBank) and a proprietary EST DNA database (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) to identify

WO 01/53486

PCT/US00/03565

existing homologies. The homology search was performed using the computer program BLAST or BLAST2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)). Those comparisons resulting in a BLAST score of 70 (or in some cases 90) or greater that did not encode known proteins were clustered and assembled into a consensus DNA sequence with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

5 The consensus sequence obtained therefrom is herein designated as DNA56426.

In light of an observed sequence homology between the DNA56426 sequence and Incyte EST 3284411, the clone including this Incyte EST 3284411 (from a library constructed of RNA from aortic tissue) was purchased and the cDNA insert was obtained and sequenced. The sequence of this cDNA insert is shown in Figure 25 (SEQ ID NO:25) and is herein designated as DNA62881-1515.

10 The entire coding sequence of DNA62881-1515 is included in Figure 25 (SEQ ID NO:25). Clone DNA62881-1515 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 4-6 and ending at the stop codon at nucleotide positions 598-600 (Figure 25). The predicted polypeptide precursor is 198 amino acids long (Figure 26; SEQ ID NO:26). The full-length PRO1185 protein shown in Figure 26 has an estimated molecular weight of about 22,105 daltons and a pI of about 7.73. Analysis of the full-length

15 PRO1185 sequence shown in Figure 26 (SEQ ID NO:26) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO1185 sequence shown in Figure 26 evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 21; and N-myristoylation sites from about amino acid 46 to about amino acid 52, from about amino acid 51 to about amino acid 57, and from about amino acid

20 78 to about amino acid 84. Clone DNA62881-1515 has been deposited with ATCC on August 4, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203096.

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using a WU-BLAST2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 26 (SEQ ID NO:26), evidenced significant sequence identity between the PRO1185 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: TUP1_YEAST,

25 AF041382_1, MAOM_SOLTU, SPPBP9_1, EPCPLCFAIL_1, HSPLEC_1, YKLA_CAEEL, A44643, and TGU65922_1.

EXAMPLE 16

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO1245

DNA64884-1527 was identified by applying the proprietary signal sequence finding algorithm described

30 in Example 2 above. Use of the above described signal sequence algorithm allowed identification of an EST cluster sequence from the LIFESEQ® database, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, designated Incyte EST Cluster No. 46370. This EST cluster sequence was then compared to a variety of expressed sequence tag (EST) databases which included public EST databases (e.g., GenBank) and a proprietary EST DNA database (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) to identify existing homologies. The homology search was performed using the

35 computer program BLAST or BLAST2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)). Those comparisons resulting in a BLAST score of 70 (or in some cases 90) or greater that did not encode known proteins were clustered and assembled into a consensus DNA sequence with the program "phrap" (Phil Green, University

WO 01/53486

PCT/US00/03565

of Washington, Seattle, Washington). One or more of the ESTs used in the assembly was derived from a library constructed from tissue obtained from the parotid (salivary) gland of a human with parotid cancer. The consensus sequence obtained therefrom is herein designated as DNA56019.

In light of an observed sequence homology between the DNA56019 sequence and Incyte EST clone no.

5 1327836, Incyte EST clone no. 1327836 was purchased and the cDNA insert was obtained and sequenced. The sequence of this cDNA insert is shown in Figure 27 (SEQ ID NO:27) and is herein designated as DNA64884-1527.

The entire coding sequence of DNA64884-1527 is included in Figure 27 (SEQ ID NO:27). Clone DNA64884-1527 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 79-81 and ending at the stop codon at nucleotide positions 391-393 (Figure 27). The predicted
10 polypeptide precursor is 104 amino acids long (Figure 28; SEQ ID NO:28). The full-length PRO1245 protein shown in Figure 28 has an estimated molecular weight of about 10,100 daltons and a pI of about 8.76. Analysis of the full-length PRO1245 sequence shown in Figure 28 (SEQ ID NO:28) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO1245 sequence shown in Figure 28 evidences the
15 presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 18; N-myristoylation sites from about amino acid 8 to about amino acid 14, from about amino acid 65 to about amino acid 71, from about amino acid 74 to about amino acid 80, and from about amino acid 88 to about amino acid 94; and a prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site from about amino acid 5 to about amino acid 16. Clone DNA64884-1527 has been deposited with ATCC on August 25, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203155.

20 An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using a WU-BLAST2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 28 (SEQ ID NO:28), evidenced some homology between the PRO1245 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: SYA_THETH, GEN11167, MTV044_4, AB011151_1, RLAI2750_3, SNEIIPTRA_1, S63624, C28391, A37907, and S14064.

EXAMPLE 17

25 Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO1750

DNA76531-1701 was identified by applying the proprietary signal sequence finding algorithm described in Example 2 above. Use of the above described signal sequence algorithm allowed identification of an EST cluster sequence from the LIFESEQ® database, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, designated DNA10571. This EST cluster sequence was then compared to a variety of expressed sequence tag (EST) databases which included public
30 EST databases (e.g., GenBank) and a proprietary EST DNA database (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) to identify existing homologies. The homology search was performed using the computer program BLAST or BLAST2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)). Those comparisons resulting in a BLAST score of 70 (or in some cases 90) or greater that did not encode known proteins were clustered and assembled into a consensus DNA sequence with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington,
35 Seattle, Washington). One or more of the ESTs used in the assembly was derived from pooled eosinophils of allergic asthmatic patients. The consensus sequence obtained therefrom is herein designated as DNA57313.

In light of an observed sequence homology between the DNA57313 sequence and Incyte EST 2434255,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

the clone including this Incyte EST 2434255 was purchased and the cDNA insert was obtained and sequenced. The sequence of this cDNA insert is shown in Figure 29 (SEQ ID NO:29) and is herein designated as DNA76531-1701.

The entire coding sequence of DNA76531-1701 is included in Figure 29 (SEQ ID NO:29). Clone DNA76531-1701 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 125-127 and ending at the stop codon at nucleotide positions 1475-1477 (Figure 29). The predicted polypeptide precursor is 450 amino acids long (Figure 30; SEQ ID NO:30). The full-length PRO1759 protein shown in Figure 30 has an estimated molecular weight of about 49,765 daltons and a pI of about 8.14. Analysis of the full-length PRO1759 sequence shown in Figure 30 (SEQ ID NO:30) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO1759 sequence shown in Figure 30 evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 18; transmembrane domains from about amino acid 41 to about amino acid 55, from about amino acid 75 to about amino acid 94, from about amino acid 127 to about amino acid 143, from about amino acid 191 to about amino acid 213, from about amino acid 249 to about amino acid 270, from about amino acid 278 to about amino acid 299, from about amino acid 314 to about amino acid 330, from about amino acid 343 to about amino acid 359, from about amino acid 379 to about amino acid 394, and from about amino acid 410 to about amino acid 430; a cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site from about amino acid 104 to about amino acid 108; N-myristoylation sites from about amino acid 11 to about amino acid 17, from about amino acid 18 to about amino acid 24, from about amino acid 84 to about amino acid 90, from about amino acid 92 to about amino acid 98, from about amino acid 137 to about amino acid 143, from about amino acid 138 to about amino acid 144, from about amino acid 238 to about amino acid 244, from about amino acid 253 to about amino acid 259, from about amino acid 278 to about amino acid 284, and from about amino acid 282 to about amino acid 288; an amidation site from about amino acid 102 to about amino acid 106; and a prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site from about amino acid 6 to about amino acid 17. Clone DNA76531-1701 has been deposited with ATCC on November 17, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203465.

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using a WU-BLAST2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 30 (SEQ ID NO:30), evidenced sequence identity between the PRO1759 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: OPDE_PSEAE, TH11_TRYBB, S67684, RGT2_YEAST, S68362, ATSUGTRPR_1, P_W17836 (Patent application WO9715668-A2), F69587, A48076, and A45611.

EXAMPLE 18

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO5775

DNA96869-2673 was identified by applying the proprietary signal sequence finding algorithm described in Example 2 above. Use of the above described signal sequence algorithm allowed identification of an EST cluster sequence from the LIFESEQ® database, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, designated herein as CLU86443. This EST cluster sequence was then compared to a variety of expressed sequence tag (EST) databases which included public EST databases (e.g., GenBank) and a proprietary EST DNA database (LIFESEQ®, Incyte

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) to identify existing homologies. The homology search was performed using the computer program BLAST or BLAST2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)). Those comparisons resulting in a BLAST score of 70 (or in some cases 90) or greater that did not encode known proteins were clustered and assembled into a consensus DNA sequence with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington). The consensus sequence obtained therefrom is herein designated as DNA79860.

In light of an observed sequence homology between the DNA79860 sequence and an Incyte EST sequence encompassed within clone no. 1614726H1 from the LIFESeq®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA database, clone no. 1614726H1 was purchased and the cDNA insert was obtained and sequenced. The sequence of this cDNA insert is shown in Figure 31 (SEQ ID NO:31) and is herein designated as DNA96869-2673.

The entire coding sequence of DNA96869-2673 is included in Figure 31 (SEQ ID NO:31). Clone DNA96869-2673 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 193-195 and ending at the stop codon at nucleotide positions 1660-1662 (Figure 31). The predicted polypeptide precursor is 489 amino acids long (Figure 32; SEQ ID NO:32). The full-length PRO5775 protein shown in Figure 32 has an estimated molecular weight of about 53,745 daltons and a pI of about 8.36. Analysis of the full-length PRO5775 sequence shown in Figure 32 (SEQ ID NO:32) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO5775 sequence shown in Figure 32 evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 29; a transmembrane domain from about amino acid 381 to about amino acid 399; N-glycosylation sites from about amino acid 133 to about amino acid 137, from about amino acid 154 to about amino acid 158, from about amino acid 232 to about amino acid 236, from about amino acid 264 to about amino acid 268, from about amino acid 386 to about amino acid 390, from about amino acid 400 to about amino acid 404, from about amino acid 410 to about amino acid 414, and from about amino acid 427 to about amino acid 431; and N-myristoylation sites from about amino acid 58 to about amino acid 64, from about amino acid 94 to about amino acid 100, from about amino acid 131 to about amino acid 137, from about amino acid 194 to about amino acid 200, from about amino acid 251 to about amino acid 257, from about amino acid 277 to about amino acid 283, from about amino acid 281 to about amino acid 287, from about amino acid 361 to about amino acid 367, from about amino acid 399 to about amino acid 405, from about amino acid 440 to about amino acid 446, from about amino acid 448 to about amino acid 454, and from about amino acid 478 to about amino acid 484. Clone DNA96869-2673 has been deposited with ATCC on June 22, 1999 and is assigned ATCC deposit no. PTA-255.

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using a WU-BLAST2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 32 (SEQ ID NO:32), evidenced sequence identity between the PRO5775 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: U94848_12, P_W57899, CV41KBPL_33, HSU60644_1, CVORFILSL_3, VK04_VACCV, CVGRI90_41, VK04_VACCC, and AF026124_1.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

EXAMPLE 19Isolation of cDNA Clones Encoding a Human PRO7133

Clone DNA128450-2739 was pulled out by a CARD homolog screen, and the sequence was used as a probe to isolate a clone of the full-length coding sequence for PRO7133 using traditional low stringency and hybridization. To identify the full ORF for the PRO7133 cDNA, the CARD domain containing molecule; a cDNA fragment encoding the N-terminal portion of SOCA-1; was used to screen a human fetal kidney library. Several positive clones were picked up, and the DNA was prepared and sequenced.

forward primer:

5'-GCCGGATCCACAATGGCTACCGAGAGTACTCC-3' (SEQ ID NO:118)

10 reverse primer:

5'-GCGGAATTCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTCTGTCTCTCTCCAATGAAAGGC-3'

(SEQ ID NO:119)

The probe DNA (soca-1) had the following nucleotide sequence:

5'CGCGTACGTAAGCTCGGAATTCGGCTCGAGGGAACAATGGCTACCGAGAGTACTCCCTCAGAG
15 ATCATAGAAGTGGTGAAGAACAAGTTATGAGGGATCAGAAACCAGCCTTTCATTGGAGGAGGA
ACAGGAGAAAAGTATAAAAAAAAAAAAAAAGGGCGGCCGCGACTAGTGAGCTCGTCGACCCG
GGAATTAATTCGGACCGGTACCTGCAGGCGTACCAGCTTTCCTATAGTAGTG-3'
(SEQ ID NO:120)

20 DNA sequencing revealed that one of the cDNA clones contains a full-length ORF that encodes a protein significantly homologous to the human Sab protein; the PRO7133 polypeptide (designated herein as DNA128451-2739 [Figure 33, SEQ ID NO:33] and the derived protein sequence for that PRO7133 polypeptide.

Clone DNA128451-2739 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 501-503 and ending at the stop codon at nucleotide positions 1680-1682 (Figure 33). The predicted polypeptide precursor is 393 amino acids long (Figure 34; SEQ ID NO:34). The full-length PRO7133 protein shown in Figure 34 has an estimated molecular weight of about 43,499 daltons and a pI of about 5.75. Analysis of the full-length PRO7133 sequence shown in Figure 34 (SEQ ID NO:34) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO7133 sequence shown in Figure 34 evidences the presence of the following: cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites from about amino acid 287 to about amino acid 291 and from about amino acid 375 to about amino acid 379; N-myristoylation sites from about amino acid 37 to about amino acid 43, from about amino acid 38 to about amino acid 44, from about amino acid 39 to about amino acid 45, from about amino acid 40 to about amino acid 46, from about amino acid 103 to about amino acid 109, from about amino acid 307 to about amino acid 313, from about amino acid 310 to about amino acid 316, from about amino acid 315 to about amino acid 321, from about amino acid 365 to about amino acid 371, from about amino acid 369 to about amino acid 375, from about amino acid 373 to about amino acid 379, from about amino acid 377 to about amino acid 383, from about amino acid 380 to about amino acid 386,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

and from about amino acid 381 to about amino acid 387; and an amidation site from about amino acid 373 to about amino acid 377. Clone DNA128451-2739 has been deposited with ATCC on August 31, 1999 and is assigned ATCC deposit no. PTA-618.

EXAMPLE 20

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO7168

DNA102846-2742 was identified by applying the proprietary signal sequence finding algorithm described in Example 2 above. Use of the above described signal sequence algorithm allowed identification of an EST cluster sequence from the LIFESEQ® database, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, designated herein as CLU122441. This EST cluster sequence was then compared to a variety of expressed sequence tag (EST) databases which included public EST databases (*e.g.*, GenBank) and a proprietary EST DNA database (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) to identify existing homologies. The homology search was performed using the computer program BLAST or BLAST2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)). Those comparisons resulting in a BLAST score of 70 (or in some cases 90) or greater that did not encode known proteins were clustered and assembled into a consensus DNA sequence with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington). The consensus sequence obtained therefrom is herein designated as DNA57953.

In light of an observed sequence homology between the DNA57953 sequence and an Incyte EST sequence encompassed within clone no. 4181351 from the LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA database, clone no. 4181351 was purchased and the cDNA insert was obtained and sequenced. The sequence of this cDNA insert is shown in Figure 35 (SEQ ID NO:35) and is herein designated as DNA102846-2742.

The entire coding sequence of DNA102846-2742 is included in Figure 35 (SEQ ID NO:35). Clone DNA102846-2742 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 23-25 and ending at the stop codon at nucleotide positions 2540-2542 (Figure 35). The predicted polypeptide precursor is 839 amino acids long (Figure 36; SEQ ID NO:36). The full-length PRO7168 protein shown in Figure 36 has an estimated molecular weight of about 87,546 daltons and a pI of about 4.84. Analysis of the full-length PRO7168 sequence shown in Figure 36 (SEQ ID NO:36) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO7168 sequence shown in Figure 36 evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 25; a transmembrane domain from about amino acid 663 to about amino acid 686; N-glycosylation sites from about amino acid 44 to about amino acid 48, from about amino acid 140 to about amino acid 144, from about amino acid 198 to about amino acid 202, from about amino acid 297 to about amino acid 301, from about amino acid 308 to about amino acid 312, from about amino acid 405 to about amino acid 409, and from about amino acid 520 to about amino acid 524; glycosaminoglycan attachment sites from about amino acid 490 to about amino acid 494, from about amino acid 647 to about amino acid 651 and from about amino acid 813 to about amino acid 817; a cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site from about amino acid 655 to about amino acid 659; tyrosine kinase phosphorylation sites from about amino acid 154 to about amino acid 163 and from about amino acid 776 to about

WO 01/53486

PCT/US00/03565

amino acid 783; N-myristoylation sites from about amino acid 57 to about amino acid 63, from about amino acid 102 to about amino acid 108, from about amino acid 255 to about amino acid 261, from about amino acid 294 to about amino acid 300, from about amino acid 366 to about amino acid 372, from about amino acid 426 to about amino acid 432, from about amino acid 441 to about amino acid 447, from about amino acid 513 to about amino acid 519, from about amino acid 517 to about amino acid 523, from about amino acid 530 to about amino acid 536, from about amino acid 548 to about amino acid 554, from about amino acid 550 to about amino acid 556, from about amino acid 581 to about amino acid 587, from about amino acid 592 to about amino acid 598, from about amino acid 610 to about amino acid 616, from about amino acid 612 to about amino acid 618, from about amino acid 623 to about amino acid 629, from about amino acid 648 to about amino acid 654, from about amino acid 666 to about amino acid 672, from about amino acid 667 to about amino acid 673, from about amino acid 762 to about amino acid 768, from about amino acid 763 to about amino acid 769, from about amino acid 780 to about amino acid 786, from about amino acid 809 to about amino acid 815, from about amino acid 821 to about amino acid 827, and from about amino acid 833 to about amino acid 839; and a cadherins extracellular repeated domain signature from about amino acid 112 to about amino acid 123. Clone DNA102846-2742 has been deposited with ATCC on August 17, 1999 and is assigned ATCC deposit no. PTA-545.

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using a WU-BLAST2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 36 (SEQ ID NO:36), evidenced sequence identity between the PRO7168 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: CELT22D1_9, B48013, AF100960_1, MUC2_HUMAN, PRP3_MOUSE, S53363, A39066, HUMSPRPA_1, AF053091_1, and S80905_1.

20

EXAMPLE 21Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO5725

An expressed sequence tag (EST) DNA database (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) was searched and an EST was identified which showed homology to Neuritin. Incyte ESTclone no. 3705684 was then purchased from LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA and the cDNA insert of that clone (designated herein as DNA92265-2669) was obtained and sequenced in entirety (Figure 37; SEQ ID NO:37).

The full-length clone [DNA92265-2669; SEQ ID NO:37] contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 27-29 and a stop signal at nucleotide positions 522-524 (Figure 37, SEQ ID NO:37). The predicted polypeptide precursor is 165 amino acids long and has a calculated molecular weight of approximately 17,786 daltons and an estimated pI of approximately 8.43. Analysis of the full-length PRO5725 sequence shown in Figure 38 (SEQ ID NO:38) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains as shown in Figure 38, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO5725 polypeptide shown in Figure 38 evidences the presence of the following: a signal sequence from about amino acid 1 to about amino acid 35; a transmembrane domain from about amino acid 141 to about amino acid 157; an N-myristoylation site from about amino acid 127 to about amino acid 133; and a prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site from about amino acid 77 to about amino acid 88. Clone DNA92265-2669 has been deposited with ATCC on June 22, 1999 and is assigned ATCC deposit no. PTA-256.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using a WU-BLAST2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 38 (SEQ ID NO:38), evidenced sequence identity between the PRO5725 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: RNU88958_I, P_W37859, P_W37858, JC6305, HGS_RE778, HGS_RE777, P_W27652, P_W44088, HGS_RE776, and HGS_RE425.

5

EXAMPLE 22Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO1800

A consensus DNA sequence was assembled relative to other EST sequences using phrap as described in Example 1 above. This consensus sequence is designated herein as DNA30934. Based on the assembled DNA30934 consensus sequence, oligonucleotides were synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for PRO1800.

10

PCR primers (forward and reverse) were synthesized:

forward PCR primer (30934.f1):

5'-GCATAATGGATGTCACGTGAGG-3' (SEQ ID NO:121)

15

reverse PCR primer (30934.r1):

5'-AGAACAAATCCTGCTGAAAGCTAG-3' (SEQ ID NO:122)

Additionally, a synthetic oligonucleotide hybridization probe was constructed from the DNA30934 consensus sequence which had the following nucleotide sequence:

hybridization probe (30934.p1):

20

5'-GAAACGAGGAGCGGCTCAGTGGTGATCGTGTCTCCATAGCAGCC-3' (SEQ ID NO:123)

In order to screen several libraries for a source of a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification with the PCR primers identified above. A positive library was then used to isolate clones encoding the PRO1800 gene using the probe oligonucleotide and one of the PCR primers. RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from human fetal liver tissue.

25

DNA sequencing of the isolated clones isolated as described above gave the full-length DNA sequence for DNA35672-2508 [Figure 59, SEQ ID NO:59]; and the derived protein sequence for PRO1800.

The entire coding sequence of DNA35672-2508 is included in Figure 59 (SEQ ID NO:59). Clone DNA35672-2508 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 36-38, and an apparent stop codon at nucleotide positions 870-872. The predicted polypeptide precursor is 278 amino acids long and has an estimated molecular weight of about 29,537 daltons and a pI of about 8.97. Analysis of the full-length PRO1800 sequence shown in Figure 60 (SEQ ID NO:60) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO1800 polypeptide shown in Figure 60 evidences the presence of the following: a signal sequence from about amino acid 1 to about amino acid 15; an N-glycosylation site from about amino acid 183 to about amino acid 187; N-myristoylation sites from about amino

35

WO 01/53486

PCT/US00/03565

acid 43 to about amino acid 49, from about amino acid 80 to about amino acid 86, from about amino acid 191 to about amino acid 197, from about amino acid 213 to about amino acid 219, and from about amino acid 272 to about amino acid 278; a microbodies C-terminal targeting signal from about amino acid 276 to about amino acid 280; and a short-chain alcohol dehydrogenase sequence from about amino acid 162 to about amino acid 199. Clone DNA35672-2508 has been deposited with the ATCC on December 15, 1998 and is assigned ATCC deposit no. 203538.

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using a WU-BLAST2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 60 (SEQ ID NO:60), evidenced significant homology between the PRO1800 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: HE27_HUMAN, CELF36H9_1, CEF54F3_3, A69621, AP000007_227, UCFA_ECOLI, F69868, Y4LA_RHISN, DHK2_STRVN, and DHG1_BACME.

EXAMPLE 23

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO539

An expressed sequence tag (EST) DNA database (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) was searched and an EST (1299359) was identified which showed homology to Costal-2 protein of *Drosophila melanogaster*. This EST sequence was then compared to various EST databases including public EST databases (e.g., GenBank), and a proprietary EST database (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) to identify homologous EST sequences. The comparison was performed using the computer program BLAST or BLAST2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)) and another sequence EST. The comparisons were clustered and assembled into a consensus DNA sequence with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington). This consensus sequence is herein designated "consensus".

Based on the assembled "consensus" sequence, oligonucleotides were synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for PRO539. Forward and reverse PCR primers generally range from 20 to 30 nucleotides and are often designed to give a PCR product of about 100-1000 bp in length. The probe sequences are typically 40-55 bp in length. In some cases, additional oligonucleotides are synthesized when the consensus sequence is greater than about 1-1.5 kbp. In order to screen several libraries for a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification, as per Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, *supra*, with the PCR primer pair. A positive library was then used to isolate clones encoding the gene of interest using the probe oligonucleotide and one of the primer pairs.

PCR primers (forward and reverse) were synthesized:

forward PCR primer (hcos2.F):

5'-GATGAGGCCATCGAGGCCCTGG-3' (SEQ ID NO:124)

reverse PCR primer (hcos2.R):

5'-TCTCGGAGCGTCACCACCTTGTC-3' (SEQ ID NO:125)

Additionally, a synthetic oligonucleotide hybridization probe was constructed from the "consensus" sequence

WO 01/53486

PCT/US00/03565

which had the following nucleotide sequence:

hybridization probe (hcos2.P):

5'-CTGGATGCTGCCATTGAGTATAAGAATGAGGCCATCACA-3' (SEQ ID NO:126)

RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from human fetal kidney tissue. The cDNA libraries used to isolate the cDNA clones were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to SalI hemikinased adaptors, cleaved with NotI, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRKB or pRKD; pRK5B is a precursor of pRK5D that does not contain the SfiI site; see, Holmes *et al.*, *Science*, 253:1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NotI sites.

DNA sequencing of the isolated clones isolated as described above gave the full-length DNA sequence for DNA47465-1561 [Figure 65, SEQ ID NO:65]; and the derived protein sequence for PRO539.

The entire coding sequence of DNA47465-1561 is included in Figure 65 (SEQ ID NO:65). Clone DNA47465-1561 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 186-188, and an apparent stop codon at nucleotide positions 2676-2678. The predicted polypeptide precursor is 830 amino acids long and has an estimated molecular weight of about 95,029 daltons and a pI of about 8.26. Analysis of the full-length PRO539 sequence shown in Figure 66 (SEQ ID NO:66) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO539 polypeptide shown in Figure 66 evidences the presence of the following: leucine zipper patterns from about amino acid 557 to about amino acid 579 and from about amino acid 794 to about amino acid 816; N-glycosylation sites from about amino acid 133 to about amino acid 137 and from about amino acid 383 to about amino acid 387; and a kinesin related protein Kif-4 coiled-coil domain from about amino acid 231 to about amino acid 672. Clone DNA47465-1561 has been deposited with the ATCC on February 9, 1999 and is assigned ATCC deposit no. 203661.

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using a WU-BLAST2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 66 (SEQ ID NO:66), evidenced significant homology between the PRO539 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: AF019250_1, KIF4_MOUSE, TRHY_HUMAN, A56514, G02520, MYSP_HUMAN, AF041382_1, A45592, HS125H2_1, and HS6802_2.

30

EXAMPLE 24

Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO4316

A cDNA clone designated herein as DNA80935 was identified by a yeast screen, in a human adrenal gland cDNA library that preferentially represents the 5' ends of the primary cDNA clones. This cDNA was then compared to other known EST sequences, wherein the comparison was performed using the computer program BLAST or BLAST2 [Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)]. Those comparisons resulting in a BLAST score of 70 (or in some cases, 90) or greater that did not encode known proteins were clustered and assembled into a consensus DNA sequence with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

WO 01/53486

PCT/US00/03565

This consensus sequence is herein designated DNA83527.

PCR primers (forward and reverse) were synthesized based upon the DNA83527 sequence:

forward PCR primer:

5'-TGGACGACCAGGAGAAGCTGC-3' (SEQ ID NO:127)

5 reverse PCR primer:

5'-CTCCACTGTCCTCTGGAAGGTGG-3' (SEQ ID NO:128)

Additionally, a synthetic oligonucleotide hybridization probe was constructed from the DNA83527 consensus sequence which had the following nucleotide sequence:

hybridization probe:

10 5'-GCAAGAGGCAGAACCATGTTAGATGAGCCTCAGGAACAAGCGG-3' (SEQ ID NO:129)

RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from human adrenal gland tissue. The cDNA libraries used to isolate the cDNA clones were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to SalI hemikinased adaptors, cleaved with NotI, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRKB or pRKD; pRK5B is a precursor of pRK5D that does not contain the SfiI site; *see*, Holmes *et al.*, Science, 253:1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NotI sites.

The full-length DNA94713-2561 clone obtained from this screen is shown in Figure 67 [SEQ ID NO:67] and contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 293-295, and an apparent stop codon at nucleotide positions 1934-1936. The predicted polypeptide precursor is 547 amino acids long (Figure 68). The full-length PRO4316 protein shown in Figure 68 has an estimated molecular weight of about 61,005 daltons and a pI of about 6.34. Analysis of the full-length PRO4316 sequence shown in Figure 68 (SEQ ID NO:68) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO4316 polypeptide shown in Figure 68 evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 23; transmembrane domains from about amino acid 42 to about amino acid 60 and from about amino acid 511 to about amino acid 530; N-glycosylation sites from about amino acid 259 to about amino acid 263 and from about amino acid 362 to about amino acid 366; casein kinase II phosphorylation sites from about amino acid 115 to about amino acid 119, from about amino acid 186 to about amino acid 190, from about amino acid 467 to about amino acid 471, and from about amino acid 488 to about amino acid 494; N-myristoylation sites from about amino acid 255 to about amino acid 261, from about amino acid 304 to about amino acid 310, and from about amino acid 335 to about amino acid 341; and amidation sites from about amino acid 7 to about amino acid 11 and from about amino acid 174 to about amino acid 178. Clone DNA94713-2561 has been deposited with the ATCC on March 9, 1999 and is assigned ATCC deposit no. 203835.

35 An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using a WU-BLAST2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 68 (SEQ ID NO:68), evidenced significant homology between the PRO4316 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: YDA9_SCHPO,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

S67452, S69714, DP27_CAEEL, S47053, CEY43F8C_4, VP2_BRD, and SPCC895_9.

EXAMPLE 25Isolation of cDNA Clones Encoding Human PRO4980

An initial DNA sequence, referred to herein as DNA81573 was identified by a yeast screen, in a human cDNA library that preferentially represents the 5' ends of the primary cDNA clones. This cDNA was then compared to ESTs from public databases (*e.g.*, GenBank), and a proprietary EST database (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA), using the computer program BLAST or BLAST2 [Altschul *et al.*, Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)]. The ESTs were clustered and assembled into a consensus DNA sequence with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington). This consensus sequence is herein designated DNA90613.

PCR primers (forward and reverse) were synthesized based upon the DNA90613 sequence for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for PRO4980 from a human aortic endothelial cell cDNA library:

forward PCR primer:

15 5'-CAACCGTATGGGACCGATACTCG-3' (SEQ ID NO:130)

reverse PCR primer:

5'-CACGCTCAACGAGTCTTCATG-3' (SEQ ID NO:131)

hybridization probe:

5'-GTGGCCCTCGCAGTGCAGGCCCTTCTACGTCCAATACAAGTG-3' (SEQ ID NO:132)

RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from human aortic endothelial cell tissue. The cDNA libraries used to isolate the cDNA clones were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to SalI hemikinased adaptors, cleaved with NotI, sized appropriately by gel electrophoresis, and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRKB or pRKD; pRK5B is a precursor of pRK5D that does not contain the SfiI site; *see*, Holmes *et al.*, Science, 253:1278-1280 (1991)) in the unique XhoI and NotI sites.

The full-length DNA97003-2649 clone obtained from this screen is shown in Figure 69 [SEQ ID NO:69] and contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 286-288, and an apparent stop codon at nucleotide positions 1900-1902. The predicted polypeptide precursor is 538 amino acids long (Figure 70). The full-length PRO4980 protein shown in Figure 70 has an estimated molecular weight of about 59,268 daltons and a pI of about 8.94. Analysis of the full-length PRO4980 sequence shown in Figure 70 (SEQ ID NO:70) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Analysis of the full-length PRO4980 polypeptide shown in Figure 70 evidences the presence of the following: a signal peptide from about amino acid 1 to about amino acid 36; transmembrane domains from about amino acid 77 to about amino acid 95, from about amino acid 111 to about amino acid 133, from about amino acid 161 to about amino acid 184, from about amino acid 225 to about amino acid 248, from about amino acid 255 to about amino acid 273, from about

WO 01/53486

PCT/US00/03565

amino acid 299 to about amino acid 314, from about amino acid 348 to about amino acid 373, from about amino acid 406 to about amino acid 421, from about amino acid 435 to about amino acid 456, and from about amino acid 480 to about amino acid 497; an N-glycosylation site from about amino acid 500 to about amino acid 504; a cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site from about amino acid 321 to about amino acid 325; N-myristoylation sites from about amino acid 13 to about amino acid 19, from about amino acid 18 to about amino acid 24, from about amino acid 80 to about amino acid 86, from about amino acid 111 to about amino acid 117, from about amino acid 118 to about amino acid 124, from about amino acid 145 to about amino acid 151, from about amino acid 238 to about amino acid 244, from about amino acid 251 to about amino acid 257, from about amino acid 430 to about amino acid 436, from about amino acid 433 to about amino acid 439, from about amino acid 448 to about amino acid 454, from about amino acid 458 to about amino acid 464, from about amino acid 468 to about amino acid 474, from about amino acid 475 to about amino acid 481, from about amino acid 496 to about amino acid 502, and from about amino acid 508 to about amino acid 514; and a prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site from about amino acid 302 to about amino acid 313. Clone DNA97003-2649 has been deposited with the ATCC on May 11, 1999 and is assigned ATCC deposit no. PTA-43.

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using a WU-BLAST2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 70 (SEQ ID NO:70), evidenced significant homology between the PRO4980 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: SC59_YEAST, S76857, CELF31F4_12, AC002464_1, NU5M_CHOCR, S59109, SAY10108_2, AF055482_2, F69049, and G70433.

EXAMPLE 26

Gene Amplification

This example shows that the PRO197-, PRO207-, PRO226-, PRO232-, PRO243-, PRO256-, PRO269-, PRO274-, PRO304-, PRO339-, PRO1558-, PRO779-, PRO1185-, PRO1245-, PRO1759-, PRO5775-, PRO7133-, PRO7168-, PRO5725-, PRO202-, PRO206-, PRO264-, PRO313-, PRO342-, PRO542-, PRO773-, PRO861-, PRO1216-, PRO1686-, PRO1800-, PRO3562-, PRO9850-, PRO539-, PRO4316- or PRO4980-encoding genes are amplified in the genome of certain human lung, colon and/or breast cancers and/or cell lines. Amplification is associated with overexpression of the gene product, indicating that the polypeptides are useful targets for therapeutic intervention in certain cancers such as colon, lung, breast and other cancers. Therapeutic agents may take the form of antagonists of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptides, for example, murine-human chimeric, humanized or human antibodies against a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide.

The starting material for the screen was genomic DNA isolated from a variety of cancers. The DNA is

WO 01/53486

PCT/US00/03565

quantitated precisely, e.g., fluorometrically. As a negative control, DNA was isolated from the cells of ten normal healthy individuals which was pooled and used as assay controls for the gene copy in healthy individuals (not shown). The 5' nuclease assay (for example, TaqMan™) and real-time quantitative PCR (for example, ABI Prism 7700 Sequence Detection System™ (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA)), were used

5 to find genes potentially amplified in certain cancers. The results were used to determine whether the DNA encoding PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 is over-represented in any of the primary lung or colon cancers or

10 cancer cell lines or breast cancer cell lines that were screened. The primary lung cancers were obtained from individuals with tumors of the type and stage as indicated in Table 6. An explanation of the abbreviations used for the designation of the primary tumors listed in Table 6 and the primary tumors and cell lines referred to throughout this example has been given hereinbefore.

The results of the TaqMan™ are reported in delta (Δ) Ct units. One unit corresponds to 1 PCR cycle or

15 approximately a 2-fold amplification relative to normal, two units corresponds to 4-fold, 3 units to 8-fold amplification and so on. Quantitation was obtained using primers and a TaqMan™ fluorescent probe derived from the PRO197-, PRO207-, PRO226-, PRO232-, PRO243-, PRO256-, PRO269-, PRO274-, PRO304-, PRO339-, PRO1558-, PRO779, PRO1185-, PRO1245-, PRO1759-, PRO5775-, PRO7133-, PRO7168-, PRO5725-, PRO202-, PRO206-, PRO264-, PRO313-, PRO342-, PRO542-, PRO773-, PRO861-, PRO1216-, PRO1686-, PRO1800-,

20 PRO3562-, PRO9850-, PRO539-, PRO4316- or PRO4980-encoding gene. Regions of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 which are most likely to contain unique nucleic acid sequences and which are least likely to have spliced out introns are

25 preferred for the primer and probe derivation, e.g., 3'-untranslated regions. The sequences for the primers and probes (forward, reverse and probe) used for the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 gene amplification analysis were

30 as follows:

PRO197 (DNA22780-1078);

22780.tm.f:

5'-GCCATCTGGAACCTTGTGGAC-3' (SEQ ID NO:133)

22780.tm.p:

35 5'-AGAAGACCACTGACTGGAGAAGCCCC-3' (SEQ ID NO:134)

22780.tm.r:

5'-AGCCCCCTGCACCTCAG-3' (SEQ ID NO:135)

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO207 (DNA30879-1152):

30879.tn.f:

5'-GACCTGCCCCCTCCCTCTAGA-3' (SEQ ID NO:136)

30879.tn.p:

5 5'-CTGCCTGGGCCTGTTACGTGTT-3' (SEQ ID NO:137)

30879.tn.r

5'-GGAATACTGTATTTATGTGGGATGGA-3' (SEQ ID NO:138)

PRO226 (DNA33460-1166):

33460.3utr-5:

10 5'-GCAATAAAGGGAGAAAGAAAGTCCT-3' (SEQ ID NO:139)

33460.3utr-probe.rc:

5'-TGACCCGCCCCACCTCAGCCA-3' (SEQ ID NO:140)

33460.3utr-3b:

5'-GCCTGAGGCTTCCTGCAGT-3' (SEQ ID NO:141)

15 PRO232 (DNA34435-1140):

34435.3utr-5:

5'-GCCAGGCTTCACATTCGT-3' (SEQ ID NO:142)

34435.3utr-probe:

5'-CTCCCTGAATGGCAGCCTGAGCA-3' (SEQ ID NO:143)

20 34435.3utr-3:

5'-AGGTGTTTATTAAGGCCTACGCT-3' (SEQ ID NO:144)

PRO243 (DNA35917-1207):

35917.tn.f:

5'-CCAGTGCCCTTGTCTCTCTG-3' (SEQ ID NO:145)

25 35917.tn.p:

5'-TGCCTCTACTCCACCCCACTACCT-3' (SEQ ID NO:146)

35917.tn.r:

5'-TGTGGAGCTGTGGTTCCCA-3' (SEQ ID NO:147)

PRO256 (DNA35880-1160):

30 35880.3utr-5:

5'-TGTCTCTCCGAGCTCCTCT-3' (SEQ ID NO:148)

35880.3utr-probe:

5'-CCATGCTGTGCGCCAGGG-3' (SEQ ID NO:149)

WO 01/53486

PCT/US00/03565

35880.3utr-3:

5'-GCACAAACTACACAGGGAAGTCC-3' (SEQ ID NO:150)

PRO269 (DNA38260-1180):

38260.tm.f:

5 5'-CAGAGCAGAGGGTGCCTTG-3' (SEQ ID NO:151)

38260.tm.p:

5'-TGGCGAGTCCCTCTTGGCT-3' (SEQ ID NO:152)

38260.tm.r:

5'-CCCTGTTCCCTATGCATCACT-3' (SEQ ID NO:153)

10 PRO274 (DNA39987-1184):

39987.tm.f:

5'-GGACGGTCAGTCAGGATGACA-3' (SEQ ID NO:154)

39987.tm.p:

5'-TTCGGCATCATCTCTTCCCTCTCC-3' (SEQ ID NO:155)

15 39987.tm.r:

5'-ACAAAAAAGGGAACAAAATACGA-3' (SEQ ID NO:156)

PRO304 (DNA39520-1217):

39520.tm.f:

5'-TCAACCCCTGACCCCTTCTTA-3' (SEQ ID NO:157)

20 39520.tm.p:

5'-GGCAGGGGACAAGCCATCTCTCT-3' (SEQ ID NO:158)

39520.tm.r:

5'-GGGACTGAAGTCCAGCTTC-3' (SEQ ID NO:159)

PRO339 (DNA43466-1225):

25 43466.tm.fl:

5'-GGGCCCTAACCTCATTACCTTT-3' (SEQ ID NO:160)

43466.tm.pl:

5'-TGTCTGCCTCAGCCCAGGAAGG-3' (SEQ ID NO:161)

43466.tm.rl:

30 5'-TCTGTCCACCATCTTGCCTTG-3' (SEQ ID NO:162)

PRO1558 (DNA71282-1668):

71282.tm.fl:

5'-ACTGCTCCGCCTACTACGA-3' (SEQ ID NO:163)

WO 01/53486

PCT/US00/03565

- 71282.tm.p1:
5'-AGGCA TCCTCGCCGTCCTCA -3' (SEQ ID NO:164)
71282.tm.r1:
5'-AAGGCCAAGGTGAGTCCAT -3' (SEQ ID NO:165)
5 71282.tm.f2:
5'-CGAGTGTGTGCGAAACCTAA -3' (SEQ ID NO:166)
71282.tm.p2:
5'-TCAGGGTCTACATCAGCCTCCTGC -3' (SEQ ID NO:167)
71282.tm.r2:
10 5'-AAGGCCAAGGTGAGTCCAT -3' (SEQ ID NO:168)
- PRO779 (DNA58801-1052):
58801.tm.fl:
5'-CCCTATCGCTCCAGCCAA -3' (SEQ ID NO:169)
15 58801.tm.p1:
5'-CGAAGAAGCACGAAACGAATGTCGAGA -3' (SEQ ID NO:170)
58801.tm.r1:
5'-CCGAGAAGTTGAGAAATGTCTTCA -3' (SEQ ID NO:171)
- PRO1185 (DNA62881-1515):
20 62881.tm.fl:
5'-ACAGATCCAGGAGAGACTCCACA -3' (SEQ ID NO:172)
62881.tm.p1:
5'-AGCGGCGCTCCCAGCCTGAAT -3' (SEQ ID NO:173)
62881.tm.r1:
25 5'-CATGATTGGTCCTCAGTTCATC -3' (SEQ ID NO:174)
- PRO1245 (DNA64884-1527):
64884.tm.fl:
5'-ATAGAGGGCTCCCAGAAGTG -3' (SEQ ID NO:175)
64884.tm.p1:
30 5'-CAGGGCCTTCAGGCTTCAC -3' (SEQ ID NO:176)
64884.tm.r1:
5'-GCTCAGCCAAACACTGTCA -3' (SEQ ID NO:177)
64884.tm.f2:
5'-GGGGCCCTGACAGTGT -3' (SEQ ID NO:178)
35 64884.tm.p2:
5'-CTGAGCCGAGACTGGAGCATCTACAC -3' (SEQ ID NO:179)

WO 01/53486

PCT/US00/03565

64884.tm.r2:

5'-GTGGGCAGCGTCTGTGTC-3' (SEQ ID NO:180)

PRO1759 (DNA76531-1701):

76531.tm.fl:

5 5'-CCTACTGAGGAGCCCTATGC-3' (SEQ ID NO:181)

76531.tm.pl:

5'-CCTGAGCTGTAACCCCACTCCAGG-3' (SEQ ID NO:182)

76531.tm.r1:

5'-AGAGTCTGTCCAGCTATCTTGT-3' (SEQ ID NO:183)

10 PRO5775 (DNA96869-2673):

96869.tm.fl:

5'-GGGGAACCATTCCAACATC-3' (SEQ ID NO:184)

96869.tm.pl:

5'-CCATTACAGCAGGGTGAACCACAG-3' (SEQ ID NO:185)

15 96869.tm.r1:

5'-TCTCCGTGACCATGAACTTG-3' (SEQ ID NO:186)

PRO7133 (DNA128451-2739):

128451.tm.fl:

5'-TTAGGGAATTGGTGCTCAA-3' (SEQ ID NO:187)

20 128451.tm.pl:

5'-TGTCTCTCCCTTGCTCTTCCC-3' (SEQ ID NO:188)

128451.tm.r1:

5'-TCCTGCAGTAGGTATTTTCAGTTT-3' (SEQ ID NO:189)

25 PRO7168 (DNA102846-2742):

102846.tm.fl:

5'-GAGCCGGTGGTCTCAAAC-3' (SEQ ID NO:190)

102846.tm.pl:

5'-CCGGGGTCTAGTCCCTTC-3' (SEQ ID NO:191)

30 102846.tm.r1:

5'-TTTACTGCTGCGCTCCAA-3' (SEQ ID NO:192)

PRO5725 (DNA92265-2669):

92265.tm.fl:

5'-CAGCTGCAGTGTGGGAAT-3' (SEQ ID NO:193)

WO 01/53486

PCT/US00/03565

92265.tm.p1:

5'-CACTACAGCAAGAAGCTCGCCAGG-3' (SEQ ID NO:194)

92265.tm.r1:

5'-CGCACAGAGTGTGCAAGTTAT-3' (SEQ ID NO:195)

5 PRO202 (DNA30869):

30869.tm.f:

5'-CGGAAGGAGGCCAACCA-3' (SEQ ID NO:196)

30869.tm.p:

5'-CGACAGTGCATCCCCACCTTCA-3' (SEQ ID NO:197)

10 30869.tm.r:

5'-TTCTTTCTCCATCCCTCCGA-3' (SEQ ID NO:198)

PRO206 (DNA34405):

34405.tm.f:

5'-GCATGGCCCCAACGGT-3' (SEQ ID NO:199)

15 34405.tm.p:

5'-CACGACTCAGTATCCATGCTCTTGACCTTGT-3' (SEQ ID NO:200)

34405.tm.r:

5'-TGGCTGTAAATACGCGTGTCT-3' (SEQ ID NO:201)

PRO264 (DNA36995):

20 36995.3tm-5:

5'-CCTGTGAGATTGTGGATGAGAAGA-3' (SEQ ID NO:202)

36995.3tm-probe:

5'-CCACACCAGCCAGACTCCAGTTGACC-3' (SEQ ID NO:203)

36995.3tm-3:

25 5'-GGGTGGTGCCCTCCTGA-3' (SEQ ID NO:204)

PRO313 (DNA43320):

43320.tm.f:

5'-CCATTGTTTCAGACGTTGGTCA-3' (SEQ ID NO:205)

43320.tm.p:

30 5'-CTCTGTAACTCTAAGATTCCTAAGGCATGCTGTGTC-3' (SEQ ID NO:206)

43320.tm.r:

5'-ATCGAGATAGCACTGAGTTCTGTGC-3' (SEQ ID NO:207)

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO342 (DNA38649):

38649.tm.f:

5'-CTCGGCTCGCGAAACTACA-3' (SEQ ID NO:208)

38649.tm.p:

5 5'-TGCCCGCACAGACTTCTACTGCCTG-3' (SEQ ID NO:209)

38649.tm.r:

5'-GGAGCTACATATCATCCTTGGACA-3' (SEQ ID NO:210)

38649.tm.f2:

5'-GAGATAAACGACGGGAAGCTCTAC-3' (SEQ ID NO:211)

10 38649.tm.p2:

5'-ACGCCTACGTCCTCTACAGCGACTGC-3' (SEQ ID NO:212)

38649.tm.r2:

5'-GCTCGCGCTTTAGGATGAAGT-3' (SEQ ID NO:213)

15 PRO542 (DNA56505):

56505.tm.fl:

5'-CCTTGGCCCTCCATTCTGTC-3' (SEQ ID NO:214)

56505.tm.pl:

5'-TGCTGCTCAGGCCCATGCTATGAGT-3' (SEQ ID NO:215)

20 56505.tm.rl:

5'-GGGTGTAGTCCAGAACAGCTAGAGA-3' (SEQ ID NO:216)

PRO773 (DNA48303):

48303.tm.fl:

5'-CCCATTCCTCAGCTTCTTG-3' (SEQ ID NO:217)

25 48303.tm.pl:

5'-CTCAGAGCCAAGGCTCCCCAGA-3' (SEQ ID NO:218)

48303.tm.rl:

5'-TCAAGGACTGAACCATGCTAGA-3' (SEQ ID NO:219)

30 PRO861 (DNA50798):

50798.tm.fl:

5'-ACCATGTACTACGTGCCAGCTCTA-3' (SEQ ID NO:220)

50798.tm.pl:

5'-ATTCTGACTTCTCTGATTTTGGCATGTGG-3' (SEQ ID NO:221)

35 50798.tm.rl:

5'-GGCTTGAACTCTCCTTATAGGAGTGT-3' (SEQ ID NO:222)

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO1216 (DNA66489):

66489.tm.fl:

5'-CTAACTGCCCAGCTCCAAGAA -3' (SEQ ID NO:223)

66489.tm.pl:

5. 5'-TCACAGCACTCTCCAGGCACCTCAA -3' (SEQ ID NO:224)

66489.tm.rl:

5'-TCTGGGCCACAGATCCACTT-3' (SEQ ID NO:225)

PRO1686 (DNA80896):

80896.tm.fl:

10 5'-GCTCAGCCCTAGACCCCTGACTT -3' (SEQ ID NO:226)

80896.tm.pl:

5'-CAGGCTCAGCTGCTGTCTTAACCTCAGTAATG -3' (SEQ ID NO:227)

80896.tm.rl:

5'-CGTGGACAGCAGGAGCCT-3' (SEQ ID NO:228)

15 PRO1800 (DNA35672-2508):

35672.tm.fl:

5'-ACTCGGGATTCTCTGTGTT-3' (SEQ ID NO:229)

35672.tm.rl:

5'-GGCCTGTCCTGTGTTCTCA-3' (SEQ ID NO:230)

20 35672.tm.pl:

5'-AGGCCTTTACCCAAGGCCACAAC-3' (SEQ ID NO:231)

PRO3562 (DNA96791):

96791.tm.fl:

25 5'-GACCCACGCGCTACGAA -3' (SEQ ID NO:232)

96791.tm.pl:

5'-CGGTCTCTTCATGGACGTCAACAG -3' (SEQ ID NO:233)

96791.tm.rl:

5'-GGTCCACGGTCTCTCCAGGT -3' (SEQ ID NO:234)

30 PRO9850 (DNA58725):

58725.tm.fl:

5'-ATGATTGGTAGGAAATGAGGTAAAGTACT-3' (SEQ ID NO:235)

58725.tm.pl:

5'-CCATCTTCTCTGGCACATTGAGGAACTG -3' (SEQ ID NO:236)

WO 01/53486

PCT/US00/03565

58725.tm.r1:

5'-TGATCTAGAACTTAACTTTGGAAAACAAC-3' (SEQ ID NO:237)

PRO539 (DNA47465-1561):

47465.tm.fl:

5 5'-TCCCACCACTTACTTCCATGAA-3' (SEQ ID NO:238)

47465.tm.r1:

5'-ATTGTCCTGAGATTGAGCAAGA-3' (SEQ ID NO:239)

47465.tm.p1:

5'-CTGTGGTACCCAATTGCCGCCCTTGT-3' (SEQ ID NO:240)

10 PRO4316 (DNA94713-2561):

94713.tm.fl:

5'-GGTCACCTGTGGGACCTT-3' (SEQ ID NO:241)

94713.tm.r1:

5'-TGCACCTGACAGACAAAGC-3' (SEQ ID NO:242)

15 94713.tm.p1:

5'-TCCCTCACTCCCTCCCTCCTAGT-3' (SEQ ID NO:243)

PRO4980 (DNA97003-2649):

97003.tm.fl:

5'-AAGCCTTTGGGTCACACTCT-3' (SEQ ID NO:244)

20 97003.tm.r1:

5'-TGGTCCACTGTCTCGTTCA-3' (SEQ ID NO:245)

97003.tm.p1:

5'-CGGAGCTTCTGTCCCTTTTCTG-3' (SEQ ID NO:246)

25 The 5' nuclease assay reaction is a fluorescent PCR-based technique which makes use of the 5' exonuclease activity of Taq DNA polymerase enzyme to monitor amplification in real time. Two oligonucleotide primers are used to generate an amplicon typical of a PCR reaction. A third oligonucleotide, or probe, is designed to detect nucleotide sequence located between the two PCR primers. The probe is non-extendible by Taq DNA polymerase enzyme, and is labeled with a reporter fluorescent dye and a quencher fluorescent dye. Any laser-induced emission

30 from the reporter dye is quenched by the quenching dye when the two dyes are located close together as they are on the probe. During the amplification reaction, the Taq DNA polymerase enzyme cleaves the probe in a template-dependent manner. The resultant probe fragments disassociate in solution, and signal from the released reporter dye is free from the quenching effect of the second fluorophore. One molecule of reporter dye is liberated for each new molecule synthesized, and detection of the unquenched reporter dye provides the basis for quantitative

35 interpretation of the data.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

The 5' nuclease procedure is run on a real-time quantitative PCR device such as the ABI Prism 7700™ Sequence Detection. The system consists of a thermocycler, laser, charge-coupled device (CCD) camera and computer. The system amplifies samples in a 96-well format on a thermocycler. During amplification, laser-induced fluorescent signal is collected in real-time through fiber optics cables for all 96 wells, and detected at the CCD. The system includes software for running the instrument and for analyzing the data.

5' Nuclease assay data are initially expressed as Ct, or the threshold cycle. This is defined as the cycle at which the reporter signal accumulates above the background level of fluorescence. The ΔC_t values are used as quantitative measurement of the relative number of starting copies of a particular target sequence in a nucleic acid sample when comparing cancer DNA results to normal human DNA results.

Table 6 describes the stage, T stage and N stage of various primary tumors which were used to screen the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 compounds of the invention.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 6
Primary Lung and Colon Tumor Profiles

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

40 DNA Preparation:

DNA was prepared from cultured cell lines, primary tumors, and normal human blood. The isolation was performed using purification kit, buffer set and protease and all from Qiagen, according to the manufacturer's instructions and the description below.

Cell culture lysis:

- 45 Cells were washed and trypsinized at a concentration of 7.5×10^6 per tip and pelleted by centrifuging at 1000 rpm for 5 minutes at 4°C, followed by washing again with 1/2 volume of PBS and recentrifugation. The pellets were washed a third time, the suspended cells collected and washed 2x with PBS. The cells were then suspended into 10 ml PBS. Buffer C1 was equilibrated at 4°C. Qiagen protease #19155 was diluted into 6.25 ml cold ddH₂O to a final concentration of 20 mg/ml and equilibrated at 4°C. 10 ml of G2 Buffer was prepared by

WO 01/53486

PCT/US00/03565

diluting Qiagen RNase A stock (100 mg/ml) to a final concentration of 200 µg/ml.

Buffer C1 (10 ml, 4°C) and ddH₂O (40 ml, 4°C) were then added to the 10 ml of cell suspension, mixed by inverting and incubated on ice for 10 minutes. The cell nuclei were pelleted by centrifuging in a Beckman swinging bucket rotor at 2500 rpm at 4°C for 15 minutes. The supernatant was discarded and the nuclei were suspended with a vortex into 2 ml Buffer C1 (at 4°C) and 6 ml ddH₂O, followed by a second 4°C centrifugation at 2500 rpm for 15 minutes. The nuclei were then resuspended into the residual buffer using 200 µl per tip. G2 buffer (10 ml) was added to the suspended nuclei while gentle vortexing was applied. Upon completion of buffer addition, vigorous vortexing was applied for 30 seconds. Qiagen protease (200 µl, prepared as indicated above) was added and incubated at 50°C for 60 minutes. The incubation and centrifugation were repeated until the lysates were clear (e.g., incubating additional 30-60 minutes, pelleting at 3000 x g for 10 min., 4°C).

Solid human tumor sample preparation and lysis:

Tumor samples were weighed and placed into 50 ml conical tubes and held on ice. Processing was limited to no more than 250 mg tissue per preparation (1 tip/preparation). The protease solution was freshly prepared by diluting into 6.25 ml cold ddH₂O to a final concentration of 20 mg/ml and stored at 4°C. G2 buffer (20 ml) was prepared by diluting DNase A to a final concentration of 200 mg/ml (from 100 mg/ml stock). The tumor tissue was homogenated in 19 ml G2 buffer for 60 seconds using the large tip of the polytron in a laminar-flow TC hood in order to avoid inhalation of aerosols, and held at room temperature. Between samples, the polytron was cleaned by spinning at 2 x 30 seconds each in 2L ddH₂O, followed by G2 buffer (50 ml). If tissue was still present on the generator tip, the apparatus was disassembled and cleaned.

Qiagen protease (prepared as indicated above, 1.0 ml) was added, followed by vortexing and incubation at 50°C for 3 hours. The incubation and centrifugation were repeated until the lysates were clear (e.g., incubating additional 30-60 minutes, pelleting at 3000 x g for 10 min., 4°C).

Human blood preparation and lysis:

Blood was drawn from healthy volunteers using standard infectious agent protocols and citrated into 10 ml samples per tip. Qiagen protease was freshly prepared by dilution into 6.25 ml cold ddH₂O to a final concentration of 20 mg/ml and stored at 4°C. G2 buffer was prepared by diluting RNase A to a final concentration of 200 µg/ml from 100 mg/ml stock. The blood (10 ml) was placed into a 50 ml conical tube and 10 ml C1 buffer and 30 ml ddH₂O (both previously equilibrated to 4°C) were added, and the components mixed by inverting and held on ice for 10 minutes. The nuclei were pelleted with a Beckman swinging bucket rotor at 2500 rpm, 4°C for 15 minutes and the supernatant discarded. With a vortex, the nuclei were suspended into 2 ml C1 buffer (4°C) and 6 ml ddH₂O (4°C). Vortexing was repeated until the pellet was white. The nuclei were then suspended into the residual buffer using a 200 µl tip. G2 buffer (10 ml) was added to the suspended nuclei while gently vortexing, followed by vigorous vortexing for 30 seconds. Qiagen protease was added (200 µl) and incubated at 50°C for 60 minutes. The incubation and centrifugation were repeated until the lysates were clear (e.g., incubating additional 30-60 minutes, pelleting at 3000 x g for 10 min., 4°C).

Purification of cleared lysates:

(1) Isolation of genomic DNA:

Genomic DNA was equilibrated (1 sample per maxi tip preparation) with 10 ml QBT buffer. QF elution

WO 01/53486

PCT/US00/03565

buffer was equilibrated at 50°C. The samples were vortexed for 30 seconds, then loaded onto equilibrated tips and drained by gravity. The tips were washed with 2 x 15 ml QC buffer. The DNA was eluted into 30 ml silanized, autoclaved 30 ml Corex tubes with 15 ml QF buffer (50°C). Isopropanol (10.5 ml) was added to each sample, the tubes covered with parafilm and mixed by repeated inversion until the DNA precipitated. Samples were pelleted by

- 5 centrifugation in the SS-34 rotor at 15,000 rpm for 10 minutes at 4°C. The pellet location was marked, the supernatant discarded, and 10 ml 70% ethanol (4°C) was added. Samples were pelleted again by centrifugation on the SS-34 rotor at 10,000 rpm for 10 minutes at 4°C. The pellet location was marked and the supernatant discarded. The tubes were then placed on their side in a drying rack and dried 10 minutes at 37°C, taking care not to overdry the samples.
- 10 After drying, the pellets were dissolved into 1.0 ml TE (pH 8.5) and placed at 50°C for 1-2 hours. Samples were held overnight at 4°C as dissolution continued. The DNA solution was then transferred to 1.5 ml tubes with a 26 gauge needle on a tuberculin syringe. The transfer was repeated 5x in order to shear the DNA. Samples were then placed at 50°C for 1-2 hours.

(2) Quantitation of genomic DNA and preparation for gene amplification assay:

- 15 The DNA levels in each tube were quantified by standard A_{260}/A_{280} spectrophotometry on a 1:20 dilution (5 μ l DNA + 95 μ l ddH₂O) using the 0.1 ml quartz cuvettes in the Beckman DU640 spectrophotometer. A_{260}/A_{280} ratios were in the range of 1.8-1.9. Each DNA sample was then diluted further to approximately 200 ng/ml in TE (pH 8.5). If the original material was highly concentrated (about 700 ng/ μ l), the material was placed at 50°C for several hours until resuspended.

- 20 Fluorometric DNA quantitation was then performed on the diluted material (20-600 ng/ml) using the manufacturer's guidelines as modified below. This was accomplished by allowing a Hoeffer DyNA Quant 200 fluorometer to warm-up for about 15 minutes. The Hoechst dye working solution (#H33258, 10 μ l, prepared within 12 hours of use) was diluted into 100 ml 1 x TNE buffer. A 2 ml cuvette was filled with the fluorometer solution, placed into the machine, and the machine was zeroed. pGEM 3Zf(+) (2 μ l, lot #360851026) was added to 2 ml of
- 25 fluorometer solution and calibrated at 200 units. An additional 2 μ l of pGEM 3Zf(+) DNA was then tested and the reading confirmed at 400 +/- 10 units. Each sample was then read at least in triplicate. When 3 samples were found to be within 10% of each other, their average was taken and this value was used as the quantification value.

- The fluorometrically determined concentration was then used to dilute each sample to 10 ng/ μ l in ddH₂O. This was done simultaneously on all template samples for a single TaqMan™ plate assay, and with enough material
- 30 to run 500-1000 assays. The samples were tested in triplicate with Taqman™ primers and probe both B-actin and GAPDH on a single plate with normal human DNA and no-template controls. The diluted samples were used provided that the CT value of normal human DNA subtracted from test DNA was +/- 1 Ct. The diluted, lot-qualified genomic DNA was stored in 1.0 ml aliquots at -80°C. Aliquots which were subsequently to be used in the gene amplification assay were stored at 4°C. Each 1 ml aliquot is enough for 8-9 plates or 64 tests.

- 35 Gene amplification assay:

The PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 compounds of the invention were screened in the following primary tumors and the resulting ΔC_t values are reported in Table 7A-7C.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7A
ACI values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PR0197	PR0207	PR0226	PR0232	PR0243	PR0256	PR0269	PR0274	PR0304	PR0339	PR01538	PR0779	PR01185	PR01945
HF-000 631	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HF-000 641	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HF-000 643	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HF-000 840	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.39	1.51	0.00	0.00	0.00
HF-000 842	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.24	0.00	0.00	0.00	0.00
EBL100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
MB438g	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T47D	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
MB468	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
MB175	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
MB361	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
BT20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7A Continued
ACI values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1538	PRO779	PRO1185	PRO1245
MCF7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SKBR3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SW460	---	1.85	2.14	---	---	---	---	---	---	---	---	1.87 1.56	---	---
SW620	---	1.96	2.67	---	---	1.23	---	---	---	---	---	1.13 1.38 1.21	---	---
Colo320	---	1.09	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.18	---	---
HIT9	---	---	2.15	---	---	1.58	---	---	---	---	---	1.08 1.90	---	---
HM7	---	---	1.23	---	---	---	---	---	---	---	---	1.33	---	---
WDr	---	---	2.21	---	---	1.35	---	---	---	---	---	1.35	---	---
HCT116	---	1.83	2.13	---	---	1.35	---	---	---	---	---	2.24 1.70	---	---
SKCO1	---	1.13	1.94	---	---	---	---	---	---	---	---	1.11	---	---
SW403	---	---	1.81	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LS174T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Colo205	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HCT15	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7A Continued
 ACI values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1538	PRO779	PRO1185	PRO1245
HCC 2998	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
KM12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A549	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Calu-1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Calu-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
H127	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
H441	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
H460	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SKMES1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SW900	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
H522	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.10
H810	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SRCC 1094	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SRCC 1095	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7A Continued
ACt values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO187	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1538	PRO779	PRO1185	PRO1245
SRCC 1096	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
SRCC 1097	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
SRCC 1098	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
SRCC 1099	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
SRCC 1100	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
SRCC 1101	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
HF-000 545	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
HF-000 499	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
HF-000 539	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
HF-000 575	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
HF-000 698	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7A Continued
ACt values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO187	PRO287	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1538	PRO779	PRO1185	PRO1945
HF-000 756	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 762	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 789	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 795	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.01	---	---	---	---
HF-000 811	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 755	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT2	---	---	1.15	---	---	---	---	---	---	---	---	1.83 2.41 2.28 2.91	1.73	---
CT3	---	1.28	1.26	---	---	---	---	---	---	---	---	1.06 1.14 1.72	---	---
CT8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.01 1.05 1.20	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7A Continued
ACt values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1538	PRO779	PRO1183	PRO1945
CT10	1.33											1.03		
CT12		1.20										1.05		
CT14			1.38		1.14							1.01		
CT15	1.26	1.07										1.14		1.00
CT16												1.12		
CT17												1.05		
CT1	1.10			2.41								1.14		
CT4	1.13	1.11		2.05								1.22		
												1.15		
												1.17		
												1.02		
												1.69		
												1.54		
												1.28		
												1.15		
												1.19		
												1.22		
												1.12		

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7A Continued
ACI values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PKO197	PKO207	PKO226	PKO232	PKO243	PKO256	PKO269	PKO274	PKO304	PKO339	PKO1538	PKO779	PKO1185	PKO1345
CT5	---	1.14	1.12	1.59	1.17	---	---	---	---	---	---	1.62 2.02 2.24 2.32 2.36 1.75	---	---
CT6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT7	---	---	---	1.00	---	---	---	---	---	---	---	1.17 1.00 1.04	---	---
CT9	---	---	---	1.13	---	---	---	---	---	---	---	1.05	---	---
CT11	---	1.32	1.35	1.92	---	---	---	---	---	---	---	1.27 1.73 1.82 1.89 1.93 1.43	---	---
CT18	---	---	---	1.29	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT25	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT28	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT35	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BF-000 611	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7A Continued
ACt values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO187	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO319	PRO1538	PRO779	PRO1185	PRO1245
HF-000 613	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HF-00 1291	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HF-00 1293	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HF-00 1294	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.50	0.00	0.00	0.00	0.00
HF-00 1295	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HF-00 1296	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.88	0.00	0.00	0.00	0.00
HF-00 1297	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HF-00 1299	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.37	0.00	0.00	0.00	0.00
HF-00 1300	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
L17	0.00	0.00	1.12	0.00	0.00	1.04	0.00	0.00	0.00	1.08	0.00	0.00	0.00	0.00
L177	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7A Continued
ACt values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1538	PRO779	PRO1185	PRO1245
LT13	1.40	1.26 1.29	1.10 1.10	---	1.05	---	1.27	---	1.29	1.04	---	1.69 2.79 2.42 1.44	---	3.84
LT1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT3	1.50	1.14	1.59	---	1.08	---	---	---	---	1.17	---	1.65 1.19 1.17	1.01	---
LT4	---	---	1.11	---	---	---	---	1.24	---	---	---	---	---	---
LT9	1.25	---	1.36	---	---	---	1.80	---	---	1.03	---	1.27	---	---
LT12	---	---	---	2.40	1.20	---	1.14	---	1.15	1.26	---	1.03 2.09 1.99 1.20	---	---
LT22	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT30	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.58	---
LT33	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT21	1.10	1.12	1.17	---	---	---	---	---	---	---	---	1.00	---	---
LT1a	---	---	1.39	---	---	---	---	---	---	---	---	1.46 1.04	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7A Continued
ACI values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO187	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1568	PRO779	PRO1185	PRO1245
L7T6	1.39	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.75 1.25	---	---
L7T10	1.03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.50	---	---
L7T11	1.65	1.33 1.59	1.28 1.01	---	1.34	---	1.14	---	1.51	1.39	---	1.77 1.39 1.48	---	---
L7T15	1.22	1.22 1.18	1.04	1.86	2.34 1.72	---	1.36	---	1.34	---	---	2.50 3.73 3.31 1.89	---	1.01
L7T16	---	---	---	---	1.24 1.64	---	---	1.00	1.00	---	---	1.89 1.50 1.38	---	1.98
L7T17	1.68	1.32 1.57	1.26 1.57	1.35	1.27	---	1.42	---	1.68	1.63	---	1.08 1.95 1.51 1.50	---	---
L7T18	---	---	---	1.04	---	---	---	1.61	---	---	---	1.00	---	---
L7T19	---	1.16 1.58	1.08 1.25	1.21	1.39	---	1.60	---	1.15	---	---	3.49 3.21 3.73	---	---
L7T26	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.66	---
L7T28	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7A Continued
ΔCt values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1538	PRO779	PRO1185	PRO1245
LT29	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT31	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
854	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
855	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
856	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
831	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
832	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
550	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
551	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
753	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
716	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7B
ACt values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO2002	PRO2086	PRO284	PRO313	PRO342	PRO773	PRO861	PRO1216
HF-000 631	---	1.97 1.70	---	1.43	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 641	---	1.90 1.87	---	---	1.17 1.03	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 643	---	1.13 1.21	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 840	1.11	3.64 3.55	2.11	2.65	1.82 2.20 1.99	---	---	---	---	1.35	---	---	---
HF-000 842	---	2.56 2.42 2.12 2.88	---	1.73	---	---	---	---	---	1.13	---	---	---
HBL100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MB435	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.20	---	---	---
TM7D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MB468	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MB175	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MB361	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BT20	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MC7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.14	---	---	---
SKBR3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7B Continued
ACI values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO1759	PRO5775	PRO1133	PRO1168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
SW480	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.35	---	---	---
SW620	---	---	---	---	---	---	---	---	1.03	2.09	1.17	---	---	---
Colo320	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.13	---	---	---
HT29	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.31	---	---
											3.08	1.97		
											2.39			
											3.24			
											2.68			
											2.77			
HM7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
WIDE	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
											3.35			2.42
											3.15			
											2.59			
											2.94			
											3.03			
											2.99			
HCT116	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
											2.09			1.71
											2.01			
											2.12			
											1.87			
											1.98			
											2.07			

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7B Continued
ACt values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO1759	PRO5715	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
SECO1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.71 2.00 1.97 1.64 1.82	---	---	---
SW403	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.73 1.15 1.64 1.17 1.51 1.28	---	---	1.14
LS174T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.13	1.41	---	---	1.16
Colo205	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HCT15	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HCC 2998	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
RM12	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A549	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Calu-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.21	---	---	---	---
Calu-6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H127	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H461	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.65	1.15	1.51	1.71	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7b Continued
ACI values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PR01759	PR07775	PR07133	PR07168	PR05725	PR02002	PR02006	PR02064	PR0313	PR0342	PR0542	PR0773	PR0861	PR01216
H460	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SKMES1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SW960	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H322	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.02	---
HB10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SRCC 1094	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SRCC 1095	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SRCC 1096	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SRCC 1097	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SRCC 1098	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SRCC 1099	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SRCC 1100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SRCC 1101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7B Continued
 ΔCt values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PR01739	PR03775	PR07153	PR07168	PR03725	PR0202	PR0206	PR0264	PR0313	PR0342	PR0542	PR0773	PR0861	PR01216
HF-000 545	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 499	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 539	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 775	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 698	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 756	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 762	---	2.01 1.04	---	---	1.26 1.04	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 789	---	1.30 1.12	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 795	1.32	---	1.08	---	1.02 1.28 1.10	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 811	---	1.82 1.80	1.09	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7B Continued
ACt values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO179	PRO3715	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
HP-000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
755	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT2	---	---	---	---	---	---	1.21	---	1.75	3.04	---	---	2.40 2.35	---
CT3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.21	---	---	1.52 1.39	---
CT8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.21	---	---	1.55	---
CT10	---	---	---	---	---	---	1.06	---	---	1.81	1.13	---	1.97 1.33	---
CT12	---	---	---	---	---	---	1.06	---	---	1.41	1.08 1.17	---	1.36 1.18	---
CT14	---	---	---	---	---	---	1.29	---	---	1.61	1.41	---	1.75 1.17	---
CT15	---	---	---	---	---	---	1.32	---	---	1.41	---	1.04	1.75	---
CT16	---	---	---	---	---	---	1.59	---	---	1.39	---	1.37	1.11	---
CT17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.19	---	1.34	1.11	---
CT1	---	---	---	---	---	---	---	---	1.28	1.61	---	---	1.09 1.22	---
CT4	---	---	---	---	---	---	---	---	1.57	1.58	---	---	1.16	---
CT5	---	---	---	---	---	---	1.23	---	2.01	2.29	1.06	---	1.95	1.21
CT6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.20	---	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7B Continued
ACI values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO1759	PRO0775	PRO1133	PRO1168	PRO3725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO342	PRO0773	PRO0861	PRO1216
CT7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.14	---
CT9	---	---	---	---	---	---	---	---	1.56	1.00	1.03	---	1.00	---
CT11	---	---	---	---	---	---	---	---	2.12	2.27	---	---	1.88	---
CT18	---	---	---	---	---	---	1.33	---	---	---	---	---	---	---
CT25	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT28	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT35	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HR-000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
611	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HR-000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
613	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HR-00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1291	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HR-00	---	2.12	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1293	---	2.09	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HR-00	---	2.15	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1294	---	1.99	---	---	---	---	---	---	---	1.57	---	---	---	---
HR-00	---	1.99	---	---	1.10	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1295	---	2.15	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HR-00	---	4.62	1.71	---	1.22	---	---	---	---	3.15	---	---	---	---
1296	---	4.78	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7B Continued
 ΔC_i values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO284	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
HF-00														
1297														
HF-00		1.92												
1299		1.95												
HF-00														
1300														
117					1.50				1.25	1.11				1.15
1727					1.79									
1713					1.64				1.34	1.38	2.98	1.33		
									2.85	2.12				
171														
172					1.29									
					1.15									
173					1.67			1.82	1.89					
					1.66				1.71					
174					1.21			1.43						
179					1.30			1.13	1.19	1.51				
172					1.73				1.03	2.02	1.31	1.18	1.02	
1722									1.74	1.41		1.38		

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7B Continued
 ACI values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO204	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1316
L730	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L733	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L73	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.00	---
L721	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.00	1.19	---	---	---
L771a	---	---	---	---	---	1.26	---	1.28	---	1.72	---	---	1.19	---
L76	---	---	---	---	---	1.24	---	---	---	1.29	---	---	---	---
L76	---	---	---	---	---	1.75	---	1.62	---	2.01	---	---	---	---
L710	---	---	---	---	---	1.34	---	---	---	---	---	---	---	---
L710	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2.02	2.79	---	---	---
L711	---	---	---	---	---	1.31	---	---	---	1.06	---	---	1.03	---
L715	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.08	---	---	---	---
L715	---	---	---	---	---	1.63	---	---	---	1.88	---	---	1.28	---
L716	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2.12	---	---	---	---
L716	---	---	---	---	---	---	---	---	---	3.16	---	---	---	---
L717	---	---	---	---	---	1.30	---	---	---	2.80	---	---	---	---
L717	---	---	---	---	---	1.74	---	1.72	2.48	1.05	1.32	2.19	1.33	---
L718	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.12	1.00	---	---	---
L718	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2.26	1.45	---	---	---
L718	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.77	---	---	---	---
L718	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.21	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7B Continued
 ΔC_i values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRC0759	PRC5775	PRC07133	PRC07168	PRC05725	PRC0202	PRC0206	PRC0264	PRC0313	PRC0342	PRC0542	PRC0773	PRC0861	PRC1216
L719	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.98	1.00	1.00	2.10	3.47	1.35	1.00	1.00	1.00
L726	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	3.02	1.00	1.00	1.00	1.00
L728	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
L729	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
L731	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
HF-000 854	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
HF-000 855	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
HF-000 856	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
HF-000 851	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
HF-000 852	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
HF-000 550	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
HF-000 551	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
HF-000 753	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7B Continued
ACI values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PR01759	PR05775	PR07133	PR07168	PR05723	PR0202	PR0206	PR0284	PR0313	PR0342	PR0542	PR0773	PR0861	PR01216
HF-000 716	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7C
ACI values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9830	PRO539	PRO4316	PRO4980
HF-000631	---	---	---	---	---	---	---
HF-000641	---	---	---	---	---	---	---
HF-000643	---	---	---	---	---	---	---
HF-000640	1.61	---	1.87	---	---	2.34	1.01
HF-000842	1.11	---	---	---	---	---	---
HBL100	---	---	---	---	---	---	---
MB435s	---	---	---	---	---	---	---
T47D	---	---	---	---	---	---	---
MB468	---	---	---	---	---	---	---
MB175	---	---	---	---	---	---	---
MB561	---	---	---	---	---	---	---
BT20	---	---	---	---	---	---	---
MCF7	---	---	---	---	---	---	---
SKBR3	---	---	---	---	---	---	---
SW480	---	---	---	---	---	---	---
SW620	---	---	1.08	---	---	---	---
Colo320	---	1.16	---	---	---	---	---
HT29	---	---	---	---	---	---	---
FM7	---	---	---	---	---	---	---
WILDr	---	---	---	---	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7C Continued
 ACl values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO1686	PRO1880	PRO3562	PRO9830	PRO539	PRO4316	PRO4980
HCT116	---	---	1.26 1.15	---	---	---	---
SKCO1	---	---	---	---	---	---	---
SW403	---	---	---	---	---	---	---
LS174T	---	---	---	---	---	---	---
Cd4205	---	---	---	---	---	---	---
HCT15	---	---	---	---	---	---	---
HCC2998	---	---	---	---	---	---	---
KM12	---	---	---	---	---	---	---
A549	---	---	---	---	---	---	---
Calu-1	---	---	---	---	---	---	---
Calu-6	---	---	---	---	---	---	---
H157	---	---	---	---	---	---	---
H441	---	---	---	---	---	---	---
H460	---	---	---	---	---	---	---
SECMB1	---	---	---	---	---	---	---
SW900	---	---	---	---	---	---	---
H522	---	---	2.93	---	---	---	---
H810	---	---	---	---	---	---	---
SRCC 1094	---	---	---	---	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7C Continued
 ΔCt values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
SRCC 1095	---	---	---	---	---	---	---
SRCC 1096	---	---	---	---	---	---	---
SRCC 1097	---	---	---	---	---	---	---
SRCC 1098	---	---	---	---	---	---	---
SRCC 1099	---	---	---	---	---	---	---
SRCC 1100	---	---	---	---	---	---	---
SRCC 1101	---	---	---	---	---	---	---
HF-000545	---	---	1.05	---	---	---	---
HF-000699	---	---	---	---	---	---	---
HF-000339	---	---	2.10	---	---	---	---
HF-000575	---	---	---	---	---	---	---
HF-000698	---	---	---	---	---	---	---
HF-000756	---	---	---	---	---	---	---
HF-000762	---	---	---	---	---	---	---
HF-000789	---	---	---	---	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7C Continued
ACI values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO5850	PRO539	PRO4316	PRO4980
HF-000795	1.13	---	---	---	---	1.06	---
HF-000811	---	---	---	---	---	---	---
HF-000755	---	---	---	---	---	---	---
CT2	1.48	1.50	---	---	---	---	---
CT3	---	---	---	---	1.17	---	---
CT8	---	---	---	---	---	---	---
CT10	1.32	---	---	1.10	1.16	---	---
CT12	1.20	---	---	---	1.19	---	---
CT14	---	1.62	---	---	---	---	---
CT15	---	1.48	1.01	1.23	1.03	---	---
CT16	---	1.08	---	---	---	---	---
CT17	---	---	---	1.49	---	---	---
CT1	1.50	---	---	1.00	---	---	---
CT4	1.75	---	---	1.25	---	---	---
CT5	2.32	1.10	---	1.49	---	---	---
CT6	1.13	---	---	1.04	---	---	---
CT7	---	---	---	1.15	---	---	---
CT9	---	---	---	---	---	---	---
CT11	2.76	1.20	---	1.35	1.12	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7C Continued
ΔCt values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9830	PRO539	PRO4316	PRO4980
CT18	---	---	---	---	---	---	---
CT25	---	---	---	---	---	---	---
CT28	---	---	---	---	---	---	---
CT35	---	---	---	---	---	---	---
HF-000611	---	---	---	---	---	---	---
HF-000613	---	---	---	---	---	---	---
HF-001291	---	---	---	---	---	---	---
HF-001293	---	---	---	---	---	---	---
HF-001294	1.69	---	---	---	---	---	1.14
HF-001295	---	---	---	---	---	---	---
HF-001296	3.08	---	---	---	---	---	1.87
HF-001297	---	---	---	---	---	---	---
HF-001299	1.11	---	---	---	---	---	1.12
HF-001300	---	---	---	---	---	---	---
L77	---	---	---	---	---	---	---
L727	---	---	---	---	---	---	---
L713	1.42	1.27 2.18 2.22 1.70	3.94 3.57	1.19	1.64 1.08	---	---
L71	---	---	---	---	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7C Continued
ACt values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO1686	PRO1800	PRO1562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO980
L72	---	---	---	---	---	---	---
L73	---	---	---	---	---	---	---
L74	---	---	---	---	---	---	---
L79	---	---	---	---	---	---	---
L712	---	1.34 2.28 2.03	---	1.32	1.25	---	---
L722	---	---	---	---	---	---	---
L730	---	---	---	---	---	---	---
L733	---	---	---	---	---	---	---
L78	---	---	---	---	---	---	---
L721	---	1.30	---	---	1.32	---	---
L716	---	---	---	---	---	---	---
L710	---	---	---	---	---	---	---
L711	1.12	1.03 1.65 1.59	---	1.35	---	---	---
L715	1.67	1.70 2.23 1.99	---	1.61	1.78 1.10	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Table 7C Continued
 ACT values in lung and colon primary tumor and cell line models

Primary Tumor	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO319	PRO4316	PRO4980
LT16	---	1.00 1.05 1.09	2.64 2.25	---	---	---	---
LT17	1.59	1.94 1.63	---	---	1.94 1.01	---	---
LT18	1.07	1.12	---	---	---	---	---
LT19	---	2.51 2.18	---	---	1.16	---	---
LT26	---	---	---	---	---	---	---
LT28	---	---	---	---	---	---	---
LT29	---	---	---	---	---	---	---
LT31	---	---	---	---	---	---	---
HF-000854	---	---	---	---	---	---	---
HF-000855	---	---	---	---	---	---	---
HF-000856	---	---	---	---	---	---	---
HF-000831	---	---	---	---	---	---	---
HF-000832	---	---	---	---	---	---	---
HF-000590	---	---	---	---	---	---	---
HF-000551	---	---	---	---	---	---	---
HF-000739	---	---	2.05	---	---	---	---
HF-000716	---	---	1.83	---	---	---	---

WO 01/53486

PCT/US00/03565

DISCUSSION AND CONCLUSION:

PRO197 (DNA22780-1078):

The ΔC_t values for DNA22780-1078 in a variety of tumors are reported in Table 7A. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7A indicates that significant amplification of nucleic acid DNA22780-1078 encoding PRO197 occurred in primary lung tumors: LT13, LT3, LT9, LT21, LT6, LT10, LT11, LT15, and LT17.

Because amplification of DNA22780-1078 occurs in various lung tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA22780-1078 (PRO197) would be expected to have utility in cancer therapy.

10 PRO207 (DNA30879-1152):

The ΔC_t values for DNA30879-1152 in a variety of tumors are reported in Table 7A. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7A indicates that significant amplification of nucleic acid DNA30879-1152 encoding PRO207 occurred: (1) in primary lung tumors: LT13, LT3, LT21, LT11, LT15, LT17, and LT19; (2) in primary colon tumors: CT3, CT10,

15 CT15, CT1, CT4, CT5, and CT11; and (3) in colon tumor cell lines: SW480, SW620, Colo320, HCT116, and SKCO1.

Because amplification of DNA30879-1152 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA30879-1152 (PRO207) would be expected to have utility in cancer therapy.

20 PRO226 (DNA33460-1166):

The ΔC_t values for DNA33460-1166 in a variety of tumors are reported in Table 7A. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7A indicates that significant amplification of nucleic acid DNA33460-1166 encoding PRO226 occurred: (1) in primary lung tumors: LT7, LT13, LT3, LT4, LT9, LT21, LT1a, LT11, LT15, LT17, and LT19; (2) in primary colon tumors: CT2, CT3, CT12, CT14, CT15, CT4, CT5, and CT11; and (3) in colon tumor cell lines: SW480, SW620,

25 HT29, HM7, WiDr, HCT116, SKCO1, and SW403.

Because amplification of DNA33460-1166 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA33460-1166 (PRO226) would be expected to have utility in cancer therapy.

30 PRO232 (DNA34435-1140):

The ΔC_t values for DNA34435-1140 in a variety of tumors are reported in Table 7A. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7A indicates that significant amplification of nucleic acid DNA34435-1140 encoding PRO232 occurred: (1) in primary lung tumors: LT12, LT15, LT17, LT18, and LT19; and (2) in primary colon tumors: CT1, CT4, CT5, CT7,

35 CT9, CT11 and CT18.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Because amplification of DNA34435-1140 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA34435-1140 (PRO232) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO243 (DNA35917-1207):

5 The ΔC_t values for DNA35917-1207 in a variety of tumors are reported in Table 7A. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7A indicates that significant amplification of nucleic acid DNA35917-1207 encoding PRO243 occurred: (1) in primary lung tumors: LT13, LT3, LT12, LT11, LT15, LT16, LT17, and LT19; and (2) in primary colon tumors: CT14 and CT5.

10 Because amplification of DNA35917-1207 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA35917-1207 (PRO243) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO256 (DNA35880-1160):

15 The ΔC_t values for DNA35880-1160 in a variety of tumors are reported in Table 7A. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7A indicates that significant amplification of nucleic acid DNA35880-1160 encoding PRO256 occurred in colon tumor cell lines: SW620, HT29, WiDr, and HCT116.

20 Because amplification of DNA35880-1160 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA35880-1160 (PRO256) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO269 (DNA38260-1180):

25 The ΔC_t values for DNA38260-1180 in a variety of tumors are reported in Table 7A. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7A indicates that significant amplification of nucleic acid DNA38260-1180 encoding PRO269 occurred in primary lung tumors: LT7, LT13, LT9, LT12, LT11, LT15, LT17, and LT19.

Because amplification of DNA38260-1180 occurs in various lung tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA38260-1180 (PRO269) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO274 (DNA39987-1184):

30 The ΔC_t values for DNA39987-1184 in a variety of tumors are reported in Table 7A. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7A indicates that significant amplification of nucleic acid DNA39987-1184 encoding PRO274 occurred in primary lung tumors: LT4, LT16, and LT18.

Because amplification of DNA39987-1184 occurs in various lung tumors, it is highly probable to play a

WO 01/53486

PCT/US00/03565

significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA39987-1184 (PRO274) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO304(DNA39520-1217):

5 The ΔC_t values for DNA39520-1217 in a variety of tumors are reported in Table 7A. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7A indicates that significant amplification of nucleic acid DNA39520-1217 encoding PRO304 occurred in primary lung tumors: LT13, LT12, LT11, LT15, LT16, LT17 and LT19.

10 Because amplification of DNA39520-1217 occurs in various lung tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA39520-1217 (PRO304) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO339 (DNA43466-1225):

15 The ΔC_t values for DNA43466-1225 in a variety of tumors are reported in Table 7A. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7A indicates that significant amplification of nucleic acid DNA43466-1225 encoding PRO339 occurred in primary lung tumors: LT7, LT13, LT3, LT9, LT12, LT11, and LT17.

Because amplification of DNA43466-1225 occurs in various lung tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA43466-1225 (PRO339) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO1558 (DNA71282-1668):

20 The ΔC_t values for DNA71282-1668 in a variety of tumors are reported in Table 7A. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7A indicates that significant amplification of nucleic acid DNA71282-1668 encoding PRO1558 occurred: (1) in primary lung tumors: HF-000840, HF-000842, HF-001294, HF-001296 and HF-001299; and (2) in colon tumor center HF-000795.

25 Because amplification of DNA71282-1668 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA71282-1668 (PRO1558) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO779 (DNA58801-1052):

30 The ΔC_t values for DNA58801-1052 in a variety of tumors are reported in Table 7A. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7A indicates that significant amplification of nucleic acid DNA58801-1052 encoding PRO779 occurred: (1) in primary lung tumors: LT13, LT3, LT9, LT12, LT21, LT1-a, LT6, LT10, LT11, LT15, LT16, LT17, LT18, LT19, and HF-000840; (2) in primary colon tumors: CT2, CT3, CT8, CT10, CT12, CT14, CT15, CT16, CT17, CT1, CT4, CT5, CT6, CT7, CT9, and CT11; and (3) in colon tumor cell lines: SW480, SW620, Colo320, HT29, HM7, WiDr,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

HCT116, SKCO1, and LS174T.

Because amplification of DNA58801-1052 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA58801-1052 (PRO779) would be expected to have utility in cancer therapy.

5 PRO1185 (DNA62881-1515):

The ΔC_t values for DNA62881-1515 in a variety of tumors are reported in Table 7A. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7A indicates that significant amplification of nucleic acid DNA62881-1515 encoding PRO1185 occurred: (1) in primary lung tumors: LT3, LT30 and LT26; and (2) in primary colon tumor CT2.

- 10 Because amplification of DNA62881-1515 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA62881-1515 (PRO1185) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO1245 (DNA64884-1527):

- 15 The ΔC_t values for DNA64884-1527 in a variety of tumors are reported in Table 7A. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7A indicates that significant amplification of nucleic acid DNA64884-1527 encoding PRO1245 occurred: (1) in primary lung tumors: LT13, LT15 and LT16; (2) in lung tumor cell line H522; and (3) in primary colon tumor CT15.

- 20 Because amplification of DNA64884-1527 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA64884-1527 (PRO1245) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO1759 (DNA76531-1701):

- 25 The ΔC_t values for DNA76531-1701 in a variety of tumors are reported in Table 7B. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7B indicates that significant amplification of nucleic acid DNA76531-1701 encoding PRO1759 occurred: (1) in primary lung tumors: HF-000840 and HF-001296; and (2) in primary colon tumor center HF-000795.

Because amplification of DNA76531-1701 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA76531-1701 (PRO1759) would be expected to have utility in cancer therapy.

30 PRO5775 (DNA96869-2673):

The ΔC_t values for DNA96869-2673 in a variety of tumors are reported in Table 7B. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7B indicates that significant amplification of nucleic acid DNA96869-2673 encoding PRO5775 occurred: (1) in primary lung tumors: HF-000631, HF-000641, HF-000643, HF-000840, HF-000842, HF-001293, HF-001294, HF-

WO 01/53486

PCT/US00/03565

001295, HF-001296 and HF-001299; and (2) in primary colon tumor centers: HF-000762, HF-000789, and HF-000811.

- Because amplification of DNA96869-2673 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA96869-2673 (PRO5775) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO7133 (DNA128451-2739):

- The ΔC_t values for DNA128451-2739 in a variety of tumors are reported in Table 7B. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7B indicates that significant amplification of nucleic acid DNA128451-2739 encoding PRO7133 occurred: (1) in primary lung tumors: HF-000840 and HF-001296; and (2) in primary colon tumor centers: HF-000795 and HF-000811.

Because amplification of DNA128451-2739 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA128451-2739 (PRO7133) would be expected to have utility in cancer therapy.

15 PRO7168 (DNA102846-2742):

The ΔC_t values for DNA102846-2742 in a variety of tumors are reported in Table 7B. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7B indicates that significant amplification of nucleic acid DNA102846-2742 encoding PRO7168 occurred in primary lung tumors: HF-000631, HF-000840 and HF-000842.

- 20 Because amplification of DNA102846-2742 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA102846-2742 (PRO7168) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO5725 (DNA92265-2669):

- 25 The ΔC_t values for DNA92265-2669 in a variety of tumors are reported in Table 7B. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7B indicates that significant amplification of nucleic acid DNA92265-2669 encoding PRO5725 occurred: (1) in primary lung tumors: HF-000641, HF-000840, HF-001295, and HF-001296; and (2) in primary colon tumor centers: HF-000762 and HF-000795.

- 30 Because amplification of DNA92265-2669 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA92265-2669 (PRO5725) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO202 (DNA30869):

The ΔC_t values for DNA30869 in a variety of tumors are reported in Table 7B. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7B indicates

WO 01/53486

PCT/US00/03565

that significant amplification of nucleic acid DNA30869 encoding PRO202 occurred in primary lung tumors: LT7, LT13, LT1, LT3, LT4, LT9, LT12, LT1a, LT6, LT11, LT15, LT16, LT17, and LT19.

Because amplification of DNA30869 occurs in various lung tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA30869 (PRO202) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO206 (DNA34405):

The ΔCt values for DNA34405 in a variety of tumors are reported in Table 7B. A ΔCt of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7B indicates that significant amplification of nucleic acid DNA34405 encoding PRO206 occurred in primary colon tumors:

CT2, CT10, CT12, CT14, CT15, CT16, CT5, and CT18.

Because amplification of DNA34405 occurs in various colon tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA34405 (PRO206) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO264 (DNA36995):

The ΔCt values for DNA36995 in a variety of tumors are reported in Table 7B. A ΔCt of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7B indicates that significant amplification of nucleic acid DNA36995 encoding PRO264 occurred in primary lung tumors: LT3, LT4, LT9, LT1a, LT6, and LT17.

Because amplification of DNA36995 occurs in various colon tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA36995 (PRO264) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO313 (DNA43320):

The ΔCt values for DNA43320 in a variety of tumors are reported in Table 7B. A ΔCt of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7B indicates that significant amplification of nucleic acid DNA43320 encoding PRO313 occurred: (1) in primary lung tumors: LT9, LT12, LT16, and LT19; (2) in primary colon tumors: CT2, CT1, CT4, CT5, CT9, and CT11; and (3) in colon tumor cell line SW620.

Because amplification of DNA43320 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA43320 (PRO313) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO342 (DNA38649):

The ΔCt values for DNA38649 in a variety of tumors are reported in Table 7B. A ΔCt of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7B indicates that significant amplification of nucleic acid DNA38649 encoding PRO342 occurred: (1) in primary lung tumors:

WO 01/53486

PCT/US00/03565

LT7, LT13, LT3, LT9, LT12, LT21, LT1a, LT6, LT10, LT11, LT15, LT16, LT17, LT19, HF-000840, HF-000842, HF-001294, and HF-001296; (2) in primary colon tumors: CT2, CT3, CT8, CT10, CT12, CT14, CT15, CT16, CT17, CT1, CT4, CT5, CT6, CT9, and CT11; (3) in lung tumor cell lines: Calu-1 and H441; and (4) in colon tumor cell lines: SW620 and LS174T.

- 5 Because amplification of DNA38649 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA38649 (PRO342) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO542 (DNA56505):

- 10 The ΔC_t values for DNA56505 in a variety of tumors are reported in Table 7B. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7B indicates that significant amplification of nucleic acid DNA56505 encoding PRO542 occurred: (1) in primary lung tumors: LT7, LT13, LT12, LT21, LT10, LT16, LT17, LT18, and LT19; (2) in primary colon tumors: CT10, CT12, CT14, CT5, and CT9; (3) in lung tumor cell line H441; (4) in colon tumor cell lines: SW480, SW620, HT29, WiDr, HCT116, SKCO1, SW403, and LS174T; and (5) in breast tumor cell lines: HBL100 and MCF7.

- 15 Because amplification of DNA56505 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA56505 (PRO542) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO773 (DNA48303):

- 20 The ΔC_t values for DNA48303 in a variety of tumors are reported in Table 7B. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7B indicates that significant amplification of nucleic acid DNA48303 encoding PRO773 occurred: (1) in primary lung tumors: LT13 and LT16; (2) in primary colon tumors: CT15, CT16 and CT17; (3) in colon tumor cell lines: Colo320, HT29, and Colo205; and (4) in lung tumor cell line H441.

- 25 Because amplification of DNA48303 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA48303 (PRO773) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO861 (DNA50798):

- 30 The ΔC_t values for DNA50798 in a variety of tumors are reported in Table 7B. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7B indicates that significant amplification of nucleic acid DNA50798 encoding PRO861 occurred: (1) in primary lung tumors: LT13, LT12, LT8, LT1a, LT11, LT15 and LT16; (2) in primary colon tumors: CT2, CT3, CT8, CT10, CT12, CT14, CT15, CT16, CT17, CT1, CT4, CT5, CT7, CT9, and CT11; and (3) in lung tumor cell lines: H441 and H522.

- 35 Because amplification of DNA50798 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA50798 (PRO861) would be expected to have utility in cancer therapy.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO1216 (DNA66489):

The ΔC_t values for DNA66489 in a variety of tumors are reported in Table 7B. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7B indicates that significant amplification of nucleic acid DNA66489 encoding PRO1216 occurred: (1) in primary lung tumors: LT7, and LT12; (2) in primary colon tumors: CT12 and CT5; and (3) in colon tumor cell lines: WiDr, HCT116, SW403, and LS174T.

Because amplification of DNA66489 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA66489 (PRO1216) would be expected to have utility in cancer therapy.

10 PRO1686 (DNA80896):

The ΔC_t values for DNA80896 in a variety of tumors are reported in Table 7C. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7C indicates that significant amplification of nucleic acid DNA80896 encoding PRO1686 occurred: (1) in primary lung tumors: LT13, LT11, LT15, LT17, LT18, HF-000840, HF-000842, HF-001294, HF-001296, and HF-001299; (2) in primary colon tumors: CT2, CT10, CT12, CT1, CT4, CT5, CT6, and CT11; and (3) colon tumor center HF-000795.

Because amplification of DNA80896 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA80896 (PRO1686) would be expected to have utility in cancer therapy.

20 PRO1800 (DNA35672-2508):

The ΔC_t values for DNA35672-2508 in a variety of tumors are reported in Table 7C. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7C indicates that significant amplification of nucleic acid DNA35672-2508 encoding PRO1800 occurred: (1) in primary lung tumors: LT13, LT12, LT21, LT11, LT15, LT16, LT17, LT18, and LT19; (2) in primary colon tumors: CT2, CT14, CT15, CT5, and CT11; and (3) in colon tumor cell line Colo320.

25 Because amplification of DNA35672-2508 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (*e.g.*, antibodies) directed against the protein encoded by DNA35672-2508 (PRO1800) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO3562 (DNA96791):

30 The ΔC_t values for DNA96791 in a variety of tumors are reported in Table 7C. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7C indicates that significant amplification of nucleic acid DNA96791 encoding PRO3562 occurred: (1) in primary lung tumors: LT13, LT16, and HF-000840; (2) in primary colon tumor CT15; (3) in colon tumor center HF-000539; (4) in lung tumor cell line H522; (5) in colon tumor cell lines: SW620 and HCT116; (6) in breast tumor HF-000545; and (7) in testes tumors: HF-000733 and HF-000716.

35 Because amplification of DNA96791 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant

WO 01/53486

PCT/US00/03565

role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA96791 (PRO3562) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO9850 (DNA58725):

5 The ΔC_t values for DNA58725 in a variety of tumors are reported in Table 7C. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7C indicates that significant amplification of nucleic acid DNA58725 encoding PRO9850 occurred: (1) in primary lung tumors: LT13, LT12, LT11, and LT15; and (2) in primary colon tumors: CT10, CT15, CT16, CT1, CT4, CT5, CT6, CT7, and CT11.

10 Because amplification of DNA58725 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA58725 (PRO9850) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO539 (DNA47465-1561):

15 The ΔC_t values for DNA47465-1561 in a variety of tumors are reported in Table 7C. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7C indicates that significant amplification of nucleic acid DNA47465-1561 encoding PRO539 occurred: (1) in primary lung tumors: LT13, LT12, LT21, LT15, LT17, and LT19; and (2) in primary colon tumors: CT3, CT10, CT12, CT15, and CT11.

20 Because amplification of DNA47465-1561 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA47465-1561 (PRO539) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO4316 (DNA94713-2561):

25 The ΔC_t values for DNA94713-2561 in a variety of tumors are reported in Table 7C. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7C indicates that significant amplification of nucleic acid DNA94713-2561 encoding PRO4316 occurred: (1) in primary lung tumor HF-000840; and (2) in primary colon tumor center HF-000795.

Because amplification of DNA94713-2561 occurs in various tumors, it is highly probable to play a significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA94713-2561 (PRO4316) would be expected to have utility in cancer therapy.

PRO4980 (DNA97003-2649):

30 The ΔC_t values for DNA97003-2649 in a variety of tumors are reported in Table 7C. A ΔC_t of >1 was typically used as the threshold value for amplification scoring, as this represents a doubling of gene copy. Table 7C indicates that significant amplification of nucleic acid DNA97003-2649 encoding PRO4980 occurred in primary lung tumors: HF-000840, HF-001294, HF-001296 and HF-001299.

Because amplification of DNA97003-2649 occurs in various lung tumors, it is highly probable to play a

WO 01/53486

PCT/US00/03565

significant role in tumor formation or growth. As a result, antagonists (e.g., antibodies) directed against the protein encoded by DNA97003-2649 (PRO4980) would be expected to have utility in cancer therapy.

EXAMPLE 27

In situ Hybridization

5 *In situ* hybridization is a powerful and versatile technique for the detection and localization of nucleic acid sequences within cell or tissue preparations. It may be useful, for example, to identify sites of gene expression, analyze the tissue distribution of transcription, identify and localize viral infection, follow changes in specific mRNA synthesis, and aid in chromosome mapping.

In situ hybridization was performed following an optimized version of the protocol by Lu and Gillett, *Cell Vision*, 1: 169-176 (1994), using PCR-generated ³²P-labeled riboprobes. Briefly, formalin-fixed, paraffin-embedded human tissues were sectioned, deparaffinized, deproteinized in proteinase K (20 g/ml) for 15 minutes at 37°C, and further processed for *in situ* hybridization as described by Lu and Gillett, *supra*. A (³²P)UTP-labeled antisense riboprobe was generated from a PCR product and hybridized at 55°C overnight. The slides were dipped in Kodak NTB2™ nuclear track emulsion and exposed for 4 weeks.

³²P-Riboprobe synthesis

6.0 μl (125 mCi) of ³²P-UTP (Amersham BF 1002, SA<2000 Ci/nmol) were speed-vacuum dried. To each tube containing dried ³²P-UTP, the following ingredients were added:

2.0 μl 5x transcription buffer

1.0 μl DTT (100 mM)

20 2.0 μl NTP mix (2.5 mM: 10 μl each of 10 mM GTP, CTP & ATP + 10 μl H₂O)

1.0 μl UTP (50 μM)

1.0 μl RNAsin

1.0 μl DNA template (1 μg)

1.0 μl H₂O

25 1.0 μl RNA polymerase (for PCR products T3 = AS, T7 = S, usually)

The tubes were incubated at 37°C for one hour. A total of 1.0 μl RQ1 DNase was added, followed by incubation at 37°C for 15 minutes. A total of 90 μl TE (10 mM Tris pH 7.6/1 mM EDTA pH 8.0) was added, and the mixture was pipetted onto DE81 paper. The remaining solution was loaded in a MICROCON-50™ ultrafiltration unit, and spun using program 10 (6 minutes). The filtration unit was inverted over a second tube and spun using program 2 (3 minutes). After the final recovery spin, a total of 100 μl TE was added, then 1 μl of the final product was pipetted on DE81 paper and counted in 6 ml of BIOFLUOR II™.

30 The probe was run on a TBE/urea gel. A total of 1-3 μl of the probe or 5 μl of RNA Mrk III was added to 3 μl of loading buffer. After heating on a 95°C heat block for three minutes, the gel was immediately placed on ice. The wells of gel were flushed, and the sample was loaded and run at 180-250 volts for 45 minutes. The gel was wrapped in plastic wrap (SARAN™ brand) and exposed to XAR film with an intensifying screen in a -70°C freezer one hour to overnight.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

³²P-HybridizationA. *Pretreatment of frozen sections*

The slides were removed from the freezer, placed on aluminum trays, and thawed at room temperature for 5 minutes. The trays were placed in a 55°C incubator for five minutes to reduce condensation. The slides were fixed for 10 minutes in 4% paraformaldehyde on ice in the fume hood, and washed in 0.5 x SSC for 5 minutes, at room temperature (25 ml 20 x SSC + 975 ml SQ H₂O). After deproteinization in 0.5 µg/ml proteinase K for 10 minutes at 37°C (12.5 µl of 10 mg/ml stock in 250 ml prewarmed RNase-free RNase buffer), the sections were washed in 0.5 x SSC for 10 minutes at room temperature. The sections were dehydrated in 70%, 95%, and 100% ethanol, 2 minutes each.

B. *Pretreatment of paraffin-embedded sections*

The slides were deparaffinized, placed in SQ H₂O, and rinsed twice in 2 x SSC at room temperature, for 5 minutes each time. The sections were deproteinized in 20 µg/ml proteinase K (500 µl of 10 mg/ml in 250 ml RNase-free RNase buffer; 37°C, 15 minutes) for human embryo tissue, or 8 x proteinase K (100 µl in 250 ml RNase buffer, 37°C, 30 minutes) for formalin tissues. Subsequent rinsing in 0.5 x SSC and dehydration were performed as described above.

C. *Prehybridization*

The slides were laid out in a plastic box lined with Box buffer (4 x SSC, 50% formamide) - saturated filter paper. The tissue was covered with 50 µl of hybridization buffer (3.75 g dextran sulfate + 6 ml SQ H₂O), vortexed, and heated in the microwave for 2 minutes with the cap loosened. After cooling on ice, 18.75 ml formamide, 3.75 ml 20 x SSC, and 9 ml SQ H₂O were added, and the tissue was vortexed well and incubated at 42°C for 1-4 hours.

D. *Hybridization*

1.0 x 10⁶ cpm probe and 1.0 µl tRNA (50 mg/ml stock) per slide were heated at 95°C for 3 minutes. The slides were cooled on ice, and 48 µl hybridization buffer was added per slide. After vortexing, 50 µl ³²P mix was added to 50 µl prehybridization on the slide. The slides were incubated overnight at 55°C.

E. *Washes*

Washing was done for 2x10 minutes with 2xSSC, EDTA at room temperature (400 ml 20 x SSC + 16 ml 0.25 M EDTA, V_{total}=4L), followed by RNaseA treatment at 37°C for 30 minutes (500 µl of 10 mg/ml in 250 ml RNase buffer = 20 µg/ml). The slides were washed 2 x 10 minutes with 2 x SSC, EDTA at room temperature. The stringency wash conditions were as follows: 2 hours at 55°C, 0.1 x SSC, EDTA (20 ml 20 x SSC + 16 ml EDTA, V_{total}=4L).

F. *Oligonucleotides*

In situ analysis was performed on six of the DNA sequences disclosed herein. The oligonucleotides employed for these analyses are as follows:

(1) PRO197 (DNA22780-1078):

DNA22780.p1:

5'-GAA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CGC CAC CGT GCT ACT GA-3' (SEQ ID NO:247)

WO 01/53486

PCT/US00/03565

DNA22780.p2:

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TGC AGG CGG CTG ACA TTG TGA-3' (SEQ ID NO:248)

(2) PRO207 (DNA30879-1152):

5 DNA30879.p1:

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TCC TGC GCC TTT CCT GAA CC-3' (SEQ ID NO:249)

DNA30879.p2:

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GAC CCA TCC TTG CCC ACA GAG-3' (SEQ ID NO:250)

(3) PRO226 (DNA33460-1166):

10 DNA33460.p1:

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CAG CAC TGC CGG GAT GTC AAC-3' (SEQ ID NO:251)

DNA33460.p2:

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GTT TGG GCC TCG GAG CAG TG-3' (SEQ ID NO:252)

(4) PRO232 (DNA34435-1140):

15 DNA34435.p1:

5'-GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC ACC CAC GCG TCC GGC TGC TT-3' (SEQ ID NO:253)

DNA34435.p2:

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CGG GGG ACA CCA CGG ACC AGA-3' (SEQ ID NO:254)

(5) PRO243 (DNA35917-1207):

20 DNA35917.p1:

5'-GGATTCTAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AAG GAG CCG GGA CCC AGG AGA-3' (SEQ ID NO:255)

DNA35917.p2:

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GGG GGC CCTTGG TGC TGA GT-3' (SEQ ID NO:256)

(6) PRO342 (DNA38649):

25 DNA38649.p1:

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GGG GCC TTC ACC TGC TCC ATC-3' (SEQ ID NO:257)

DNA38649.p2:

5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GCT GCG TCT GGG GGT CTC CTT-3' (SEQ ID NO:258)

G. *Results*30 (1) PRO197 (DNA22780-1078) (NL2):

A moderate to intense signal was seen over benign but reactive stromal cells in inflamed appendix. These cells typically have large nuclei with prominent nucleoli. An intense signal was present over a small subset (<5%) of tumor cells in mammary ductal adenocarcinoma, and in peritumoral stromal cells. The histological appearance

WO 01/53486

PCT/US00/03565

of the positive cells was not notably different than the adjacent negative cells. A very focal positive signal was found over tumor and/or stromal cells in renal cell carcinoma adjacent to necrotic tissue. No signal was seen in pulmonary adenocarcinoma.

(2) PRO207 (DNA30879-1152) (Apo 2L homolog):

- 5 Low level expression was observed over a chondrosarcoma, and over one other soft-tissue sarcoma. All other tissues were negative.

Human fetal tissues examined (E12-E16 weeks) included: placenta, umbilical cord, liver, kidney, adrenals, thyroid, lungs, heart, great vessels, oesophagus, stomach, small intestine, spleen, thymus, pancreas, brain, eye, spinal cord, body wall, pelvis and lower limb.

- 10 Adult human tissues examined included: kidney (normal and end-stage), adrenals, myocardium, spleen, lymph node, pancreas, lung, skin, eye (including retina), bladder, and liver (normal, cirrhotic, and acute failure).

Non-human primate tissues examined included:

Chimp tissues: salivary gland, stomach, thyroid, parathyroid, tongue, thymus, ovary, and lymph node.

Rhesus monkey tissues: cerebral cortex, hippocampus, cerebellum, and penis.

- 15 (3) PRO226 (DNA33460-1166) (EGF homolog):

A specific signal was observed over cells in loose connective tissue immediately adjacent to developing extra ocular muscle in the fetal eye. Moderate expression was also seen over soft-tissue sarcoma.

(4) PRO232 (DNA34435-1140) (stem cell antigen homolog):

Expression pattern in human and fetal tissues

- 20 Strong expression was seen in prostatic epithelium and bladder epithelium, with lower level of expression in bronchial epithelium. Low level expression was seen in a number of sites, including among others, bone, blood, chondrosarcoma, adult heart and fetal liver. All other tissues were negative.

Expression in urothelium of the ureter of renal pelvis, and urethra of rhesus penis

- 25 Expression was observed in the epithelium of the prostate, the superficial layers of the urethelium of the urinary bladder, the urethelium lining the renal pelvis, and the urethelium of the ureter (in one out of two experiments). The urethra of a rhesus monkey was negative; it was unclear whether this represents a true lack of expression by the urethra, or if it is the result of a failure of the probe to cross react with rhesus tissue. The findings in the prostate and the bladder were similar to those previously described using an isotopic detection technique. Expression of the mRNA for this antigen was not prostate epithelial specific. The antigen may serve as a useful
30 marker for urethelial derived tissues. Expression in the superficial, post-mitotic cells of the urinary tract epithelium also suggests that it is unlikely to represent a specific stem cell marker, as this would be expected to be expressed specifically in basal epithelium.

PSCA in prostate and bladder carcinoma

- 35 Six samples of prostate and bladder cancer of various grades, one sample each of normal renal pelvis, ureter, bladder, prostate (including seminal vesicle) and penile ureter, and pellets of LNCaP and PC3 prostate cancer

WO 01/53486

PCT/US00/03565

cell lines were analyzed: each sample was hybridized with sense and anti-sense probes for PSCA, and with anti-sense probe only for beta-actin (mRNA integrity control).

Normal transitional epithelium of the renal pelvis, ureter, and bladder, and stratified columnar epithelium of penile urethra were all positive for PSCA; of these, the superficial (umbrella) cells of the bladder and renal pelvis were most intensely positive. Normal prostatic glandular epithelium was variably positive for PSCA; moderately to strong positive glands occurred in close proximity to negative glands within the same tissue section. All positive epithelia (bladder and prostate) showed more intense expression in the transitional or prostatic epithelium. Seminal vesicle epithelium and all other tissues (neural, vascular, fibrous stroma, renal parenchyma) do not express PSCA.

Prostatic tumor cells are generally PSCA-negative; no detectable expression was noted in LNCaP and PC3 cells and in three of six tissue samples; moderately to weakly positive cells occurred only in three of six prostate tumor samples. PSCA-negative prostate tumor samples showed beta-actin expression consistent with adequate mRNA preservation.

Papillary transitional carcinoma cells (five of six cases) were moderately or strongly positive for PSCA. One of six tumors (a case of invasive poorly differentiated TCC) showed only focally positive cells.

PSCA and PSA expression in additional prostate and bladder carcinoma specimens

Thirteen samples of prostate cancer (all moderately to poorly differentiated adenocarcinoma), one sample of prostate without tumor, and bladder transitional cell carcinoma of various grades (eight well-differentiated, three moderately differentiated, two poorly differentiated) were hybridized with sense and anti-sense probes for PSCA and with anti-sense probe only for beta-actin (mRNA integrity control). As an additional control, the fourteen prostate cases were hybridized with an anti-sense probe to PSA, as were the six sections of prostate CA from the previous study.

One case of prostate cancer (#127) showed uniform high expression of PSCA. Two cases of prostate CA (#399, #403) showed only focal high levels of PSCA expression, and one case (#124) showed focal moderate expression, all with marked gland-to-gland variability. Most areas of these three cases, and all areas of the other nine cases showed uniformly weak or absent PSCA expression. The low PSCA signals were not due to mRNA degradation: all cases of prostate CA negative for PSCA were positive for PSA and/or beta-actin.

All eleven well- or moderately well-differentiated transitional carcinomas of the bladder were uniformly moderately or strongly positive for PSCA. Two tumors, both poorly differentiated TCC, were negative or only weakly positive.

These results confirm the previously described studies. In these two studies, nineteen prostate CA cases were examined: one of nineteen showed uniformly high expression; six of nineteen showed focal high expression in a minority of tumor cells; twelve of nineteen were negative or only weakly positive. In contrast, these two studies included nineteen bladder TCC cases, the majority of which were uniformly moderately or strongly PSCA-positive. All sixteen well- or moderately well-differentiated TCC cases were positive; three poorly differentiated cases were negative or only weakly positive.

(5) PRO243 (DNA35917-1207) (Chordin homolog):

Paint expression was observed at the cleavage line in the developing synovial joint forming between the

WO 01/53486

PCT/US00/03565

femoral head and acetabulum (hip joint). If this pattern of expression were observed at sites of joint formation elsewhere, it might explain the facial and limb abnormalities observed in the Cornelia de Lange syndrome.

Additional sections of human fetal face, head, limbs and mouse embryos were also examined. No expression was seen in any of the mouse tissues. Expression was only seen with the anti-sense probe.

- 5 Expression was observed adjacent to developing limb and facial bones in the periosteal mesenchyme. The expression was highly specific and was often adjacent to areas undergoing vascularization. The distribution is consistent with the observed skeletal abnormalities in the Cornelia de Lange syndrome. Expression was also observed in the developing temporal and occipital lobes of the fetal brain, but was not observed elsewhere. In addition, expression was seen in the ganglia of the developing inner ear.

10 (6) PRO342 (DNA38649)(IL-1 receptor homolog):

This DNA was expressed in many tissues and in many cell types. In the fetus, expression was seen in the inner aspect of the retina, in dorsal root ganglia, in small intestinal epithelium, thymic medulla and spleen. In the adult, expression was seen in epithelium of renal tubules, hepatocytes in the liver and urinary bladder. Expression was also present in infiltrating inflammatory cells and in an osteosarcoma. In chim, expression was seen on gastric

- 15 epithelium, salivary gland and thymus. None of the other tissues examined showed evidence of specific expression.

Fetal tissues examined (E12-E16 weeks) included: liver, kidney, adrenals, lungs, heart, great vessels, oesophagus, stomach, spleen, gonad, spinal cord and body wall. Adult human tissues examined included: liver, kidney, stomach, bladder, prostate, lung, renal cell carcinoma, osteosarcoma, hepatitis and hepatic cirrhosis. Chimp tissues examined included: thyroid, nerve, tongue, thymus, adrenal gastric mucosa and salivary gland. Rhesus

- 20 tissues examined included Rhesus brain.

In addition, eight squamous and eight adenocarcinomas of the lung were examined. Expression was observed in all tumors, although the level of expression was variable. Based on signal intensity, tumors were divided into high and low expressers. Three of the tumors (two adenocarcinomas: 96-20125 and 96-3686, and one squamous carcinoma: 95-6727) were categorized as high expressers. Moderate expression was also seen in normal

- 25 benign bronchial epithelium and in lymphoid infiltrates, a finding consistent with previous observations that this receptor is widely expressed in most specimens.

EXAMPLE 28

Use of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202,

- 30 PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800,

PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 as a hybridization probe

The following method describes use of a nucleotide sequence encoding a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542,

- 35 PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide as a hybridization probe.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

- DNA comprising the coding sequence of a full-length or mature "PRO197", "PRO207", "PRO226", "PRO232", "PRO243", "PRO256", "PRO269", "PRO274", "PRO304", "PRO339", "PRO1558", "PRO779", "PRO1185", "PRO1245", "PRO1759", "PRO5775", "PRO7133", "PRO7168", "PRO5725", "PRO202", "PRO206", "PRO264", "PRO313", "PRO342", "PRO542", "PRO773", "PRO861", "PRO1216", "PRO1686", "PRO1800", "PRO3562", "PRO9850", "PRO539", "PRO4316" or "PRO4980" polypeptide as disclosed herein and/or fragments thereof may be employed as a probe to screen for homologous DNAs (such as those encoding naturally-occurring variants of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980) in human tissue cDNA libraries or human tissue genomic libraries.
- Hybridization and washing of filters containing either library DNAs is performed under the following high stringency conditions. Hybridization of radiolabeled PRO197-, PRO207-, PRO226-, PRO232-, PRO243-, PRO256-, PRO269-, PRO274-, PRO304-, PRO339-, PRO1558-, PRO779-, PRO1185-, PRO1245-, PRO1759-, PRO5775-, PRO7133-, PRO7168-, PRO5725-, PRO202-, PRO206-, PRO264-, PRO313-, PRO342-, PRO542-, PRO773-, PRO861-, PRO1216-, PRO1686-, PRO1800-, PRO3562-, PRO9850-, PRO539-, PRO4316- or PRO4980-derived probe to the filters is performed in a solution of 50% formamide, 5x SSC, 0.1% SDS, 0.1% sodium pyrophosphate, 50 mM sodium phosphate, pH 6.8, 2x Denhardt's solution, and 10% dextran sulfate at 42°C for 20 hours. Washing of the filters is performed in an aqueous solution of 0.1x SSC and 0.1% SDS at 42°C.
- DNAs having a desired sequence identity with the DNA encoding full-length native sequence PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 can then be identified using standard techniques known in the art.

25 EXAMPLE 29

Expression of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 Polypeptides in *E. coli*.

- This example illustrates preparation of an unglycosylated form of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 by recombinant expression in *E. coli*.
- The DNA sequence encoding the PRO polypeptide of interest is initially amplified using selected PCR primers. The primers should contain restriction enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector. A variety of expression vectors may be employed. An example of a suitable vector

WO 01/53486

PCT/US00/03565

is pBR322 (derived from *E. coli*; see Bolivar *et al.*, Gene, 2:95 (1977)) which contains genes for ampicillin and tetracycline resistance. The vector is digested with restriction enzyme and dephosphorylated. The PCR amplified sequences are then ligated into the vector. The vector will preferably include sequences which encode for an antibiotic resistance gene, a trp promoter, a poly-His leader (including the first six STII codons, poly-His sequence, and enterokinase cleavage site), the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 coding region, lambda transcriptional terminator, and an argU gene.

10 The ligation mixture is then used to transform a selected *E. coli* strain using the methods described in Sambrook *et al.*, *supra*. Transformants are identified by their ability to grow on LB plates and antibiotic resistant colonies are then selected. Plasmid DNA can be isolated and confirmed by restriction analysis and DNA sequencing.

15 Selected clones can be grown overnight in liquid culture medium such as LB broth supplemented with antibiotics. The overnight culture may subsequently be used to inoculate a larger scale culture. The cells are then grown to a desired optical density, during which the expression promoter is turned on.

After culturing the cells for several more hours, the cells can be harvested by centrifugation. The cell pellet obtained by the centrifugation can be solubilized using various agents known in the art, and the solubilized PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 protein can then be purified using a metal chelating column under conditions that allow tight binding of the protein.

PRO197, PRO207, PRO1185, PRO5725, PRO202, and PRO3562 were successfully expressed in *E. coli* in a poly-His tagged form using the following procedure. The DNA encoding PRO197, PRO207, PRO1185, PRO5725, PRO202, and PRO3562 was initially amplified using selected PCR primers. The primers contained restriction enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector, and other useful sequences providing for efficient and reliable translation initiation, rapid purification on a metal chelation column, and proteolytic removal with enterokinase. The PCR-amplified, poly-His tagged sequences were then ligated into an expression vector, which was used to transform an *E. coli* host based on strain 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Transformants were first grown in LB containing 50 mg/ml carbenicillin at 30°C with shaking until an O.D. of 3-5 at 600 nm was reached. Cultures were then diluted 50-100 fold into CRAP media (prepared by mixing 3.57 g (NH₄)₂SO₄, 0.71 g sodium citrate•2H₂O, 1.07 g KCl, 5.36 g Difco yeast extract, 5.36g Sheffield hycase SF in 500 ml water, as well as 110 mM MPOS, pH 7.3, 0.55% (w/v) glucose and 7 mM MgSO₄) and grown for approximately 20-30 hours at 30°C with shaking. Samples were removed to verify expression by SDS-PAGE analysis, and the bulk culture was centrifuged to pellet the cells. Cell pellets were frozen until purification and refolding.

E. coli paste from 0.5 to 1 L fermentations (6-10 g pellets) was resuspended in 10 volumes (w/v) in 7 M

WO 01/53486

PCT/US00/03565

guanidine, 20 mM Tris, pH 8 buffer. Solid sodium sulfite and sodium tetrathionate were added to make final concentrations of 0.1M and 0.02 M, respectively, and the solution was stirred overnight at 4°C. This step results in a denatured protein with all cysteine residues blocked by sulfitolization. The solution was centrifuged at 40,000 rpm in a Beckman Ultracentrifuge for 30 min. The supernatant was diluted with 3-5 volumes of metal chelate column buffer (6 M guanidine, 20 mM Tris, pH 7.4) and filtered through 0.22 micron filters to clarify. The clarified extract was loaded onto a 5 ml Qiagen Ni²⁺-NTA metal chelate column equilibrated in the metal chelate column buffer. The column was washed with additional buffer containing 50 mM imidazole (Calbiochem, Utrol grade), pH 7.4. The proteins were eluted with buffer containing 250 mM imidazole. Fractions containing the desired protein were pooled and stored at 4°C. Protein concentration was estimated by its absorbance at 280 nm using the calculated extinction coefficient based on its amino acid sequence.

The protein was refolded by diluting sample slowly into freshly prepared refolding buffer consisting of: 20 mM Tris, pH 8.6, 0.3 M NaCl, 2.5 M urea, 5 mM cysteine, 20 mM glycine and 1 mM EDTA. Refolding volumes were chosen so that the final protein concentration was between 50 to 100 micrograms/ml. The refolding solution was stirred gently at 4°C for 12-36 hours. The refolding reaction was quenched by the addition of TFA to a final concentration of 0.4% (pH of approximately 3). Before further purification of the protein, the solution was filtered through a 0.22 micron filter and acetonitrile was added to 2-10% final concentration. The refolded protein was chromatographed on a Poros R1/H reversed phase column using a mobile buffer of 0.1% TFA with elution with a gradient of acetonitrile from 10 to 80%. Aliquots of fractions with A₂₈₀ absorbance were analyzed on SDS polyacrylamide gels and fractions containing homogeneous refolded protein were pooled. Generally, the properly refolded species of most proteins are eluted at the lowest concentrations of acetonitrile since those species are the most compact with their hydrophobic interiors shielded from interaction with the reversed phase resin. Aggregated species are usually eluted at higher acetonitrile concentrations. In addition to resolving misfolded forms of proteins from the desired form, the reversed phase step also removes endotoxin from the samples.

Fractions containing the desired folded PRO197, PRO207, PRO1185, PRO5725, PRO202, and PRO3562 protein were pooled and the acetonitrile removed using a gentle stream of nitrogen directed at the solution. Proteins were formulated into 20 mM Hepes, pH 6.8 with 0.14 M sodium chloride and 4% mannitol by dialysis or by gel filtration using G25 Superfine (Pharmacia) resins equilibrated in the formulation buffer and sterile filtered.

EXAMPLE 30

Expression of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 in mammalian cells

This example illustrates preparation of a potentially glycosylated form of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 by recombinant expression in mammalian cells.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

The vector, pRK5 (*see* EP 307,247, published March 15, 1989), is employed as the expression vector. Optionally, the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 DNA is ligated into pRK5 with selected restriction enzymes to allow insertion of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 DNA using ligation methods such as described in Sambrook *et al.*, *supra*. The resulting vector is called pRK5-PRO197, pRK5-PRO207, pRK5-PRO226, pRK5-PRO232, pRK5-PRO243, pRK5-PRO256, pRK5-PRO269, pRK5-PRO274, pRK5-PRO304, pRK5-PRO339, pRK5-PRO1558, pRK5-PRO779, pRK5-PRO1185, pRK5-PRO1245, pRK5-PRO1759, pRK5-PRO5775, pRK5-PRO7133, pRK5-PRO7168, pRK5-PRO5725, pRK5-PRO202, pRK5-PRO206, pRK5-PRO264, pRK5-PRO313, pRK5-PRO342, pRK5-PRO542, pRK5-PRO773, pRK5-PRO861, pRK5-PRO1216, pRK5-PRO1686, pRK5-PRO1800, pRK5-PRO3562, pRK5-PRO9850, pRK5-PRO539, pRK5-PRO4316 or pRK5-PRO4980.

In one embodiment, the selected host cells may be 293 cells. Human 293 cells (ATCC CCL 1573) are grown to confluence in tissue culture plates in medium such as DMEM supplemented with fetal calf serum and optionally, nutrient components and/or antibiotics. About 10 μ g pRK5-PRO197, pRK5-PRO207, pRK5-PRO226, pRK5-PRO232, pRK5-PRO243, pRK5-PRO256, pRK5-PRO269, pRK5-PRO274, pRK5-PRO304, pRK5-PRO339, pRK5-PRO1558, pRK5-PRO779, pRK5-PRO1185, pRK5-PRO1245, pRK5-PRO1759, pRK5-PRO5775, pRK5-PRO7133, pRK5-PRO7168, pRK5-PRO5725, pRK5-PRO202, pRK5-PRO206, pRK5-PRO264, pRK5-PRO313, pRK5-PRO342, pRK5-PRO542, pRK5-PRO773, pRK5-PRO861, pRK5-PRO1216, pRK5-PRO1686, pRK5-PRO1800, pRK5-PRO3562, pRK5-PRO9850, pRK5-PRO539, pRK5-PRO4316 or pRK5-PRO4980 DNA is mixed with about 1 μ g DNA encoding the VA RNA gene [Thimmapaya *et al.*, *Cell*, 31:543 (1982)] and dissolved in 500 μ l of 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.227 M CaCl_2 . To this mixture is added, dropwise, 500 μ l of 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM NaPO_4 , and a precipitate is allowed to form for 10 minutes at 25°C. The precipitate is suspended and added to the 293 cells and allowed to settle for about four hours at 37°C. The culture medium is aspirated off and 2 ml of 20% glycerol in PBS is added for 30 seconds. The 293 cells are then washed with serum free medium, fresh medium is added and the cells are incubated for about 5 days.

Approximately 24 hours after the transfections, the culture medium is removed and replaced with culture medium (alone) or culture medium containing 200 μ Ci/ml ^{35}S -cysteine and 200 μ Ci/ml ^{35}S -methionine. After a 12 hour incubation, the conditioned medium is collected, concentrated on a spin filter, and loaded onto a 15% SDS gel. The processed gel may be dried and exposed to film for a selected period of time to reveal the presence of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide. The cultures containing transfected cells may undergo further incubation (in serum free medium) and the medium is tested in selected bioassays.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

In an alternative technique, PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 DNA may be introduced into 293 cells transiently using the dextran sulfate method described by Sompayrac *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12:7575 (1981). 293 cells are grown to maximal density in a spinner flask and 700 μ g pRK5-PRO197, pRK5-PRO207, pRK5-PRO226, pRK5-PRO232, pRK5-PRO243, pRK5-PRO256, pRK5-PRO269, pRK5-PRO274, pRK5-PRO304, pRK5-PRO339, pRK5-PRO1558, pRK5-PRO779, pRK5-PRO1185, pRK5-PRO1245, pRK5-PRO1759, pRK5-PRO5775, pRK5-PRO7133, pRK5-PRO7168, pRK5-PRO5725, pRK5-PRO202, pRK5-PRO206, pRK5-PRO264, pRK5-PRO313, pRK5-PRO342, pRK5-PRO542, pRK5-PRO773, pRK5-PRO861, pRK5-PRO1216, pRK5-PRO1686, pRK5-PRO1800, pRK5-PRO3562, pRK5-PRO9850, pRK5-PRO539, pRK5-PRO4316 or pRK5-PRO4980 DNA is added. The cells are first concentrated from the spinner flask by centrifugation and washed with PBS. The DNA-dextran precipitate is incubated on the cell pellet for four hours. The cells are treated with 20% glycerol for 90 seconds, washed with tissue culture medium, and re-introduced into the spinner flask containing tissue culture medium, 5 μ g/ml bovine insulin and 0.1 μ g/ml bovine transferrin. After about four days, the conditioned media is centrifuged and filtered to remove cells and debris. The sample containing expressed PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 can then be concentrated and purified by any selected method, such as dialysis and/or column chromatography.

In another embodiment PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 can be expressed in CHO cells. The pRK5-PRO197, pRK5-PRO207, pRK5-PRO226, pRK5-PRO232, pRK5-PRO243, pRK5-PRO256, pRK5-PRO269, pRK5-PRO274, pRK5-PRO304, pRK5-PRO339, pRK5-PRO1558, pRK5-PRO779, pRK5-PRO1185, pRK5-PRO1245, pRK5-PRO1759, pRK5-PRO5775, pRK5-PRO7133, pRK5-PRO7168, pRK5-PRO5725, pRK5-PRO202, pRK5-PRO206, pRK5-PRO264, pRK5-PRO313, pRK5-PRO342, pRK5-PRO542, pRK5-PRO773, pRK5-PRO861, pRK5-PRO1216, pRK5-PRO1686, pRK5-PRO1800, pRK5-PRO3562, pRK5-PRO9850, pRK5-PRO539, pRK5-PRO4316 or pRK5-PRO4980 vector can be transfected into CHO cells using known reagents such as CaPO_4 or DEAE-dextran. As described above, the cell cultures can be incubated, and the medium replaced with culture medium (alone) or medium containing a radiolabel such as ^{35}S -methionine. After determining the presence of the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, the culture medium may be replaced with serum free medium. Preferably, the cultures are incubated for about 6 days, and then the conditioned medium is harvested. The medium

WO 01/53486

PCT/US00/03565

containing the expressed PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 can then be concentrated and purified by any selected

5

method.

Epitope-tagged PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 may also be expressed in host CHO cells. The PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 may be subcloned out of the pRK5 vector. The subclone insert can undergo PCR to fuse in frame with a selected epitope tag such as a poly-His tag into a Baculovirus expression vector. The poly-His tagged PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 insert can then be subcloned into a SV40 driven vector containing a selection marker such as DHFR for selection of stable clones. Finally, the CHO cells can be transfected (as described above) with the SV40 driven vector. Labeling may be performed, as described above, to verify expression. The culture medium containing the expressed poly-His tagged PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 can then be concentrated and purified by any selected method, such as by Ni²⁺-chelate affinity chromatography. Expression in CHO and/or COS cells may also be accomplished by a transient expression procedure.

10

15

20

25

PRO197, PRO226, PRO256, PRO202, PRO264, PRO542, PRO773 and PRO861 were expressed in CHO cells by a stable expression procedure, whereas PRO256, PRO264 and PRO861 were expressed in CHO cells by a transient procedure. Stable expression in CHO cells was performed using the following procedure. The proteins were expressed as an IgG construct (immunoadhesin), in which the coding sequences for the soluble forms (*e.g.*, extracellular domains) of the respective proteins were fused to an IgG1 constant region sequence containing the hinge, CH2 and CH2 domains and/or in a poly-His tagged form.

30

Following PCR amplification, the respective DNAs were subcloned in a CHO expression vector using standard techniques as described in Ausubel *et al.*, *Current Protocols of Molecular Biology*, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). CHO expression vectors are constructed to have compatible restriction sites 5' and 3' of the DNA of interest to allow the convenient shuttling of cDNA's. The vector used for expression in CHO cells is as described in Lucas *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 24:9 (1774-1779) (1996), and uses the SV40 early promoter/enhancer to drive expression of the cDNA of interest and dihydrofolate reductase (DHFR). DHFR expression permits

35

WO 01/53486

PCT/US00/03565

selection for stable maintenance of the plasmid following transfection.

Twelve micrograms of the desired plasmid DNA were introduced into approximately 10 million CHO cells using commercially available transfection reagents Superfect® (Qiagen), Dospere® or Eugene® (Boehringer Mannheim). The cells were grown as described in Lucas *et al., supra*. Approximately 3×10^7 cells are frozen in an ampule for further growth and production as described below.

The ampules containing the plasmid DNA were thawed by placement into a water bath and mixed by vortexing. The contents were pipetted into a centrifuge tube containing 10 mls of media and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes. The supernatant was aspirated and the cells were resuspended in 10 ml of selective media (0.2 μ m filtered PS20 with 5% 0.2 μ m diafiltered fetal bovine serum). The cells were then aliquoted into a 100 ml spinner containing 90 ml of selective media. After 1-2 days, the cells were transferred into a 250 ml spinner filled with 150 ml selective growth medium and incubated at 37°C. After another 2-3 days, 250 ml, 500 ml and 2000 ml spinners were seeded with 3×10^5 cells/ml. The cell media was exchanged with fresh media by centrifugation and resuspension in production medium. Although any suitable CHO media may be employed, a production medium described in US Patent No. 5,122,469, issued June 16, 1992 was actually used. 3L production spinner was seeded at 1.2×10^6 cells/ml. On day 0, the cell number and pH were determined. On day 1, the spinner was sampled and sparging with filtered air was commenced. On day 2, the spinner was sampled, the temperature shifted to 33°C, and 30 ml of 500 g/L glucose and 0.6 ml of 10% antifoam (*e.g.*, 35% polydimethylsiloxane emulsion, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion) added. Throughout the production, the pH was adjusted as necessary to keep at around 7.2. After 10 days, or until viability dropped below 70%, the cell culture was harvested by centrifugation and filtered through a 0.22 μ m filter. The filtrate was either stored at 4°C or immediately loaded onto columns for purification.

For the poly-His tagged constructs, the proteins were purified using a Ni²⁺-NTA column (Qiagen). Before purification, imidazole was added to the conditioned media to a concentration of 5 mM. The conditioned media was pumped onto a 6 ml Ni²⁺-NTA column equilibrated in 20 mM Hepes, pH 7.4, buffer containing 0.3 M NaCl and 5 mM imidazole at a flow rate of 4-5 ml/min. at 4°C. After loading, the column was washed with additional equilibration buffer and the protein eluted with equilibration buffer containing 0.25 M imidazole. The highly purified protein was subsequently desalted into a storage buffer containing 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl and 4% mannitol, pH 6.8, with a 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) column and stored at -80°C.

Immunoadhesin (Fc containing) constructs were purified from the conditioned media as follows. The conditioned medium was pumped onto a 5 ml Protein A column (Pharmacia) which had been equilibrated in 20 mM Na phosphate buffer, pH 6.8. After loading, the column was washed extensively with equilibration buffer before elution with 100 mM citric acid, pH 3.5. The eluted protein was immediately neutralized by collecting 1 ml fractions into tubes containing 275 μ l of 1 M Tris buffer, pH 9. The highly purified protein was subsequently desalted into storage buffer as described above for the poly-His tagged proteins. The homogeneity was assessed by SDS polyacrylamide gels and by N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

EXAMPLE 32

Expression of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800,

5 PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 in Yeast

The following method describes recombinant expression of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 in yeast.

10 First, yeast expression vectors are constructed for intracellular production or secretion of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 from the ADH2/GAPDH promoter. DNA encoding PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 and the promoter is inserted into suitable restriction enzyme sites in the selected plasmid to direct intracellular expression of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980. For secretion, DNA encoding PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 can be cloned into the selected plasmid, together with DNA encoding the ADH2/GAPDH promoter, a native PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 signal peptide or other mammalian signal peptide, or, for example, a yeast alpha-factor or invertase secretory signal/leader sequence, and linker sequences (if needed) for expression of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980.

35 Yeast cells, such as yeast strain AB110, can then be transformed with the expression plasmids described above and cultured in selected fermentation media. The transformed yeast supernatants can be analyzed by precipitation with 10% trichloroacetic acid and separation by SDS-PAGE, followed by staining of the gels with Coomassie Blue stain.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

Recombinant PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 can subsequently be isolated and purified by removing the yeast cells from the fermentation medium by centrifugation and then concentrating the medium using selected cartridge filters. The concentrate containing PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 may further be purified using selected column chromatography resins.

EXAMPLE 33

Expression of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 in Baculovirus-infected Insect Cells

The following method describes recombinant expression in Baculovirus-infected insect cells.

The sequence coding for PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 is fused upstream of an epitope tag contained within a baculovirus expression vector. Such epitope tags include poly-His tags and immunoglobulin tags (like Fc regions of IgG). A variety of plasmids may be employed, including plasmids derived from commercially available plasmids such as pVL1393 (Novagen). Briefly, the sequence encoding PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 or the desired portion of the coding sequence of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 [such as the sequence encoding the extracellular domain of a transmembrane protein or the sequence encoding the mature protein if the protein is extracellular] is amplified by PCR with primers complementary to the 5' and 3' regions. The 5' primer may incorporate flanking (selected) restriction enzyme sites. The product is then digested with those selected restriction enzymes and subcloned into the expression vector.

Recombinant baculovirus is generated by co-transfecting the above plasmid and BaculoGold™ virus DNA (Pharmlngen) into *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") cells (ATCC CRL 1711) using lipofectin (commercially available from GIBCO-BRL). After 4 - 5 days of incubation at 28°C, the released viruses are harvested and used for further

WO 01/53486

PCT/US00/03565

amplifications. Viral infection and protein expression are performed as described by O'Reilly *et al.*, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

Expressed poly-His tagged PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 can then be purified, for example, by Ni²⁺-chelate affinity chromatography as follows. Extracts are prepared from recombinant virus-infected Sf9 cells as described by Rupert *et al.*, Nature, 362:175-179 (1993). Briefly, Sf9 cells are washed, resuspended in sonication buffer (25 ml Hepes, pH 7.9; 12.5 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA; 10% glycerol; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl), and sonicated twice for 20 seconds on ice. The sonicates are cleared by centrifugation, and the supernatant is diluted 50-fold in loading buffer (50 mM phosphate, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 7.8) and filtered through a 0.45 µm filter. A Ni²⁺-NTA agarose column (commercially available from Qiagen) is prepared with a bed volume of 5 ml, washed with 25 ml of water and equilibrated with 25 ml of loading buffer. The filtered cell extract is loaded onto the column at 0.5 ml per minute. The column is washed to baseline A₂₈₀ with loading buffer, at which point fraction collection is started. Next, the column is washed with a secondary wash buffer (50 mM phosphate; 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 6.0), which elutes nonspecifically bound protein. After reaching A₂₈₀ baseline again, the column is developed with a 0 to 500 mM imidazole gradient in the secondary wash buffer. One ml fractions are collected and analyzed by SDS-PAGE and silver staining or Western blot with Ni²⁺-NTA-conjugated to alkaline phosphatase (Qiagen). Fractions containing the eluted His₆-tagged PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980, respectively, are pooled and dialyzed against loading buffer.

Alternatively, purification of the IgG tagged (or Fc tagged) PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 can be performed using known chromatography techniques, including for instance, Protein A or protein G column chromatography.

While expression is actually performed in a 0.5-2 L scale, it can be readily scaled up for larger (*e.g.*, 8 L) preparations. The proteins are expressed as an IgG construct (immunoadhesin), in which the protein extracellular region is fused to an IgG1 constant region sequence containing the hinge, CH2 and CH3 domains and/or in poly-His tagged forms.

Following PCR amplification, the respective coding sequences are subcloned into a baculovirus expression vector (pb.PH.IgG for IgG fusions and pb.PH.His.c for poly-His tagged proteins), and the vector and Baculogold® baculovirus DNA (Pharmingen) are co-transfected into 105 *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") cells (ATCC CRL 1711), using Lipofectin (Gibco BRL). pb.PH.IgG and pb.PH.His are modifications of the commercially available baculovirus expression vector pVL1393 (Pharmingen), with modified polylinker regions to include the His or Fc

WO 01/53486

PCT/US00/03565

tag sequences. The cells are grown in Hink's TNM-FH medium supplemented with 10% FBS (Hyclone). Cells are incubated for 5 days at 28°C. The supernatant is harvested and subsequently used for the first viral amplification by infecting Sf9 cells in Hink's TNM-FH medium supplemented with 10% FBS at an approximate multiplicity of infection (MOI) of 10. Cells are incubated for 3 days at 28°C. The supernatant is harvested and the expression of the constructs in the baculovirus expression vector is determined by batch binding of 1 ml of supernatant to 25 ml of Ni²⁺-NTA beads (QIAGEN) for histidine tagged proteins or Protein-A Sepharose CL-4B beads (Pharmacia) for IgG tagged proteins followed by SDS-PAGE analysis comparing to a known concentration of protein standard by Coomassie blue staining.

The first viral amplification supernatant is used to infect a spinner culture (500 ml) of Sf9 cells grown in ESF-921 medium (Expression Systems LLC) at an approximate MOI of 0.1. Cells are incubated for 3 days at 28°C. The supernatant is harvested and filtered. Batch binding and SDS-PAGE analysis are repeated, as necessary, until expression of the spinner culture is confirmed.

The conditioned medium from the transfected cells (0.5 to 3 L) is harvested by centrifugation to remove the cells and filtered through 0.22 micron filters. For the poly-His tagged constructs, the protein construct is purified using a Ni²⁺-NTA column (Qiagen). Before purification, imidazole is added to the conditioned media to a concentration of 5 mM. The conditioned media is pumped onto a 6 ml Ni²⁺-NTA column equilibrated in 20 mM Hepes, pH 7.4, buffer containing 0.3 M NaCl and 5 mM imidazole at a flow rate of 4-5 ml/min. at 4°C. After loading, the column is washed with additional equilibration buffer and the protein eluted with equilibration buffer containing 0.25 M imidazole. The highly purified protein is subsequently desalted into a storage buffer containing 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl and 4% mannitol, pH 6.8, with a 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) column and stored at -80°C.

Immunoadhesin (Fc containing) constructs of proteins are purified from the conditioned media as follows. The conditioned media is pumped onto a 5 ml Protein A column (Pharmacia) which has been equilibrated in 20 mM Na phosphate buffer, pH 6.8. After loading, the column is washed extensively with equilibration buffer before elution with 100 mM citric acid, pH 3.5. The eluted protein is immediately neutralized by collecting 1 ml fractions into tubes containing 275 ml of 1 M Tris buffer, pH 9. The highly purified protein is subsequently desalted into storage buffer as described above for the poly-His tagged proteins. The homogeneity of the proteins is verified by SDS polyacrylamide gel (PAGE) electrophoresis and N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation.

PRO256, PRO269, PRO1245, PRO264 and PRO542 were expressed in Baculovirus -infected Sf9 insect cells by the above procedure.

Alternatively, a modified baculovirus procedure may be used incorporating high 5 cells. In this procedure, the DNA encoding the desired sequence is amplified with suitable systems, such as Pfu (Stratagene), or fused upstream (5'-of) of an epitope tag contained with a baculovirus expression vector. Such epitope tags include poly-His tags and immunoglobulin tags (like Fc regions of IgG). A variety of plasmids may be employed, including plasmids derived from commercially available plasmids such as pIE1-1 (Novagen). The pIE1-1 and pIE1-2 vectors are designed for constitutive expression of recombinant proteins from the baculovirus ie1 promoter in stably-transformed insect cells. The plasmids differ only in the orientation of the multiple cloning sites and contain all promoter sequences known to be important for ie1-mediated gene expression in uninfected insect cells as well as

WO 01/53486

PCT/US00/03565

the hr5 enhancer element. pIE1-1 and pIE1-2 include the translation initiation site and can be used to produce fusion proteins. Briefly, the desired sequence or the desired portion of the sequence (such as the sequence encoding the extracellular domain of a transmembrane protein) is amplified by PCR with primers complementary to the 5' and 3' regions. The 5' primer may incorporate flanking (selected) restriction enzyme sites. The product is then digested with those selected restriction enzymes and subcloned into the expression vector. For example, derivatives of pIE1-1 can include the Fc region of human IgG (pb.PH.IgG) or an 8 histidine (pb.PH.His) tag downstream (3'-of) the desired sequence. Preferably, the vector construct is sequenced for confirmation.

High 5 cells are grown to a confluency of 50% under the conditions of 27°C, no CO₂, NO pen/strep. For each 150 mm plate, 30 µg of pIE based vector containing the sequence is mixed with 1 ml Ex-Cell medium (Media: Ex-Cell 401 + 1/100 L-Glu JRH Biosciences #14401-78P (note: this media is light sensitive)), and in a separate tube, 100 µl of CellFectin (CellFECTIN (GibcoBRL #10362-010) (vortexed to mix)) is mixed with 1 ml of Ex-Cell medium. The two solutions are combined and allowed to incubate at room temperature for 15 minutes. 8 ml of Ex-Cell media is added to the 2 ml of DNA/CellFECTIN mix and this is layered on high 5 cells that have been washed once with Ex-Cell media. The plate is then incubated in darkness for 1 hour at room temperature. The DNA/CellFECTIN mix is then aspirated, and the cells are washed once with Ex-Cell to remove excess CellFECTIN, 30 ml of fresh Ex-Cell media is added and the cells are incubated for 3 days at 28°C. The supernatant is harvested and the expression of the sequence in the baculovirus expression vector is determined by batch binding of 1 ml of supernatant to 25 ml of Ni²⁺-NTA beads (QIAGEN) for histidine tagged proteins or Protein-A Sepharose CL-4B beads (Pharmacia) for IgG tagged proteins followed by SDS-PAGE analysis comparing to a known concentration of protein standard by Coomassie blue staining.

The conditioned media from the transfected cells (0.5 to 3 L) is harvested by centrifugation to remove the cells and filtered through 0.22 micron filters. For the poly-His tagged constructs, the protein comprising the sequence is purified using a Ni²⁺-NTA column (QIAGEN). Before purification, imidazole is added to the conditioned media to a concentration of 5 mM. The conditioned media is pumped onto a 6 ml Ni²⁺-NTA column equilibrated in 20 mM Hepes, pH 7.4, buffer containing 0.3 M NaCl and 5 mM imidazole at a flow rate of 4-5 ml/min. at 48°C. After loading, the column is washed with additional equilibration buffer and the protein eluted with equilibration buffer containing 0.25 M imidazole. The highly purified protein is then subsequently desalted into a storage buffer containing 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl and 4% mannitol, pH 6.8, with a 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) column and stored at -80°C.

Immunoadhesin (Fc containing) constructs of proteins are purified from the conditioned media as follows. The conditioned media is pumped onto a 5 ml Protein A column (Pharmacia) which has been equilibrated in 20 mM Na phosphate buffer, pH 6.8. After loading, the column is washed extensively with equilibration buffer before elution with 100 mM citric acid, pH 3.5. The eluted protein is immediately neutralized by collecting 1 ml fractions into tubes containing 275 ml of 1 M Tris buffer, pH 9. The highly purified protein is subsequently desalted into storage buffer as described above for the poly-His tagged proteins. The homogeneity of the sequence is assessed by SDS polyacrylamide gels and by N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation and other analytical procedures as desired or necessary.

PRO226, PRO232, PRO243, PRO269, PRO779, PRO202, PRO542 and PRO861 were successfully

WO 01/53486

PCT/US00/03565

expressed by the above modified baculovirus procedure incorporating high 5 cells.

EXAMPLE 34

Preparation of Antibodies that Bind PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133,

5 PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980

This example illustrates preparation of monoclonal antibodies which can specifically bind PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980.

Techniques for producing the monoclonal antibodies are known in the art and are described, for instance, in Goding, *supra*. Immunogens that may be employed include purified PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 fusion proteins containing PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 on the cell surface. Selection of the immunogen can be made by the skilled artisan without undue experimentation.

25 Mice, such as Balb/c, are immunized with the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 immunogen emulsified in complete Freund's adjuvant and injected subcutaneously or intraperitoneally in an amount from 1-100 micrograms. Alternatively, the immunogen is emulsified in MPL-TDM adjuvant (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) and injected into the animal's hind foot pads. The immunized mice are then boosted 10 to 12 days later with additional immunogen emulsified in the selected adjuvant. Thereafter, for several weeks, the mice may also be boosted with additional immunization injections. Serum samples may be periodically obtained from the mice by retro-orbital bleeding for testing in ELISA assays to detect anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibodies.

After a suitable antibody titer has been detected, the animals "positive" for antibodies can be injected with a final intravenous injection of PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980. Three to four days later, the mice are sacrificed and the spleen cells are harvested. The spleen cells are then fused (using 35% polyethylene glycol) to a selected murine myeloma cell line such as P3X63AgU.1, available from ATCC, No. CRL 1597. The fusions generate hybridoma cells which can then be plated in 96 well tissue culture plates containing HAT (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine) medium to inhibit proliferation of non-fused cells, myeloma hybrids, and spleen cell hybrids.

The hybridoma cells will be screened in an ELISA for reactivity against PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980. Determination of "positive" hybridoma cells secreting the desired monoclonal antibodies against PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 is within the skill in the art.

The positive hybridoma cells can be injected intraperitoneally into syngeneic Balb/c mice to produce ascites containing the anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 monoclonal antibodies. Alternatively, the hybridoma cells can be grown in tissue culture flasks or roller bottles. Purification of the monoclonal antibodies produced in the ascites can be accomplished using ammonium sulfate precipitation, followed by gel exclusion chromatography. Alternatively, affinity chromatography based upon binding of antibody to protein A or protein G can be employed.

Deposit of Material:

The following materials have been deposited with the American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

WO 01/53486

PCT/US00/03565

	<u>Material</u>	<u>ATCC Deposit No.:</u>	<u>Deposit Date</u>
	DNA22780-1078	209284	September 18, 1997
	DNA30879-1152	209358	October 10, 1997
	DNA33460-1166	209376	October 16, 1997
5	DNA34435-1140	209250	September 16, 1997
	DNA35917-1207	209508	December 3, 1997
	DNA35880-1160	209379	October 16, 1997
	DNA38260-1180	209397	October 17, 1997
	DNA39987-1184	209786	April 21, 1998
10	DNA39520-1217	209482	November 21, 1997
	DNA43466-1225	209490	November 21, 1997
	DNA71282-1668	203312	October 6, 1998
	DNA58801-1052	55820	September 5, 1996
	DNA62881-1515	203096	August 4, 1998
15	DNA64884-1527	203155	August 25, 1998
	DNA76531-1701	203465	November 17, 1998
	DNA96869-2673	PTA-255	June 22, 1999
	DNA128451-2739	PTA-618	August 31, 1999
	DNA102846-2742	PTA-545	August 17, 1999
20	DNA92265-2669	PTA-256	June 22, 1999
	DNA35672-2508	203538	December 15, 1998
	DNA47465-1561	203661	February 2, 1999
	DNA94713-2561	203835	March 9, 1999
	DNA97003-2649	PTA-43	May 11, 1999

25 These deposits were made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty). This assures the maintenance of a viable culture of the deposit for 30 years from the date of deposit. The deposit will be made available by the ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an agreement between Genentech, Inc., and the ATCC, which assures permanent and unrestricted availability of the progeny of the culture of the deposit to the public upon issuance of the pertinent U.S. patent or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures availability of the progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto according to 35 U.S.C. § 122 and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 C.F.R. § 1.14 with particular reference to 886 OG 638).

30
35 The assignee of the present application has agreed that if a culture of the materials on deposit should die or be lost or destroyed when cultivated under suitable conditions, the materials will be promptly replaced on notification with another of the same. Availability of the deposited material is not to be construed as a license to

WO 01/53486

PCT/US00/03565

practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. The present invention is not to be limited in scope by the construct deposited, since the deposited
5 embodiment is intended as a single illustration of certain aspects of the invention and any constructs that are functionally equivalent are within the scope of this invention. The deposit of material herein does not constitute an admission that the written description herein contained is inadequate to enable the practice of any aspect of the invention, including the best mode thereof, nor is it to be construed as limiting the scope of the claims to the specific illustrations that it represents. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and
10 described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated antibody that binds to a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216,
- 5 PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide.
2. The antibody of Claim 1 which specifically binds to said polypeptide.
3. The antibody of Claim 1 which induces the death of a cell that expresses said polypeptide.
4. The antibody of Claim 3, wherein said cell is a cancer cell that overexpresses said polypeptide as compared to a normal cell of the same tissue type.
- 10 5. The antibody of Claim 1 which is a monoclonal antibody.
6. The antibody of Claim 5 which comprises a non-human complementarity determining region (CDR) or a human framework region (FR).
7. The antibody of Claim 1 which is labeled.
8. The antibody of Claim 1 which is an antibody fragment or a single-chain antibody.
- 15 9. A composition of matter which comprises an antibody of Claim 1 in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier.
10. The composition of matter of Claim 9 which comprises a therapeutically effective amount of said antibody.
11. The composition of matter of Claim 9 which further comprises a cytotoxic or a chemotherapeutic
- 20 agent.
12. An isolated nucleic acid molecule that encodes the antibody of Claim 1.
13. A vector comprising the nucleic acid molecule of Claim 12.
14. A host cell comprising the vector of Claim 13.
15. A method for producing an antibody that binds to a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

- PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, said method comprising culturing the host cell of Claim 14 under conditions sufficient to allow expression of said antibody and recovering said antibody from the cell culture.
16. An antagonist of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide.
17. The antagonist of Claim 16, wherein said antagonist inhibits tumor cell growth.
18. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes to a nucleic acid sequence that encodes a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, or the complement thereof.
19. The isolated nucleic acid molecule of Claim 18, wherein said hybridization is under stringent hybridization and wash conditions.
20. A method for determining the presence of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide in a sample suspected of containing said polypeptide, said method comprising exposing the sample to an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody and determining binding of said antibody to said polypeptide in said sample.
21. The method of Claim 20, wherein said sample comprises a cell suspected of containing a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO4316 or PRO4980 polypeptide.

22. The method of Claim 21, wherein said cell is a cancer cell.

23. A method of diagnosing tumor in a mammal, said method comprising detecting the level of expression of a gene encoding a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide (a) in a test sample of tissue cells obtained from the mammal, and (b) in a control sample of known normal tissue cells of the same cell type, wherein a higher expression level in the test sample, as compared to the control sample, is indicative of the presence of tumor in the mammal from which the test tissue cells were obtained.

24. A method of diagnosing tumor in a mammal, said method comprising (a) contacting an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody with a test sample of tissue cells obtained from the mammal, and (b) detecting the formation of a complex between said antibody and a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide in the test sample, wherein the formation of a complex is indicative of the presence of a tumor in said mammal.

25. The method of Claim 24, wherein said antibody is detectably labeled.

26. The method of Claim 24, wherein said test sample of tissue cells is obtained from an individual suspected of having neoplastic cell growth or proliferation.

27. A cancer diagnostic kit comprising an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody and a carrier in suitable packaging.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

28. The kit of Claim 27 which further comprises instructions for using said antibody to detect the presence of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide in a sample suspected of containing the same.
29. A method for inhibiting the growth of tumor cells, said method comprising exposing tumor cells that express a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide to an effective amount of an agent that inhibits a biological activity of said polypeptide, wherein growth of said tumor cells is thereby inhibited.
30. The method of Claim 29, wherein said tumor cells overexpress said polypeptide as compared to normal cells of the same tissue type.
31. The method of Claim 29, wherein said agent is an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody.
32. The method of Claim 31, wherein said anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody induces cell death.
33. The method of Claim 29, wherein said tumor cells are further exposed to radiation treatment, a cytotoxic agent or a chemotherapeutic agent.
34. A method for inhibiting the growth of tumor cells, said method comprising exposing tumor cells that express a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide to an effective amount of an agent that inhibits the

WO 01/53486

PCT/US00/03565

expression of said polypeptide, wherein growth of said tumor cells is thereby inhibited.

35. The method of Claim 34, wherein said tumor cells overexpress said polypeptide as compared to normal cells of the same tissue type.

36. The method of Claim 34, wherein said agent is an antisense oligonucleotide that hybridizes to a nucleic acid which encodes the PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide or the complement thereof.

37. The method of Claim 36, wherein said tumor cells are further exposed to radiation treatment, a cytotoxic agent or a chemotherapeutic agent.

38. An article of manufacture, comprising:
a container;
a label on the container; and
a composition comprising an active agent contained within the container, wherein the composition is effective for inhibiting the growth of tumor cells and wherein the label on the container indicates that the composition is effective for treating conditions characterized by overexpression of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide in said tumor cells as compared to in normal cells of the same tissue type.

39. The article of manufacture of Claim 38, wherein said active agent inhibits a biological activity of and/or the expression of said PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide.

40. The article of manufacture of Claim 39, wherein said active agent is an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody.

WO 01/53486

PCT/US00/03565

41. The article of manufacture of Claim 39, wherein said active agent is an antisense oligonucleotide.
42. A method of identifying a compound that inhibits a biological or immunological activity of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, said method comprising contacting a candidate compound with said polypeptide under conditions and for a time sufficient to allow the two components to interact and determining whether a biological or immunological activity of said polypeptide is inhibited.
43. The method of Claim 42, wherein said candidate compound is an anti-PRO197, anti-PRO207, anti-PRO226, anti-PRO232, anti-PRO243, anti-PRO256, anti-PRO269, anti-PRO274, anti-PRO304, anti-PRO339, anti-PRO1558, anti-PRO779, anti-PRO1185, anti-PRO1245, anti-PRO1759, anti-PRO5775, anti-PRO7133, anti-PRO7168, anti-PRO5725, anti-PRO202, anti-PRO206, anti-PRO264, anti-PRO313, anti-PRO342, anti-PRO542, anti-PRO773, anti-PRO861, anti-PRO1216, anti-PRO1686, anti-PRO1800, anti-PRO3562, anti-PRO9850, anti-PRO539, anti-PRO4316 or anti-PRO4980 antibody.
44. The method of Claim 42, wherein said candidate compound or said PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide is immobilized on a solid support.
45. The method of Claim 44, wherein the non-immobilized component is detectably labeled.
46. A method of identifying a compound that inhibits an activity of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide, said method comprising the steps of (a) contacting cells and a candidate compound to be screened in the presence of said polypeptide under conditions suitable for the induction of a cellular response normally induced by said polypeptide and (b) determining the induction of said cellular response to determine if the test compound is an effective antagonist, wherein the lack of induction of said cellular response is indicative of said compound being an effective antagonist.
47. A method for identifying a compound that inhibits the expression of a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542,

WO 01/53486

PCT/US00/03565

PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide in cells that express said polypeptide, wherein said method comprises contacting said cells with a candidate compound and determining whether expression of said polypeptide is inhibited.

48. The method of Claim 47, wherein said candidate compound is an antisense oligonucleotide.

5 49. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to a nucleotide sequence that encodes an amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), Figure 34 (SEQ ID NO:34), Figure 36 (SEQ ID NO:36), Figure 38 (SEQ ID NO:38), Figure 40 (SEQ ID NO:40), Figure 42 (SEQ ID NO:42), Figure 44 (SEQ ID NO:44), Figure 46 (SEQ ID NO:46), Figure 48 (SEQ ID NO:48), Figure 50 (SEQ ID NO:50), Figure 52 (SEQ ID NO:52), Figure 54 (SEQ ID NO:54), Figure 56 (SEQ ID NO:56), Figure 58 (SEQ ID NO:58), Figure 60 (SEQ ID NO:60), Figure 62 (SEQ ID NO:62), Figure 64 (SEQ ID NO:64), Figure 66 (SEQ ID NO:66), Figure 68 (SEQ ID NO:68) and Figure 70 (SEQ ID NO:70).

50. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to a nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 5 (SEQ ID NO:5), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 9 (SEQ ID NO:9), Figure 11 (SEQ ID NO:11), Figure 13 (SEQ ID NO:13), Figure 15 (SEQ ID NO:15), Figure 17 (SEQ ID NO:17), Figure 19 (SEQ ID NO:19), Figure 21 (SEQ ID NO:21), Figure 23 (SEQ ID NO:23), Figure 25 (SEQ ID NO:25), Figure 27 (SEQ ID NO:27), Figure 29 (SEQ ID NO:29), Figure 31 (SEQ ID NO:31), Figure 33 (SEQ ID NO:33), Figure 35 (SEQ ID NO:35), Figure 37 (SEQ ID NO:37), Figure 39 (SEQ ID NO:39), Figure 41 (SEQ ID NO:41), Figure 43 (SEQ ID NO:43), Figure 45 (SEQ ID NO:45), Figure 47 (SEQ ID NO:47), Figure 49 (SEQ ID NO:49), Figure 51 (SEQ ID NO:51), Figure 53 (SEQ ID NO:53), Figure 55 (SEQ ID NO:55), Figure 57 (SEQ ID NO:57), Figure 59 (SEQ ID NO:59), Figure 61 (SEQ ID NO:61), Figure 63 (SEQ ID NO:63), Figure 65 (SEQ ID NO:65), Figure 67 (SEQ ID NO:67) and Figure 69 (SEQ ID NO:69).

51. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to a nucleotide sequence selected from the group consisting of the full-length coding sequence of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), Figure 3 (SEQ ID NO:3), Figure 5 (SEQ ID NO:5), Figure 7 (SEQ ID NO:7), Figure 9 (SEQ ID NO:9), Figure 11 (SEQ ID NO:11), Figure 13 (SEQ ID NO:13), Figure 15 (SEQ ID NO:15), Figure 17 (SEQ ID NO:17), Figure 19 (SEQ ID NO:19), Figure 21 (SEQ ID NO:21), Figure 23 (SEQ ID NO:23), Figure 25 (SEQ ID NO:25), Figure 27 (SEQ ID NO:27), Figure 29 (SEQ ID NO:29), Figure 31 (SEQ ID NO:31), Figure 33 (SEQ ID NO:33), Figure 35 (SEQ ID NO:35), Figure 37 (SEQ ID NO:37), Figure 39 (SEQ ID NO:39), Figure 41 (SEQ ID NO:41), Figure 43 (SEQ ID NO:43), Figure 45 (SEQ ID NO:45), Figure 47 (SEQ ID NO:47), Figure 49 (SEQ ID NO:49).

WO 01/53486

PCT/US00/03565

ID NO:49), Figure 51 (SEQ ID NO:51), Figure 53 (SEQ ID NO:53), Figure 55 (SEQ ID NO:55), Figure 57 (SEQ ID NO:57), Figure 59 (SEQ ID NO:59), Figure 61 (SEQ ID NO:61), Figure 63 (SEQ ID NO:63), Figure 65 (SEQ ID NO:65), Figure 67 (SEQ ID NO:67) and Figure 69 (SEQ ID NO:69).

52. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to the full-length coding
 5 sequence of the DNA deposited under ATCC accession number 209284, 209358, 203376, 209250, 209508, 209379, 209397, 209786, 209482, 209490, 203312, 55820, 203096, 203155, 203465, PTA-255, PTA-618, PTA-545, PTA-256, 203538, 203661, 203835 or PTA-43.
53. A vector comprising the nucleic acid of any one of Claims 49 to 52.
54. The vector of Claim 53 operably linked to control sequences recognized by a host cell transformed
 10 with the vector.
55. A host cell comprising the vector of Claim 53.
56. The host cell of Claim 55, wherein said cell is a CHO cell.
57. The host cell of Claim 55, wherein said cell is an *E. coli*.
58. The host cell of Claim 55, wherein said cell is a yeast cell.
- 15 59. The host cell of Claim 55, wherein said cell is a Baculovirus-infected insect cell.
60. A process for producing a PRO197, PRO207, PRO226, PRO232, PRO243, PRO256, PRO269, PRO274, PRO304, PRO339, PRO1558, PRO779, PRO1185, PRO1245, PRO1759, PRO5775, PRO7133, PRO7168, PRO5725, PRO202, PRO206, PRO264, PRO313, PRO342, PRO542, PRO773, PRO861, PRO1216, PRO1686, PRO1800, PRO3562, PRO9850, PRO539, PRO4316 or PRO4980 polypeptide comprising culturing the
 20 host cell of Claim 55 under conditions suitable for expression of said polypeptide and recovering said polypeptide from the cell culture.
61. An isolated polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), Figure 34 (SEQ ID NO:34), Figure 36 (SEQ ID NO:36), Figure 38 (SEQ ID NO:38), Figure 40 (SEQ ID NO:40), Figure 42 (SEQ ID NO:42), Figure 44 (SEQ

WO 01/53486

PCT/US00/03565

ID NO:44), Figure 46 (SEQ ID NO:46), Figure 48 (SEQ ID NO:48), Figure 50 (SEQ ID NO:50), Figure 52 (SEQ ID NO:52), Figure 54 (SEQ ID NO:54), Figure 56 (SEQ ID NO:56), Figure 58 (SEQ ID NO:58), Figure 60 (SEQ ID NO:60), Figure 62 (SEQ ID NO:62), Figure 64 (SEQ ID NO:64), Figure 66 (SEQ ID NO:66), Figure 68 (SEQ ID NO:68) and Figure 70 (SEQ ID NO:70).

- 5 62. An isolated polypeptide scoring at least 80% positives when compared to an amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), Figure 34 (SEQ ID NO:34), Figure 36 (SEQ ID NO:36), Figure 38 (SEQ ID NO:38), Figure 40 (SEQ ID NO:40), Figure 42 (SEQ ID NO:42), Figure 44 (SEQ ID NO:44), Figure 46 (SEQ ID NO:46), Figure 48 (SEQ ID NO:48), Figure 50 (SEQ ID NO:50), Figure 52 (SEQ ID NO:52), Figure 54 (SEQ ID NO:54), Figure 56 (SEQ ID NO:56), Figure 58 (SEQ ID NO:58), Figure 60 (SEQ ID NO:60), Figure 62 (SEQ ID NO:62), Figure 64 (SEQ ID NO:64), Figure 66 (SEQ ID NO:66), Figure 68 (SEQ ID NO:68) and Figure 70 (SEQ ID NO:70).

63. An isolated polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the DNA deposited under ATCC accession number 209284, 209358, 203376, 209250, 209508, 209379, 209397, 209786, 209482, 209490, 203312, 55820, 203096, 203155, 203465, PTA-255, PTA-618, PTA-545, PTA-256, 203538, 203661, 203835 or PTA-43.

- 20 64. A chimeric molecule comprising a polypeptide according to any one of Claims 61 to 63 fused to a heterologous amino acid sequence.

65. The chimeric molecule of Claim 64, wherein said heterologous amino acid sequence is an epitope tag sequence.

- 25 66. The chimeric molecule of Claim 64, wherein said heterologous amino acid sequence is a Fc region of an immunoglobulin.

67. An antibody which specifically binds to a polypeptide according to any one of Claims 61 to 63.

68. The antibody of Claim 67, wherein said antibody is a monoclonal antibody, a humanized antibody or a single-chain antibody.

- 30 69. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to:
(a) a nucleotide sequence encoding the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4

WO 01/53486

PCT/US00/03565

- (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), Figure 34 (SEQ ID NO:34), Figure 36 (SEQ ID NO:36), Figure 38 (SEQ ID NO:38), Figure 40 (SEQ ID NO:40), Figure 42 (SEQ ID NO:42), Figure 44 (SEQ ID NO:44), Figure 46 (SEQ ID NO:46), Figure 48 (SEQ ID NO:48), Figure 50 (SEQ ID NO:50), Figure 52 (SEQ ID NO:52), Figure 54 (SEQ ID NO:54), Figure 56 (SEQ ID NO:56), Figure 58 (SEQ ID NO:58), Figure 60 (SEQ ID NO:60), Figure 62 (SEQ ID NO:62), Figure 64 (SEQ ID NO:64), Figure 66 (SEQ ID NO:66), Figure 68 (SEQ ID NO:68) or Figure 70 (SEQ ID NO:70), lacking its associated signal peptide;
- 10 (b) a nucleotide sequence encoding an extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), Figure 34 (SEQ ID NO:34), Figure 36 (SEQ ID NO:36), Figure 38 (SEQ ID NO:38), Figure 40 (SEQ ID NO:40), Figure 42 (SEQ ID NO:42), Figure 44 (SEQ ID NO:44), Figure 46 (SEQ ID NO:46), Figure 48 (SEQ ID NO:48), Figure 50 (SEQ ID NO:50), Figure 52 (SEQ ID NO:52), Figure 54 (SEQ ID NO:54), Figure 56 (SEQ ID NO:56), Figure 58 (SEQ ID NO:58), Figure 60 (SEQ ID NO:60), Figure 62 (SEQ ID NO:62), Figure 64 (SEQ ID NO:64), Figure 66 (SEQ ID NO:66), Figure 68 (SEQ ID NO:68) or Figure 70 (SEQ ID NO:70), with its associated signal peptide; or
- 20 (c) a nucleotide sequence encoding an extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), Figure 34 (SEQ ID NO:34), Figure 36 (SEQ ID NO:36), Figure 38 (SEQ ID NO:38), Figure 40 (SEQ ID NO:40), Figure 42 (SEQ ID NO:42), Figure 44 (SEQ ID NO:44), Figure 46 (SEQ ID NO:46), Figure 48 (SEQ ID NO:48), Figure 50 (SEQ ID NO:50), Figure 52 (SEQ ID NO:52), Figure 54 (SEQ ID NO:54), Figure 56 (SEQ ID NO:56), Figure 58 (SEQ ID NO:58), Figure 60 (SEQ ID NO:60), Figure 62 (SEQ ID NO:62), Figure 64 (SEQ ID NO:64), Figure 66 (SEQ ID NO:66), Figure 68 (SEQ ID NO:68) or Figure 70 (SEQ ID NO:70), lacking its associated signal peptide.
- 25
- 30 70. An isolated polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to:
- (a) the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), Figure 34 (SEQ ID NO:34), Figure 36 (SEQ ID NO:36), Figure 38 (SEQ ID NO:38), Figure 40 (SEQ ID NO:40), Figure 42 (SEQ ID NO:42), Figure 44 (SEQ ID NO:44), Figure 46 (SEQ ID NO:46), Figure 48 (SEQ ID NO:48), Figure 50 (SEQ ID NO:50), Figure 52 (SEQ ID NO:52), Figure 54 (SEQ ID NO:54), Figure 56 (SEQ ID NO:56), Figure 58 (SEQ ID NO:58), Figure 60 (SEQ ID NO:60), Figure 62 (SEQ ID NO:62), Figure 64 (SEQ ID NO:64), Figure 66 (SEQ ID NO:66), Figure 68 (SEQ ID NO:68) or Figure 70 (SEQ ID NO:70), lacking its associated signal peptide.
- 35

WO 01/53486

PCT/US00/03565

NO:54), Figure 56 (SEQ ID NO:56) Figure 58 (SEQ ID NO:58), Figure 60 (SEQ ID NO:60), Figure 62 (SEQ ID NO:62), Figure 64 (SEQ ID NO:64), Figure 66 (SEQ ID NO:66), Figure 68 (SEQ ID NO:68) or Figure 70 (SEQ ID NO:70), lacking its associated signal peptide;

- (b) an extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), Figure 34 (SEQ ID NO:34), Figure 36 (SEQ ID NO:36), Figure 38 (SEQ ID NO:38), Figure 40 (SEQ ID NO:40), Figure 42 (SEQ ID NO:42), Figure 44 (SEQ ID NO:44), Figure 46 (SEQ ID NO:46), Figure 48 (SEQ ID NO:48), Figure 50 (SEQ ID NO:50), Figure 52 (SEQ ID NO:52), Figure 54 (SEQ ID NO:54), Figure 56 (SEQ ID NO:56) Figure 58 (SEQ ID NO:58), Figure 60 (SEQ ID NO:60), Figure 62 (SEQ ID NO:62), Figure 64 (SEQ ID NO:64), Figure 66 (SEQ ID NO:66), Figure 68 (SEQ ID NO:68) or Figure 70 (SEQ ID NO:70), with its associated signal peptide; or
- (c) an extracellular domain of the polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), Figure 4 (SEQ ID NO:4), Figure 6 (SEQ ID NO:6), Figure 8 (SEQ ID NO:8), Figure 10 (SEQ ID NO:10), Figure 12 (SEQ ID NO:12), Figure 14 (SEQ ID NO:14), Figure 16 (SEQ ID NO:16), Figure 18 (SEQ ID NO:18), Figure 20 (SEQ ID NO:20), Figure 22 (SEQ ID NO:22), Figure 24 (SEQ ID NO:24), Figure 26 (SEQ ID NO:26), Figure 28 (SEQ ID NO:28), Figure 30 (SEQ ID NO:30), Figure 32 (SEQ ID NO:32), Figure 34 (SEQ ID NO:34), Figure 36 (SEQ ID NO:36), Figure 38 (SEQ ID NO:38), Figure 40 (SEQ ID NO:40), Figure 42 (SEQ ID NO:42), Figure 44 (SEQ ID NO:44), Figure 46 (SEQ ID NO:46), Figure 48 (SEQ ID NO:48), Figure 50 (SEQ ID NO:50), Figure 52 (SEQ ID NO:52), Figure 54 (SEQ ID NO:54), Figure 56 (SEQ ID NO:56) Figure 58 (SEQ ID NO:58), Figure 60 (SEQ ID NO:60), Figure 62 (SEQ ID NO:62), Figure 64 (SEQ ID NO:64), Figure 66 (SEQ ID NO:66), Figure 68 (SEQ ID NO:68) or Figure 70 (SEQ ID NO:70), lacking its associated signal peptide.

GCACGATCTAGCGGGATCTGCTGAGATACCTGATTCAGGATTTCTTCAGCGGATCTCTGCAACCAAGGGGTTCTACCG
CCGGCTGCTCGGCTCTTCAGGCTCTGCACTTGGAACCCCAAGCTCCCGGAGGATCCCGCAATCCGCGCTCTGCGCTG
GCTACTTAAGAGAGAGAGCGGGTCTCCAGCGCGCGGGGACGGCTGATCTCTGAGCGGCGCAATCGGCTGCTACT
GAGCGCTCAGGGGCGAACCCTGCACTCAGGTGGCGAGCTTTGTGGCTCTGGGAGAGAGATGATGCTCTGCGTCA
CGACATCTCTGCAAGCTCGCGCAGGGGGCTGGCGCAACACCGGAGACACCGGCGATCAGCTAGAGCGGCTCTGAGAG
GGCGCTCCAGGCTTGGCGGCTCGCGCTCTGAGGGAGACAGAGGGTCCACAGCGATCTCCGCTTAGCCGCTGAGAGCGG
GGTGAACCTCGAGGTTCTCCAGCTCTGACGACACACTCAAGGGCTCAGAACAGGAGGATCCAGCAACTCTCTCCA
CAGAGTGTCGCGCAGCAGCGAGCACTGGAGAGAGCAGCACTCGGAATTCAGCATCTCGAAAGCGAATTTGGCTCT
GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
AGTTGACCGCGCTCCAAATCTCAGCGCTCTGACCGCTCCCAAGGATTCGACGAGAGCTCTTCAGGTTTGGGAG
GAGGACGAGGTGGATATTTGAATATCGCTCAGGCTCAGGGGCTTCGCGCATTTTGTGTGAATCGAAGTAACTCAAG
TGAGGGAGTGGCAGTAATTCAGAGGCGCGCACTGGCTGAGTGAATGATCAACCGCGCTTGGAGAGGCTCAACAGG
GGGGTTTGGGGATCCCAACGGCGATTTCTGGCTGGTCTGGAGAGAGGTCAACAGCATCTCAGGGGAGACCGCAACAG
CCCGCTCTGAGCTCGCGGACTCGGGACTGGAGTGGAGCGACGCGAGTATCTCGATGTTCTCCGTGCACTGGGTGGAG
GGACACGGCTCTATGGCTCTCAGCTCTACGTGACACCGTGGAGCGCGAGCTGGGGGTCACCGGCTCCCAACGAGCGG
GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
TGAGGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
CGAGAGAGCTTTAAGAGGAAATCTCTCGGAGAGCATGGGCGGGCGCTACTACCGGCTCAGAGCGCAACCATGTT
GATTCACCGATCTGGCGAGAGGATGGCGCTCTTCTGGCTCTGGCTGGGGCTGGTTCAGGCGCCAGAAAGACGGTGT
ACTCTTGGCTCTGCGCAGAGGATGAGGCGCTTCTGCTGGGCGAGGCTCCACAGAGAGGGCCATCTGGAATATCT
GTGACAGAGAGAGAGAACACGACCTGGAGAGAGCCCTCTTCTAGTGGAGAGGAGGCGTGAATCTGGCTGCTCTGAG
GTAGAGAGCTTCGAGATGATCTTCAGACTCTAGAGAGGCTGGAGACAGAGGAGATGGAGCTCTCAGCTCTCTGAGCA
GGAGTGTGGAGACTCAGAGGAGCACTTGGGGCGACAGCAGAGCTGGCTCAATGGGAGCATCTGGAGCTCTGGAGCT
GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
ACACAGCGAGCGCAATGTATCTGGCGAGGATCTCAGAGTCTTGGATATTAAGCAATCAAGCAACAC

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 2

MTVIRFFPAASATIKRVLPVLRVSSPFTWNPVPSPRIPAPRLPKRMMSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPV
QSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQGGLEHAERTRSQLSALERRLSACGSACQGTGSTDLPAPESRVDPEVLH
SLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLSQFGLLDHKHLDHEVAKPARKRLPEMAQPVDPAHNV
SRLHRLPRDQQLFQVGERQSGLEIQQSGSPFFLVNCKMTSDGGWTVIQRHDGSVDFNRPWEAYKAGFGDPHG
EFWLGLKVVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNABELLQFSVHLGGEDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPFSGLSVPFST
WDQDHLRRDKNCARSLSGGWFGTCSHSNNGQYFRSIPQQRQKLKKGIFWKTWRGRYYELQATTMLIQPMABEAS

Transmembrane domain: Amino acids 51-70

N-glycosylation site: Amino acids 224-228

cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites:
Amino acids 46-50;118-122

N-myristoylation sites: Amino acids 50-56;129-135;341-347;
357-363

Fibrinogen beta and gamma chains C-terminal domain signature:
Amino acids 396-409

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 3

CGATCCCTCCGGGTCCGGGATGGGGGGCGGTGAGGCAGGCACAGCCCCCGCCCCATGSCCGCCCGTCGGAGC
CAGAGCGGAGGGGGCGCGGGGGGAGCCGGGCAACGCCCTGCTGGTCCCGCTGGCGCTGGGCTTGGGCTTGGG
CTGGCTGACCTCGGCTCCTGCTGGCCGTGGTCACTTTGGGGAGCCGGGCATCGCTGTCCGCCAGGAGCCCTGCC
CAGGAGGAGCTGGTGGCAGAGGAGGACAGGACCCGTCGGAACTGAATCCCCAGACAGAGAAAGCCAGGATCCT
GCGCCTTTCCCTGAACCGACTAGTTCCGCTCCGCAAGTGCACTAAAGCCCGGAAACAGGCGCTCGAAGAGCG
ATCGCAGGCCATTATGAAGTTCAACCAAGACCTGGACAGGACGGAGCGCAGGCGAGGTGTGGAAGGAGCAGTGAGT
GGCTGGGAGGAGCCAGAATCAACAGCTCCAGCCCTCTGGCTACAAACGCCAGATCGGGGAGTTTATAGTCACC
CGGGCTGGGCTCTACTACCTGTACTGTCAAGTGCACCTTTGATGAGGGGAGGCTGTCTACCTGAAGCTGGACTTG
CTGGTGGATGGTGTGCTGGCCCTGCGCTGCCCTGGAGGAATCTCAGCCACTGCGGCGAGTTCCCTGGGCCCCAG
CTCCGCTCTGCGAGGTGTGGGCTGTGGCCCTGGGCGAGGTCTCCCTGCGGATCCGCACTCCCTCCCTGG
GCCATCTCAAGGCTGCCCTTCCCTCACTACTTCGAGCTCTCCAGGTTCACTGAGGGCCCTGGTCTCCCG
CAGTGTCCAGGCTGCCGCTCCCTCCGACAGCTCTCTGGGCAACCGGTCCTCTGCCCCACCCCTCAGCCGCT
CTTTGCTCCAGACTGCCCTCCCTCTAGAGGCTGCCCTGGGCTGTTCACGTGTTTCCATCCCACTAATACA
GTATTCCTCACTCTTATCTTACAACTCCCCACCGCCCTCTCCACCTCACTAGCTCCCAATCCCTGAACCTTT
GAGGCCCCCAGTGATCTCGACTCCCTCCCTGGCCACAGACCCCGAGTCACTTGTGTTCACTGTACTCTGTGGGCAA
GGATGGGTCAGAGAACCCCACTTCAGGCACTAAGAGGGGCTGGAACCTGGCGGAGGAGCCAAAGAGACTGGGC
CTAGGCCAGAGTTCCCAATGTGAGGGGCGAGAAACAAGACAAGCTCTCCCTTGAGAAATCCCTGTGGAATTT
TAAACAGATATTATTTTATTATTATTGTGACAAATGTTGATAAATGGATATTAAATAGATAAGTCAATAAAAAA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 4

MAARRSQRRGRGEPGTALLVFLALGLGLALACLGILLAVVSLGSRASLSAQEPAQEELVAERDQDPSEINPQT
ESQDEPAPFLNRLVPRRSAPKGRKTRARRAIAAHYEVHPRPGQDGAQAGVDGTVSGWEARINSSPLRYNRQI
GEFIVTRAGLYLYLCQVHFDEGKAVYLLKDLLVDGLALRCLEEFSAATAASSLGPQLRLCQVSGLLALRFGSSLR
IRTLFWAHLKAAPFLTYFGLFQVH

signal sequence:	Amino acids 1-40
N-glycosylation site:	Amino acids 139-143
N-myristoylation sites:	Amino acids 27-33;29-35;36-42;45-51; 118-124;121-127;125-131;128-134
Amidation sites:	Amino acids 10-14;97-101
Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site:	Amino acids 24-35

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 5

CCCAAGCCAGCCGAGCCGCCAGAGCCGCGGGCCGCGGGGGTGTGCGGGGCCAAACCCAGGATGCTCCCTGCGC
CTCCTGCTTACCCGGCTCTCTACTGCTCTGGGGCGCTGCTACTGTGCTCTTGGGATCAGCTTCTCTCAGGATTC
TGAAGAGCCCGACAGCTACACGGAATGCRACGATGGCTATGAGTGGGACCCAGACGCCAGCACTGCCGGGATGT
CAACAGTGTCTGAACCACTCCCTGAGGCTGCAAGGGGAAATGAAGTGCCATCAACCACTACGGGGCTACTTGTGC
CTGCCCGCTCCGCTGCTCATCAGACCTACATGGGAGGACCCCGCCAGTGCCTCCCGCTCAACAC
CCCAACCCCTGCCACCAGGCTATGAGCCCAOGATCAGGACAGCTGTGTGGATGTGGACGATGTGCCAGGCC
CTGCACGACTGTGCCCCAGCCAGGACTGCCATAAATTGCTGGCTCCTATCAGTGCACTGCCCTGATGGTTAC
CGCAAGATCGGGCCCGAGTGTGTGGACATAGACGAGTGCCGCTACCGCTACTGCCAGCACCGCTGCTGAACCTG
CCTGGCTCCTTCCGCTGCCAGTGCAGCCGGGCTTCCAGCTGGGGCTTAAACAACCGCTCCTGTGTGTGTGAAC
GAGTGTGACATGGGGGCCCATGCGAGCAGGCTGCTTCAACTCCTATGGGACCTTCTGTGTGCTGCCACCCAG
GGCTATGAGCTGCATCGGGATGGCTTCTCTGCGAGTGATATTGATGAGTGTAGCTACTCCAGCTACCTCTGTGAG
TACCGCTGCTCAGACGAGCCAGGCCGTTTCTCTGCGCACTGCCACAGGTTTACAGCTGCTGGCCACACCGCTC
TGGCAAGCACTTGTGATGATGTGATCTGTGTGCGCCAGTGTCCGAGGCCCAAACTGTGTCACTTCCATGGG
GGCTACCGCTGCGTGACACCAACCGCTGCTGTGGAGCCCTACATCCAGGTCTCTGAGAACCGCTGTCTCTGCCCG
GCCTCAAACCTCTATGTCCAGAGCAGCCTTCACTTGTGCAACCGCTACATGACCATCACTCGAGCGGAGC
GTGCCGCTGACGTGTCCAGATCCAGCGACCTCCGTCTACCCCGGTGCTACAACTGCTTTCAGATCCGTGCT
GGAACTCGCAGGGGACTTTTACATTAGGCAAAATCAACACGTGAGCGCCATGCTGGCTCTCGCCCGGCCGGTG
ACGGGCCCCCGGAGTACGTGTGACCTGGAGATGGTCACCATGAATCCCTCATGAGCTACCGGGCCAGCTCT
GTACTGAGGCTCACCTCTTTGTAGGGCCCTACACTTCTGAGGAGCAGGAGGAGGCCACCTCCCTGCACTAC
CCTAGCTGAGGAGCTGTGTGTGAGGGCAGATGAGAAAGGCAATAAAGGAGAAAGAAAGTCTGTGGCTGAG
GTGGGCGGTACACTGCAAGAACCTCAGGCTGGGGCAGGCTGCGCACTTGGGGGGCAGGCCAAGTTCACTAA
ATGGGGGTCTCTATATGTTCAGGCCCAAGGGCCCCATTTGACAGGAGCTGGGAGCTCTGCACCAAGCTTCACTC
ACCCCGAGAGAGAGGAGGTAAACGAGGAGGCGGACTCCAGGCCCGGCCAGAGATTGGACTTGGCTGGCTTG
CAGGGGTCTTAAGAAACTCCACTCTGGACAGCGCCAGGAGGCCCTGGGTTCATTCTCACTCTGCTCAAACTG
TACATTTGGATAGCCCTAGTAGTTCCCTGGGCTGTTTTCTATAAAACGAGGCACTGGAAAAAAAAAAA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 6

MLPCASCLPGSLLWALLLLLLGSASPQDSSEPDSTECTDGYEWDPSQHCRDVNECLTTPACKGEMKCINHY
GGYLCLPRSAVINIDLHGEPPPPVFPFAQHFNPCPPGYEPDDQDSCVDVDECAQALNDCRPSQDCHNLPGSYQCT
CPDGYRKIGFPCVDIDECRYRYCQHRVCNLPFGSFRQCCEPFGQLGPNRSCVDVNECDMGAPCEQRCFNSYGTFL
CRCHQGYELHRDGFSCSDIDECYSYSLCQYRCVNEPGRFSGCHCPQGYQLLATRLQDIDECESGAHQCSAQTC
VNFHGGYRCVDINRCVBPYIQVSENRCPCASNPLCREQPSISVHRYMTITSERSVPADVFIQIATSVVPGAYNA
FQIRAGNSQDGFYIRQINNVSAMLVLARFVTGPREYVLDLEMVTMNSLMSYRASSVLRLTVFVGATTF

Signal sequence: Amino acids 1-25
N-glycosylation sites: Amino acids 198-202;394-398
N-myristoylation sites: Amino acids 76-82;145-151;182-188;
222-228;290-296;305-311;371-377;
381-387
Aspartic acid and asparagine hydroxylation sites:
140-152;177-189;217-229;258-270

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 7

GCTGCTTGCCCTGTTGATGGCAGGCTTGGCCCTGCAGCCAGGCACTGCCCTGCTGTGCTACTCCTGCAAAGCCCA
GGTGAGCAACGAGGACTGCCTGCAGGTGGAGAACTGCACCCAGCTGGGGAGCAGTGCTGGACCGCGGCATCCG
CGCAGTTGGCTCCTGACCGTCATCAGCAAGGCTGCAGCTTGAACTGCGTGGATGACTCACAGGACTACTACGT
GGGCAAGAGAACATCACGTGCTGTGACACCGACTTGTGCAAGCCAGCGGGGCCCATGCCCTGCAGCCGGCTGC
CGCCATCCTTGCCTGCTCCTGCACTCGGCCCTGCTGCTGTGGGGAACCGGCCAGCTATAGGCTTGGGGGGCCC
CGCTGCAGCCCACTGGGTGTGGTGCCCAAGGCTCTGTGCCACTCCTCACAGACCTGGGCCAGTGGGAGCCTG
TCCTGGTTCTGAGGCACATCCTAACGCAAGTCTGACCATGTATGTCTGCACCCCTGTCCCCCAACCTGACCCCTC
CCATGGCCCTCTCCAGGACTCCACCCGGCAGATCAGCTCTAGTGACACAGATCCGGCTGCAGATGGCCCTCCA
ACCTCTCTGCTGCTGTTCATGGCCAGCACTTCTCCACCTTAACCTTGTGCTCAGGCACTCTTCCCCCAGG
AAGCCTTCCCTGCCCCACCCCATCTATGACTTGAAGCCAGGTCTGTCCGTGTGTCCCCGACCCAGCAGGGAC
AAGCACTCAGAGGGGCCATTAAGGCTGAGATGAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAG
TTCTGGGAGTCTCCAGAGATGGGGCTGAGGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
AATGGCAGCCTGAGCACAGCTAGGCCCTTAATAAACACCTGTTGATAGCCAAAAAA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 8

LLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNEDECLQVENCTQLGEQCWTARIRAVGLLTVISKGCSLNCVDDSDYYV
GKKNITCCDIDL CNASGAHALQPAARAILALLPALGLLLWSPGQL

Signal sequence: Amino acids 1-16
N-glycosylation sites: Amino acids 36-40;79-83;89-93
N-myristoylation site: Amino acids 61-67
Amidation site: Amino acids 75-79

[illegible]

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 10

MPSLPAPPAPLLLLGLLLLSRPARAGPEPPVLPPIRSEKEPLPVRGAAGCTFGGKVYALDETWHPLDQPPFGVM
RCVLCAEAPQWGRRTRGPGRVSCNLIKPECPTPACGQPRQLPGHCCQTCPOERSSSERQPSGLSFEYPRDPEHR
SYSDRGEPGAERARGDGHTDFVALLTGPRSQAVARARVSLRSSLRFSISYRRLDRPTRIRFSDSNGSVLFEHP
AAPTQDGLVCGVWRAVPRLSLRLLRAEQHLHVALVTLTHPSGEVWGFLIRHRAAAETFSAILTEBGPQQGVGGI
TLTLSDTESLHFLLLFRGLLEPRSGGLTQVFLRLQILHQQLLRELQANVSAQEPGFAEVLNLTQVQEMDWLV
LGELQMALEWAGRPGLRISGHIAARKSCDVLQSVLCGADALI PVQTGAAGSASLTLLGNGSLIYQVQVVGTSSEV
VAMTLETKPQREDQRTVLCHMAGLQPGGHTAVGICPGLGARGAHMLLQNELFLNVGTRKDFPDGELRGHVAALPYC
GHSARHDTLPVPLAGALVLPFVKSAAGHAWLSLDTHCHLHYEVLLAGLGGSEQGTVTAHLLGPPGTGPPRLLK
GFYGSBAQGVVDLBPPELLRLHAKMASLMTTKSSPRGELRGQVHIANQCEVGGRLRLAAGAGVRLAGAPDTA
SAPFPVFGSLPALLAPKPGGPRPRDPTWCFEQQRPBGARWAFNYDPLCSLCTCQRRTVICDPPVCPSPSPH
PVQAFDQCCFCVCPHKQDVRDLPLGLPRSRDPGEGCYFDGDRSWRAAGTRWHFVPPFGLIKCAVCTCKGCTGEVHC
EKVQCPRLACAPFVRYNPTDCCKQCPVGSAGHPQLGDPHQADGPRGCFAGQWFFESQSWHPSVPPFGEMSCITC
RCGAGVPHCRDDCSLPLSCSGSGKESRCCSRCTAHRPPETRTDPELEKEAEGS

Signal sequence: Amino acids 1-23
N-glycosylation sites: Amino acids 217-221;351-355;365-369;
434-438
Tyrosine kinase phosphorylation sites:
Amino acids 145-153;778-786
N-myristoylation sites: Amino acids 20-26;47-53;50-56;69-75;
73-79;232-238;236-242;390-396;422-428;
473-479;477-483;483-489;489-495;573-579;
576-582;580-586;635-641;670-676;773-779;
807-813;871-877;905-911
Amidation site: Amino acids 87-91
Cell attachment sequence: Amino acids 165-168
Leucine zipper pattern: Amino acids 315-337

FIGURE 11

[illegible]

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 12

MAPARTMARARLAPAGIPAVALLWLLCTLGLQGTQAGPPPPAGLPAGADCLNSFTAGVPGFVLDTNASVSNQATF
LESPTVRRGNDVVRACCTQNCNLALVELQPDREGEDALACFLINCLVEQNFVCKFAPREGFINYLTRVYRSYR
QLRTQGGSGGIPKANAGIDLKVPQEPVLVKDVENTDWRLLRGDTPVRVERKDPNQVELWGLKEGTYLFPQLTFT
SSDHPEDTANVTVTVLSTKQTEGYCLASNKVGRCRGSFPRWYYDPTREQICKSFVYGGCLGNKNNVLEEEECILAC
RGVQGGPLRGS SGAQATFPQGSPMERHHPVCSGTCTQPTQFRCSNGCCIDSFLECDTTPNCPDASDEAAACEKYTSG
FDELQRIHFPSDKGHCVLDLPTGLCKESIPRWYNNPFSEHCARFTYGGCYGNKNNFEBEQQCLESCRGISKKDV
GLRREIPIPSTGSVEMAVTVFLVICIVVVVAILGYCFRQKQKDFHGHHPPTPASSTVSTTDETEHLVYNHT
TRPL

signal sequence: Amino acids 1-35
transmembrane domain: Amino acids 466-483
N-glycosylation sites: Amino acids 66-70;235-239;523-527
N-myristoylation sites: Amino acids 29-35;43-49;161-167;212-218;
281-287;282-288;285-291;310-316;313-319;
422-428;423-429;426-432
Cell attachment sequence: Amino acids 193-199
Pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz) family signatures:
Amino acids 278-298;419-438

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 13

AGTCGACTGGGTCCCTGTACCCGGCGCCAGCTGTGTCTCTGACCCAGAAATAACTCAGGGCTGCACCGGGCCTG
GCAGCGCTCCGCACACATTTCTGTCTCGCGCCTAAGGGAAACTGTTGGCCGCTGGGCCCGGGGGGATTCTTGG
CAGTTGGGGGGTCCGTTCGGAGCGAGGGCGGAGGGGAAGGAGGGGAAACCGGTTGGGGAGCCAGCTGTAGAG
GGCGGTGACCCGCTCCAGACACAGCTCTGCGTCTCGAGCGGACAGATCCAAAGTTGGGAGCAGCTCTGCGTGC
GGGCOCTCAGAGAAATGAGGCGGGCTTCCGCTGTGCTCTCTGACAGGCGCTCTGGCCGGGCGGGGCGGG
CGAACACCCCACTGCCGACCGTGTGCTGTGCTCGGCTCGGGGGCGCTGTACAGCCTGCACCACTACCATGAA
CGGCGAGCGCGCGAGGAGGCTGCATCTCGAGGTGGGGCGCTCAGCACCGTGCCTGGGCGCGGAGCTGG
CGCTGTCTCGCGCTCTCGCGGCGAGGCCAGGGCCCGGAGGGGGCTCCAAAGACCTGCTGTTCTGGGTGCGACT
GGAGCGCAGCGTTCACACTGCACCTTGAGAAACGAGCCTTTGGGGGTCTCTCTGGCTGTCTCGACCCCGG
CGGTCTGAAAGCGACACGCTGCAGTGGGTGGAGGAGCCCAACGCTCTCTGCACCGCGCGGAGATGCGCGTACT
CCAGGCTCACCGGTGGGTGAGCCCGCAGGCTGGAAGGAGATGCGATGCCACCTTGGCGGCCAACGGCTACTGTG
CAGTACCAAGTTTGAAGTCTTTGTCTCTCGCGCGCGCGCGGGCGCGCTTAAGTTGAGCTATCGCGCGCGCTT
CCAGCTGCAAGCGCGCTCTGAGCTTCAAGTCCAGCTGGGACCGAGGTGAGTGGCTCTGCGCGGACAGCTCCC
GATCTCAGTTACTTGCATTCGCGACGAAATCGCGCTCGCTGGGACAAACTCTCGGGCGATGTGTGTCTCTG
CCCCGGGAGTACCTCCGTGTGCTGGCAATCGCGAGCTCCCTAAGTGCCTAGACGACTTGGAGGCTTTGCGCTG
CGAATGTGTACGGGCTTCGAGCTGGGAGGAGCGCGCTCTTGTGTGACAGTGGGGAGGACGCGCGACCT
TGGGGGAGCGGGGTGCCACAGGCGCGCGCGCGCGCTGCAACAGCGCGCGTGGCGAGGACATGGCCAAAT
CAGGCTCGACGAGAGCTGGGAGGACACCACTTGTCTTGAACAGACAAATCAGTAACTATTTCTGAGAT
TCCTCGATGGGATCAGAGAGCAGATGTCTACCTTCAATGTCTTCAAGCGAGTCAAGGCGCACTATCAC
CCCATCAGGAGCGTGATTTCCAGTTTAAATCTACGACTTCTCTGCGCACTCTCAGGCTTTGACTCTCTCTC
TGCGGTGGTCTTCAATTTGTGAGCAGCAGTAGTAGTGTGTGATCTTGACCATGACAGTACTGGGGCTTGT
CAAGCTCTGCTTTCAGAAAGCGCTCTTCCAGCGCAAGGAGGAGTCTATGGGCGCGCGGCTGGAGAGTGA
TCCTGAGCGCGCTGCTTTGGGCTCCAGTTCTGCACTTGCACAAACAAATGGGTGAAGTCCGGGACTGTGATCT
GCGGGACAGAGCAGAGGTGCTTGTGCTGGCGAGTCCCTCTTGGCTCTAGTATGATAGGAAACAGGGGACA
TGGGCACTCTGTGACAGTTTTTCACTTTTGTGAGAAAGGAGACAGAGGAACTTACTTGTGTAACTGACAA
TTTCTGCAGAATCCCTTCTCTAAATCCCTTACTCCACTGAGGAGCTAAATCAGAACTGCACACTCTTTC
CTTGATGATAGGAGAGTGGAAAGTGCCTTTAGGATGTGTATCTGGGGGACCGGGTGTGCTGGGAGAGATATT
TTCTTACATTAAAAAATAATTTTACCAAAATGAAAGGAAATGTTCTATGTGTCTCAGGCTAGGAGTATATTGG
TTCGAAATCCCGGGAAAAAATAAAAAAATAAAAAATTAAGGATTGTGTAT

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 14

MRPAPALCLLWQALWPGPGGGEHPTADRAGCSASGACYSILHATMKRQAAEEACILRGGALSTVRAGAELEAVLA
LLRAGPGPGGGSKDLLFWVALEERRRSHCTLENEPLRGFSWLSDDPGGLESDTLQWVEEPQRSCTARRCAVLQATG
GVEPAGWKENRCHLRANGYLCKYQFEVLCPAPRPGAASNLRYRAPPQLHSAALDFSPPGTEVSALCRGQLPIST
CIADEIGARNDKLSGDVLCPCPGRYLRAGKCAELFNCLDDLGGFACBCTGFEFGKDGRCSTSGEGQPTLGSTG
VPTRRPPTATSPVPQRTWPIRVDEKLGETPLVPEQDNSTVTSIFEIPRWGSQSTMTLQMSLQAEKATITPSSGS
VISKFNSTTSSATPQAFDSSSAVVFIIVSTAVVVLVILTMTVLGLVKLCFHESPSQPRKESMGPPGLESDPEPA
ALGSSSAHCTNNGVKVGCCLDRDRABGALLAESPLGSSDA

Signal sequence: Amino acids 1-16
Transmembrane domain: Amino acids 397-418
N-glycosylation sites: Amino acids 189-193;381-385
Glycosaminoglycan attachment site: Amino acids 289-293
cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites:
Amino acids 98-102;434-438
N-myristoylation sites: Amino acids 30-36;35-41;58-64;59-65;
121-127;151-157;185-191;209-215;267-273;
350-356;374-380;453-459;463-469;477-483
Aspartic acid and asparagine hydroxylation site:
Amino acids 262-274

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 15

CGCTCGCCCGCTCGCCCTCGCCCTCCCGCAGAGTCCCTTCGCGGCAGCAGATGTGTGTGGGGTCAGCCACGGC
GGGGCTATGGTGAATTCGCGCGCTCACGCACTACTGGCCCTGATCCGGTCTTTGGTGCCTCGGCATCAC
CAACATAGCCATCGACTTCGGGGAGCAGGCTTGAAACGGGGCATTTGTGCTGTCAAGGAGGATGCAATCGAGAT
GCTGGCCAGCTACGGGCTGGGCTACTCCCTCATGAAGTTCTTCAAGGGTCCCATGAGTGACTTCAAAAATGTGGG
CCTGGTGTTTGTGAACAGCAAGAGAGACAGGACCAAGCCGTCCTGTATGGTGGTGGCAGGGGCCATCGTGC
CGTCTTTCACACACTGATAGCTTATAGTGATTTAGGATACATTAATCAATAAATGCAACCATGTGGACGAGTC
GGTGGGAGCAGAGACGAGAGGGCCCTTCCTGTACCTCGCCGCTTTCCCTTCATGGAGCAGATGGCATGGACCCA
TGCTGGCAITCTCTTAAAAACAAAAACAGATTTCCCTGGTGGGATGTGCTCAATCTCAGATGTGCATAGCTCAGGT
TGTTTTGTAGCCATTTGTCTTCAGAGTCACTGTGAATGCCGGAGCCCTGCTCATCCGATCCTCTCTTGTGA
CATGGGCGCATTTGTGCTGCACACCTGTGCTGGCTACTACAGAACTTCAAGCACTCATCCCTGACAG
AATGGCCCGGAGCTGGGGGAGATGCAACCAATAGAAAGATGCTGAGCTTCTGTGGCTTTGGCTCTAATTC
GGCCACACAGAGATCAGTCCGCTTATGCTCAACCTCTTTGTTCGCGGACCTTGGTGGCAGTCTCTGCAGCCAC
AGAGCAGTGGCGATTTTGAACGCCACATACCTGTGGGTCAATGCCATACGCTGGTTGACGGAAATCCGTGC
TGTGTATCTCGCTTTCGACAGAAATAACCCAGCAACAAGCTGGTGGCCAGGCAACACAGTCAAGGACGCCA
CATCAAGAAATTCACCTTCGTCTGCATGGCTCTGTCACTCAGCTCTGTTCGTGATGTTTTGGACACCAACGT
GTCTGAGAAATCTTGATAGACATTCGAGTGGGCTTTCGCTTTGCAGAACTCTGTGTGTCTCTTTTCGGAT
CTTCTCTCTTCTCCAGTTCAGTCAAGTGAAGGGCATCTCACCGGGTGGCTGATGACACTGAAGAAACCTT
CGTCTTGGCCCCAGCTCTGTGCTGCGGATCATGCTCCTCATCGCCAGCCCTGTTGGTCTTACCTTACCTGGGGT
GCACGGTGGACCTGGGCTGGCTCCCTCTGGCGGGCTTTGTGGGAGAAATCCACATGGTGGCCATCGCTGC
GTCTATGTCTACCGGAAGCAGAAAGAAAGATGGAGATGAGTGGCCACGGAGGGGAGAGCTTCGCCATGAC
AGACATGCTCCGACAGAGGAGGTGACAGACATCGTGGAAATGAGAGAGGAGAAATGAATAGGCAAGGGAGGCCA
TGGGCACTGCAAGGAGCGCTCAGTCAAGATGACACTTCGGCATCATCTCTCCCTCTCCATCGTATTTGTTCCTC
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTATGAAGAGGCTTGATTAAGGTTTCGTGTCAATTTCTAGCATACTGGGT
ATGCTCAACTGACGGGGGAGCTTAGTGAATGCTTTTACTGTGTGATGAAGAAACAAACGAAACACTGACTT
CATACCCCTGCTCAGCAAAACCTCAAGACACAGCTGCTCAGGTTGACCTTGTGTCTCTCTCCCTGGGCAA
TCTCTCTTTGGAACCAAGGACTGACGCTGTGCCATCGCCCTCGCTTCACTGCAAGCAGGAGCCACAGACTCTC
CTGTCCCTCTCATCGCTCTTAAGAAATCAACAGGTTAAAGCTCGGCTTCCTTTGATTGTCTCCAGTCAATGG
CGGTCAAGAGATGGAGCCCGGTGGCTCTTAAATTTCCCTTCTGCCAGGATTCGAAACCATCTACTCCAC
ACATGCAAGAGGGCGGTGGCAGCTGACGCTCGAGCCCGGAGTCCCGTTCACTGAGGAGCGGAGACCTGTGACCAAG
CAGGCTGACAGATGGACAGAAATCCCGTAGAAAGGTTTGGTTGAATGCCCGGGGGCAGCAAACTGACATGG
TTGATGATAGATTTCACTCTGCTGTCTCTAGATCTGAGCAAGCTGTGAGTTCTCAGCCCCACCGTGTATATA
CATGAGCTAAGTTTTTAAATTTGTACAAAAGCGCATCTCCAGATTCAGAGCCCTGCGCATGACTTTTCCTGAA
GGCTTGCTTTTCCCTCGCCCTTCTGAAGGTGCGATTAGAGCGAGTCAATGGAGCATCTTAATTTGTGATTTTA
GTTTTTACAGTGAAGCTTAAGTCTCATCCAGCATTTCAATGCCAGGTTGCTGTAGGTAACCTTTGAAG
TAGATATATTAATGCTTCTGCTATCTTACTCATTAATCTGCGTACAGGTAATGAGATGATCTAGTACT
TCCCTCCCAACCAATGAGTAAGCAAGACATTTTAAAGATACCAAGATCACTATGTGTCTTCCCTGAAATA
ACCATTCGAATCCATGCAAGTCAATATTTTCTAGTTTGGAAAGCAGGTTTTTCTCTTTAAZAAAAATTA
TAGAACGGTCTCAATTAATGATTTAGTCAGAAATCTAGACTGAAGAACCTAAACAAAAATATTTTAAAG
TATAAATATATGCTGTATATGTTATTTATTTTAGGCTATAATACATTTCTATTTTCGATTTTCAATAA
AATGCTCTATAACAAAAA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 16

MVKFPALTHYWLIRFLVPLGITNIAIDFGEQALNRGIAVKEDAVEMLASYGLAYSLMKFTGPMDFKNVGLV
FVNSKRDRTKAVLCMVVAGIAAVFHTLIAYSIDLGYIINKLHHVDES VGSKTRRAFLYLAAFFPMDAMANTHAG
ILLKHKYSFLVGCASISDVIAQVVFVAILLHSHLECREPLIPILSLYMGALVRCTTLCLGYKNIHDIIPDRSG
PELGGDATIRKMLSPWWPLALILATQRIISRFIVNLFSVRDLGGSSAATRAVALITATYPVGHMPYGLTEIRAVY
PAFDKNNPSNKLVSNTNTAAHIKKFTFVCMALSLTLCFVMFWTFNVSEKILIDIIIGVDFAPALCVVPLRIFS
FFFVPVTVRAHLTGWMLTKKTFVLA PSSVLR IIVLTASLVVLPYLG VHGATLGVGSLLAGFVGESTMVAIAACY
VYRKQKKMBNSATEGEDSAMTDMPPTEEVTDIVEMREENE

transmembrane domains: Amino acids 86-105;162-178;327-345;
359-374;403-423

N-glycosylation sites: Amino acids 347-351;461-465

cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site:
Amino acids 325-329

N-myristoylation sites: Amino acids 53-59;94-100;229-235;
267-273;268-274;358-364;422-428;
425-431;431-437

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 17

CCCACGGCTCCGCGGACGCGTGGGAAGGSCAGAATGGGACTCCAGCCTGCCTCCTAGGGCTCTTTGCCCTCATC
CTCTCTGGCAATGCAGTTACAGCCCGGAGCCCGACCGAGCGGAGGACGCTGCCCCAGGCTGGGTGTCCCTGGGCGGT
GGGGACCTTGAGGAAGAGCTGAGTCTCACCCTTTGCCCTGAGACAGCAGAAATGTGAAAGACTCTCGGAGCTGGTG
CAGGCTGTGTGGATCCGAGCTCTCTCAATACGGAATACTGACCTAGAGAAATGTGGCTGATCTGGTGAGG
CCATCCCACTGACCTCCACACGGGTGCAAAAATGGCTCTTGGCAGCCGAGGCCAGAAAGTGCATCTCTGTGATC
ACACAGGACTTTCTGACTTGTCTGGCTGAGCATCCGACAGCAGAGCTGCTGCTCCCTGGGGCTGAGTTTCATCAC
TATGTGGGAGGACCTACGGAAACCCATGTTGTAAAGTCCCCACATCCCTACCGCTTCCACAGGCTTGGCCCCC
CATGTGGACTTTGTGGGGGGACTGCACCGTTTTTCCCCAACATCCTCCTGAGGCAACGTCCTGAGCCGCGAGGTG
ACAGGACTGTAGGCTGTGCATCTGGGGGTAAACCCCTCTGTGATCCGTAAAGCGATACAACTTGACCTCACAAAGAC
GTGGGCTCTGGGACCCAGCAATAACAGCCAGCCTGTGCCAGTTCCTGGAGCAGTATTTCCATGACTCAGACCTG
GCTCAGTTTCAAGCCCTTTCTGGTGGCACTTTGGCACTCAGGCACTAGTAGCCCTGTGGTTGGACACAGGGC
CGGGCCGGGCCCGGATTTGAGGCCAGTCTAGATGTGCAGTACCTGATGAGTGTGGTGCACATCTCCACCTGG
GTCTACAGTAGCCTTGGCCGCGCATGAGGGACAGGAGCCCTTCTGCAGTGGCTCATGTCTGTCAGTATGAGTCA
GCCTTGCCACATGTGCATACTGTGAGCTATGAGAGATGATGAGGACTCCCTCAGCAGCGCTCATCTCAGCCGGTCA
AACACTGAGCTCATGAAGGCTGCCGCTCGGGGTCTCACCTGCTCTTCCCTCAGGTGACAGTGGGGCCGGGTGT
TGGTCTGTCTCTGGAAGACACCACTTCGGCCCTAOCCTCCCTGCCCTCAGCCCTATGTCAACACAGTGGGAGGC
ACATCCTTCCAGGAACCTTTCCCTCATCACAAATGAAATTTGACTATATCAGTGGTGGTGTTCAGCAATGTG
TTCCACGGCCTTCTATACAGGAGGAGCTGTAAAGAGTTCTGAGCTCTAGCCCCCACCCTGCCACCATCCAGT
TACTTCAATGCCAGTGGCCGTGCTACCCAGATGTGGCTGCACTTTCTGATGGCTACTGGGTGGTCAAGCAACAGA
GTGCCCATTCATGGGTGTCCGGAACCTCGGCCCTACTCCAGTGTTTGGGGGGATCCTATCCTTGATCAATGAG
CACAGGATCCTTAGTGGCGCCCCCTCTTGGCTTTCTCAACCAAGGCTCTACAGCAGCATGGGGCAGGTCTC
TTTGATGTAACCCGTGGCTGCCATGAGTCTGTCTGATGAAGAGGTAGAGGGCCAGGGTTTCGCTCTGGTCTCT
GGCTGGGATCTGTACAGGCTGGGGAACCACTTCCAGCTTTGCTGAAGACTCTACTCAACCCCTGACCT
TTCTATCAGAGAGATGGCTGTGCCCTGGCCGAGCTGGCACTTCACTCCCTTATTTGCTGCTGTGGAGGC
CTGTGGAACCTCAACTATTGACTGCTGCAGACAGCTTATCTCCCTAACCTCGAAATGTGTGAGCTTGAATG
ACTCCCAACCTCAACATGCTCCATCATCTCAGGTCTCCCTACTCCCTGAGATTCTCAATAGAGTGTGTA
ACTAGCAATTTTGAATGCTCTCCCTCCGCACTCTCATTTCTCTTTCAATCAGGCTTTTCCAAAGGTTGTA
TACAGACTCTGTGCACTATTTCATTGTATATTCACTCCCAATTCACTGCAAGGAGACTTACTGTACCGTTT
ACTCTTCTACCCCTGACATCCAGAAACAATGGCCCTCAGTGCATATCTCAATCTTTGCTTTATGGCCTTTCC
ATCATAGTTGGCCACTCCCTCTCTTACTTAGCTTCCAGTCTTAACTTCTCTGACTACTCTTGTCTTCTCTCT
CATCAATTTCTGCTTCTCATGGAATGCTGACCTTCATTGCTCATTGTAGATTTTGTCTTCTCTCAGTTTACT
CATTGTCCCTGGACAAATCACTGACATCTACAACCATTAACATCTCACTAATAAGACTTTCTATCCAATAAT
GATTGATACCTCAAAATGTAATAA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 18

MGLQACLLGLFALILSGKCSYSPEDQRETLPPGWVSLGRADPEEELSLFFALRQQNVERLSSELVQAVSDPSSPQ
YGKYLTLLENVADLVRPSPLTLHTVQKWLAAAGAKCHSVITQDFTLCHLSIRQAEILLPGAFFHYVGGPTETHV
VRSPHPYQLPQALAPHVDVFGGLHRFPPTSSLRQRPEPQVTGTGVLHLGVTPSVIRKRYNLTSQDVGSSTNNISQ
ACAQFLQYFHDSDLAQFMRLFGGNFAHQASVARVVGQGRGAGIEASLDVQVILMSAGANISTWVYSSPGRHESQ
QEPFLQNLMLLSNESALPHVHTVSYGDDDSLSSAYIQRVNTELMKAAARGLTLLFASGDSGAGCWSVSGRHQFR
PTFFASSFYVTTVGGTSFQEPFLITNEIVDYISGGGFSNVFPRPSYQBEAVTKFLSSSPHLPSSSYFNASGRAYP
DVAALSDGYVWVSNRVPVWVSGTSASTPVFGGILSLINEHRLSGRPPLGFLNPRLYQQHGAGLFDVTRGCHES
CLDEEVEGQGFCSGPGWDPVTGWGTPTSQLC

signal sequence: Amino acids 1-16
N-glycosylation sites: Amino acids 210-214;222-226;286-290;
313-317;443-447
Glycosaminoglycan attachment sites: Amino acids 361-365;408-412;538-542
N-myristoylation sites: Amino acids 2-8;107-113;195-201;199-205;
217-223;219-225;248-254;270-276;284-290;
409-415;410-416;473-479;482-488;521-527;
533-539;549-555

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 19

GCAGTATTGAGTTTACTTCTCTCTTTTGTAGTGAAGACAGACCAATAATCCAGTGTGAGTGAATTGAATTGT
TTCAITTTATTACCGTTTGGCTGGGGGTAGTTCCGACACCTTCAAGTTGAAGAGCAGGAGAGGAGTTGTGA
AGACAGGACAATCTTTTGGGATGCTGGTCTTGAAGCCAGCGGGCTTGGCTCTGTCTTTGGCTTATTGACCC
CAGGTTCTTGGTTAAACCTGAAAGCCTACTACTGGCTGGTCCCATCAATCCATTGATCTTGAGGCTGTGCC
CTTGGGACACCCACTGGCAGGGCTACCACTGCGACTGAGTCCCTGTGGCTCTGTCTGGGACAGCGCTTC
CCCTCATCTTGGGCTGTCTTGGGCTGAGCCTGAGCCTCTGGGGTTTCTGGATCCAGGGGAGGAGAGAT
CCCTGTGTGAGGCTGTAGGGGAGGAGGAGGACACAGATCCAGATTCGAGAGCTCGGCTAGACCAAGTGT
GAGACTTCAAAACCCCGATTGTCCCTACTACAGGACCCCAACAGCCCTACAGAGAGGTGTCTAGGACTCGG
TACATCCAGACAGAGCTGGGCTCCCGTGAAGCGTTGTGGTGGCTGTCTGACCTCCGAGCTACACTGTCCACT
TTGGCCGTGTGTGAACCGTACGGTGGCCCATCACTTCCCTCGGTACTCTACTTCACTGGGACAGCGGGGGCC
CGGCTCCAGCAGGAGTGCAGGTGGTGTCTCATGGGATGAGCGGCCCGCTGGCTCATGTGAGAGACCTTGGCC
CACTTTCACACACCTTTGGGCGGACTACGACTGGTTCTCATGTGAGAGTGAACATATGTGACGCGCC
CGCTTGGCAGCCCTTGTGGCCACTCAGCATCAACCAAGACCTGTACTTAGGCGGACAGAGAGTTCAITGGC
GCAGCGAGAGCGCCCGTACTGTCTATGGGGCTTTGGCTACCTGTGTCAAGAGTGTCTTCTGTCTGTGG
CCCATCTGGATGCTGCGGAGGAGACATCTCAGTGGCCCTCTGAGAGAGTGGCTTGGACGCTGCCCTCATGAC
TCTCTGGGCGCTGGCTGTGTCTCACAGACCCAGGGGACAGTATCGCTCATTTGAACCTGGCCAAAATAGGGAC
CCTGAGAAGGAGAGCTCGGCTTCTCTGAGTGGCTTGGCGGTGACCCCTGTCTCGAGGATACCTCATGTAC
CGGCTCCACAAAGCTTTCAGCGCTCTGAGTGGAGCGGGCTTACAGTGAATAGAACAACTGAGGCTCAGATC
CGGACCTGACCTGTCTGACCCCGAAGGGAGGAGCGGCTGAGCTGGCCCGTGGGCTCCCTCTCTTTCACA
CCACACTCTCGCTTGTAGGTGTGGCTGGCTGGACTACTTCAAGAGCAGCAACCTTCTCTGTGAGATGGGGCT
CCCAAGTCCCACTACAGGGGCTAGCAGGCGGACGTGGGTGATCGCTTGGAGACTGCCCTGGAGCAGCTCAAT
CGGCGCTATCAGCCCGCTGGCTTCCAGAGCAGCGACTGCTCAAGGCTATCGGGCTTCCAGCCAGCAGG
GGCATGGATACACCTTGGACCTGTGTGGAAATGTGTGACACAGCGTGGGACCGGGCGGCTTGGCTCGCAGG
GTCAAGCTGTGGCGCACTGAGCGCGGTGGAAATCTACTATGCCCTATGTCTAGGCGCAACCGAGTGGAG
CTGGTGTGCACTCTGTGTGTGAGTGTGTGAGCGCGCTTCTCGAGGCGTTTGAAGCAGATGTCTGTG
GAGCCAGAGAACATGCTATGTCTACCTGTGTGTGTCTACGGGCAAGAGAGGTGGCGTGGAGCTCCAGAC
CCATTTCTTGGGCTGAAGGCTCAGCAGCGAGGTAGAGCGAGGTACCTTGGGACAGGCTGGCTTGGCTGTG
GTGGAGCAGAGGCGCTTCCAGGTGAGCTCATGAGCGTGTCTCGAAGAGCAGCTGTGAGCACTCTCTTC
TTCTTACACCGTGTGAGACAGGCTGGGCGGAGTCTCAACCGCTGTGAGATGATGCTCTCTGTGGCTGG
CAGGCTTCTTTCAGTCAATTTCCAGGATTTCAATCTGCCCTGTCAACACAGAGATCACCCAGGGCGCCCG
GGGCTGGCCCTGACCCCGCTCCCTCTGTGTGTGACCCCTCCGGGGGCTCTATAGGGGGAGATTGTGAC
CGGCGGCTTCTGTGAGGGCTGTCTTCAACAGCTGACTACTGGCGGCGGAGCGGCTGGCAGGTGAATG
GCAGGCCAGAGAGAGGAGGAGCCCTGAGGGGCTGAGGTGATGATGTTTCTCCGCTTCTCAGGGCTCCAC
CTCTTTGGGCGGTAGAGCCAGGGCTGGTGCAGAGTTCTCCCTGCGAGACTGCAGCCCAAGGCTCAGTGAAGAA
CTCTACCAAGCTGGCGCTCAGCAACCTGGAGGGGCTAGGGGCGGTGGCCAGCTGGCTATGGCTCTTTTGA
CAGAGCAGGCGCAATAGCACTTACCCGCTGGGGGCGCTAACCTCATTAACCTTCTTGTCTGCTCAGCGCC
AGGAGGGCAGGGCAGATGGTGGACAGATAGAGAAATGTGTGTGTATTTTAAATATGAAATGTATTAAG
ATGTCTCTGCGC

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 20

MRLSSLLALLRPALPLILGLSLGCSLSLLRVSWIQGEGRDPCVEAVGERGGPQNPDSRARLDQSDDEDFKPRIVPY
YRDPNPKPYKKVLRTFYIQTGLGSRERLLVAVLTSRATLSTLAVAVNRTVAHHFPRLLYFTQQRGARAPAGMQVVS
HGDERPAWLMNSRTLRLHLTHFGADYDWFPIQDDTYVQAPRLAALAGHLSINODLYLGRAERTIGAGEQARYCHG
GFGYLLSRSLLLRLRLPHLDGCRGDIILSARPDWLGRCCLIDSLGVGCVSQHQGQYRSLFELAKNRDPEKEGSSAFL
SAFAVHPVSEGTLMYRLHKKRPSALELSEAYSEIEQLQAIIRNLTVLTPGEAGLSWPFVGLPAPFTPHSRFEVLGW
DYFTEQHTFSCADGAPKCPLOGASRADVGDALTEQLNRRYQPRLRFPQKQRLNGYRRFDFARGMEYTLDDL
ECVTQRGHRRALARRVSLRLPLSRVEILFMPVVTETATRVQLVLPFLVABAAAAAPFLFAFANVLEPREHALLTL
LLVYGPREGGRGADDPFLGVKAAAALERRYPGTRLAWLAVRAEAPSOVRIMDVVSKKHPVDTLFFLTTVWTRPG
PEVLNRCRMNAISGWQAFPPVHFQEFNPALSPQRSPGPPGAGEDPPSPGADPSRGAPIGGRFDRQASABGCFY
NADYLAARARLAGELAGQEBEBEALGLEVMDFLRFSGLHLFRAVEPGLVQKFSLRDCSPRLSEELYHRCRLSNL
EGLGGRAQLAMALFEQEQA NST

signal sequence: Amino acids 1-15
Transmembrane domain: Amino acids 489-510
N-glycosylation sites: Amino acids 121-125;342-346
cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites:
Amino acids 319-323;464-468
Tyrosine kinase phosphorylation site:
Amino acids 736-743
N-myristoylation sites: Amino acids 19-25;23-29;136-142;397-403;
441-447;544-550;558-564;651-657;657-663;
672-678
Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site:
Amino acids 14-25
Cell attachment sequence: Amino acids 247-250

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 21

GCGGGCCGCGAGTCCGAGACCTGTCCAGGAGCTCCAGCTCACGTGACCTGTCACTGCCTCCCGCCGCTCCTG
CCCGGCGCAGACCCAGCCGGTGCCCGGCTCTCCGTGCCCCGCGGCTGGCCCTGGGCTCAGCCGCACTGGGG
CCGCTTCGCGCAGCTGCGCTCTTCTGGGGAGGCGGTGCCCCCATGGCGAGCCGCGAGAGCAGTGCCTGCTTC
CCCCGAGGACAGCCGCTGTGGCAGTATCTTCTGAGCCGCTCCATGGCGAGCACCCGCGCTGCGAAGCCTGA
GGCTGTGAACCTGGAGCAGCCGCGAGGGGATTCTATGATGACCTGCGAGCAGGCCAGCTCTTGGCCAACTGG
CGCGCTCATCCAGGCCAGAGGGCGTGGACCTGGGCACCTTCAAGGCTACTCCGCCCTGGCCCTGGCCCTGG
CGCTGCCCGCGACGCGCGCGTGGTGAACCTGCGAGGTGACGCGCAGCCCGGAGCTGGGAAGGCCCTGTGGA
GGCAGGCCGAGGCGAGCACAGATCGACCTCCGCGTGAAGCCCGCTTGGAGACCTGGACAGCTGCTGGCGG
CGGCGAGGCCGCGCACTTCGAGCTGCGCGTGGTGGATGCGGACAGGAGAACTGCTCCGCTACTACGAGCGCT
GCTTCAGCTGCTGCGACCCGAGGCACTCCTGCGCTCCTCAGAGTCTGTGGCGGGGAGGTGCTGCAACCTC
CGAAGGGGAGCTGGCGCGCGAGTGTGTGCGAAACCTAAACGAAAGCATCCGGCGGGACGTCAAGGCTTACATCA
GCCTCCTGCCCCCTGGCGATGGACTCACCTTGGCCCTTCAAGATCTAGGGCTGGCCCTAAGTGAATGGCTCGAGG
GAGGCTGCTGGGAAACCCAGGAATTGACCTGAGTTTAAATTCGAAATAAAGTGGGCTGGGACACAAAA
AAAAAAAAAAAA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 22

MTOPVPRLSVPAAALGSAALGAAPATGLFLGRRCPPWRGRREQCILPPEDSRLWQYLLSRSMRHPALRSRLRL
TLEQPGQDSMMTCQQAQLLANLARLIQAKKALDLGTFYGYSALALALFADGRVVTCEVDAQPPELGRPLWRQA
BAEHKIDRLKPALETLDDELLAAGEAGTFDVAVVDADKENC SAYYERCLQLLRPGGILAVLRVLRGKVLQPPKG
DVAECVRNLNERIRRDVRVYISLLPLGDGLTLAFKI

Signal peptide: Amino acids 1-25
Transmembrane domains: Amino acids 8-30;109-130
N-glycosylation site: Amino acids 190 -194
Tyrosine kinase phosphorylation site: Amino acids 238-247
N-myristoylation sites: Amino acids 22-28;28-34;110-116;205-211;
255-261
Amidation sites: Amino acids 31-35;39-43

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 23

GC GGCCGCGTTCGACCGGGCCCTGCGGGCGCGGGGCTGAAGGCGGAACCAAGACGGGCAGAGAGCACGGAGCCGGG
AAGCCCTGGGCGCCCGTCGGAGGGCTATGAGCAGCGGCCGCGGGCTGCGGGCGGTGGCGGCGGGCGCTCCTC
CTGGTGTCTGCGGGGCGCCGGCCAGGGCGGCACCTCGTAGCCCAAGTGTGACTGTGCGCGTGACTTCCACAAG
AAGATTGCTCTGTTTGTGTGAGAGGCTGCCAGCGGGCACTACCTGAAGGCCCTTGCCAGGAGCCCTGCGGC
AAGTCCACCTGCTTGTGTGTCCCAAGACACCTTCTTGGCTGGGAGAACCAACATTAATTCGATGTGCCCCG
TGCCAGGCTGTGATGAGCAGGCTCCAGGTGGGCTGGAGAACTGTTCAAGCAGTGGCGGACACCCGCTGTGGC
TGTAGCCAGGCTGTTTGTGGAGTGCCAGGTGAGCCAAATGTGTCAAGCAGTTACCCCTTCTACTGCCAACCATGC
CTAGACTGCGGGGCCCTGACCGCCACACAGGCTACTCTGTTCGCGCAGAGATACTGACTGTGGGACCTGCCTG
CCTGGCTTCTATGAACATGCGGATGGCTGCTGTCTGCTGCCCGCAGGACCCCTGGGAGCTGTCCAGAGCGCTGT
GCGCTGTCTGTGGCTGGAGGAGATGTTCTGGGTCCAGGTGCTCTGGCTGGCTTGTGTCCCCCTCTGCTT
GGGGCCACCTGACCTACACATACCGCACTGCTGGCTTCAAGCCCTGGGTACTGAGATGAGCTGGGATG
GAGGCTCTGACCCCAACCGGCCACCCACTCTGTCACTTGGACAGCGCCACACCTTCTAGCACCTCTGAC
AGCAGTGAGAGATCTGCACCTCCAGTTGGTGGTAAACAGTGGACCCCTGGCTACCCGAGACCCAGGAGGCG
CTCTGCCCGAGGTGACATGGTCTGGGACCAAGTTGCCAGCAGAGCTCTTGGCCCGCTGCTGCGCCACACTC
TCGCCAGAGTCCCCAGCGGCTGCCAGCCATGATGCTGCAGCGGGCCCGCAGCTTACGACGTGATGGACGCG
GTCCACGCGCGCTGGAAGGAGTTCTGTGCGCACTGGGCTGCGCGAGGACAGATCGAAGCCGTGGAGGTG
GAGATCGCGCTTCCGAGACCAAGCAGTACGAGATGCTCAAGCGCTGGCGCCAGCAGCCCGCGGCTCGGA
GCGGTTTACGCGCCCTGGAGCGATGGGCTGGAAGCTGCTGGAAGCTTGGCGCAGCGCCCTGAGCGCGCCCG
TGAACGCGCGCCACTTGCCACTAGCGCTCTGCTGGCCCTTGCAGAGCCCTTAACTACGCTTACTTATGCGTG
TAGACATTTTATGTACTTATTAGCCGCTGGCACGGCCCTGGTAGCAGCACAGCGCGGCCCAACCCCTGCTGCG
CCCTATGCTCCAGCCAAAGCGAAGAGCAAGAAAGATGTGAGAGGGGGTGAAGACATTCTCAACTTCTCGG
CCGAGTTTGGCTGAGATCGCGGTATTAAATCTGTGAAGAAAAACAAAAAAGTCTGAC
GCGGCCCG

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 24

MEQRPRGCAAVAAALLLVLLGARAQGGTSPRCDCAGDFHKKIGLFCCRCPCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQ
DTFLAWENHNHNSRCARCCQACDBQASQVALNENCSAVADTRCGCKPGWFVRCQVSCVSSSPFYCQPCLDGALHRH
TRLCSRRDTCGTCLPGFYEHGDCVSCPTSTLGSCEPCAAVCGWRQMFVQVLLAGLVVPLLLGATLTYTYR
HCNPHKPLVTADDEAGMEALTTPPPATHLSPLDSHTLLAPDSSEKICTVQLVGNSTPGYPETQEQALCPQVTSW
DQLPSRALGPAAAPTLSPEPAGSPAMMLQPGPQLYDMDAVPARRWKEFVRTLGLREAEIEAVEVEIGRFRDQQ
YEMLEKRWQQPAGLGAUYAALERMGLDGCVEDLSRLQRGP

Signal sequence: Amino acids 1-24
Transmembrane domain: Amino acids 199-219
N-glycosylation sites: Amino acids 67-71;106-110
cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site:
Amino acids 157-161
Tyrosine kinase phosphorylation site:
Amino acids 370-377
N-myristoylation sites: Amino acids 44-50;50-56;66-72;116-122;
217-223;355-361;391-397;401-407
Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site:
Amino acids 177-188

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 25

GTCAATGCGAGTGCCTGCTCTGTGCCTGCTCTGGGCCCTGGCAATGATGACCCGGCCTGCCTCAGCGGCCCCCATG
GGCGGCCCGAATCTGGCACAGCATGAGGAGCTGACCCCTGCTCTTCCATGGGACCCCTGCAGCTGGGCCAGGCCCTC
AACGGTGTGTACAGGACCAAGGAGGACGGCTGACAAAGGCCAGGAACAGCCTGGGTCTCTATGGCCGACAAATA
GAACTCCTGGGGCAGGAGGTCAAGCCGGGGCCGGGATGCAGGCCAGGAACCTCGGGCAAGCCTGTTGGAGACTCAG
ATGGAGGAGGATATCTGTCAGCTGCAGGCAAGGCCACAGCTGAGGTGCTGGGGGAGGTGSCCAAGGACAGGAG
GTGCTACGGGACAGCCTGCAGCGCTAGAACTCCAGCTGAGGAGCGCCTGGCTGGGCCCTGCCCTACCGAGAAATTT
GAGGTCTTAAAGGCTCAGCTGACAGCAGAGGCCATCCTATGGGCCCTCAGAGGCCACGTGCAGCGGAGAGG
CGGGAGATGTTGGCACAGCAGCATCGGCTGCGACAGATCCAGGAGAGACTCCACACAGCGGCGCTCCAGGCCTga
ATCTGCCTGGATGGAACTGAGGACCAATCATGCTGCAAGGAACACTTCCACGCCCCGTGAGGGCCCTGTGCAGGG
AGGAGCTGCCCTGTTCACTGGGATCAGCCAGGGCGCCGGGCCCACTTCTGAGCACAGAGCAGAGACAGACCGCAGG
CGGGGACAAAGGCAGAGGATGTAGCCCATTTGGGGAGGGTGGAGGAGGACATGTACCTTTTCATGCCTACACA
CCCTCATTAAGCAGAGTCTGTGGCATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 26

MPVPALCLLWALAMVTRPASAAAPMGGPRLAQHEELTLLFHGTLQLGQALNGVYRTTEGRLTKARNSLGLYGRTIE
LLGQEVSRGRDAAQELRASLLETQMEEDILQLQAEATAEVLGEVAAQKVLKRDVQRLEVLRSANLGPAYREFE
VLKAHADKQSHILWALTCHVQRREMVAQQHRLRQIQERLHTAALPA

Signal peptide: Amino acids 1-21

N-myristoylation sites: Amino acids 46-52;51-57;78-84

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 27

GCGAGGACCGGGTATAAGAGCCTCGTGGCCTTGCCCGGGCAGCCGAGGTTCGCCGCGCGCCCCGAGCCCCCGGCC
ATGAAGCTGCGCCCTCCTGGGGCTCTGCGTGGCCCTGTCTGCAAGCTCGCTGCTTTCTTAGTGGGCTCG
GCCAAGCCTGTGGCCAGCCTGCTGCTGCGCTGAGTCGCGCGGAGGCGGGGCGGGACCTTGGCCAAACCC
CTCGGACCCCTCAACCGCTGAAGCTCCTGCTGAGCAGCTGGGCATCCCCGTGAACCACTCATAGAGGGCTCC
CAGAACTGTGTGGCTGAGCTGGGTCCCGAGCCGTGGGGCCGTGAAGGCCCTGAAGGCCCTGCTGGGGGGCTTG
ACAAGTGTGGTGAAGCCGAGACTGGAGCATCTACACCTGAGGACAAGACGCTGCCACCCGCGAGGGCTGAAA
CCCCGCGCGGGGAGGACCGTCCATCCCTTCCCCCGCCCTCTCAATAAACGTGGTTAAGAGCAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 28

MKLAALLGLCVALLSCSSAAFLVGSAPVAPVVALESAAEAGAGTLANPLGTINPLKLLSSLGIPVNHLEGS
QKCVAEELGPQAVGAVKALKALLGALTTFG

Signal peptide: Amino acids 1-18
N-myristoylation sites: Amino acids 8-14;65-71;74-80;88-94
Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site:
Amino acids 5-16

FIGURE 29

[illegible]

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 30

MLVTAYLAFVGLLASCLGLELSRCRAKPPGRACSNPSFLRFOLDIFYQVYFLALAADWLQAPYLYKLYOHYYFLEG
QIAILYVCGLASTVLFGLVASSLVNGLGRKNSCVLFSLTYSLCCLTKLSQDYFVLLVGRALGGLSTALLFSAFEA
WYIHEHVERHDFPAEWIPATFARAAPFNNHVLAVVAGVAEAVASWIGLGPVAPFVAIPLLAGALALRNWGEN
YDRQRAFSTRCAGGLRCLSDRRVLLGTIQALFESVIFIFVFLWTPVLDPHGAPLGIIFSSFMAASLLGSSLYR
IATSKRYHLQPMHLLSLAVLIVVFSLFMLTFSTSPQBSFVESPFIAPLLIELACGLYFPMSFLRRKVIPEBQA
GVLNWFRVPLHSLACLGLLVLDSDRKTGTRNMFISCSAVMMALLAVVGLEFVVRHDAELRVPSPTERYAPEL

Signal peptide: Amino acids 1-18
Transmembrane domains: Amino acids 41-55;75-94;127-143;191-213;
249-270;278-299;314-330;343-359;379-394;
410-430
cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site:
Amino acids 104-108
N-myristoylation sites: Amino acids 11-17;18-24;84-90;92-98;
137-143;138-144;238-244;253-259;278-284;
282-288
Amidation site: Amino acids 102-106
Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site:
Amino acids 6-17

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 31

CCAGCTGCAGAGAGGAGGAGGTGAGCTGCAGAGAAAGGAGGTTGGTGTGGAGCACAGGCAGCACCGAGCCTGCC
CCGTGAGCTGAGGGCCGTGAGTCTGCCGCTGGAATCAGGATAGACACCAAGGCAGGACCCCCAGAGATGCTGAAG
CCTCTTTGGAAGCAGCAGTGGCCCCACATGGCCATGCTCCAAGCCGCCCCGCGCCCGTGGAGCAGAGAGGCT
GGCAGCTTGCAAGTCTCTGGAGCGCTGGCTGTCTGTGGCTGGGCTCCGCTGGCTCTTATCTGCCCTCTGTGGCAA
GTGCCCGCTCCTCCACCTGGGGCCAGGTGCAGCCCAAGGACGTGCCAGGTCTGGGAGCATGGCTCCAGCCCA
GCTTGGGAGCCCCGTGAAGCAGAGGCCAGGCAGCAGAGGGAACCTCTGCCAGCTTGTCTTGTGGAAGCATCCCC
CAGGACCTGCCATCTGCAGCCGGCAGCCCCCTCTGCCAGCCTCTGGGCCAGGCTGGCTGCAGCTGTGGACACT
GCCCAGGAGAGCGTCCACGTGGCTTCATACTACTGGTCCCTCACAGGGCCTGACATGGGGGTCAACGACTCGTCT
TCCCAGCTGGGAGAGGCTCTTCTGCAGAGCTGCAGCAGCTGCTGGGCAGGAAACATTTCCCTGGCTGTGGCCACC
AGCAGCCCCGACACTGACCAGGACATCCACCCGACTGCAGGTTCTGGCTGCCCGAGGTGCCCATGTACGACAGGTG
CCCATGGGGCGGCTCACCGGGGTGTTTTGCACTCCAAATTCGGGTTGTGGATGGAGCGGACATATACATGGGC
AGTCCCAAGATGGACTGGCGGCTCTGACGCAAGTGAAGGAGCTTGGCGCTGTCACTATATACAGCCACTG
GCCAAGACCTGGAGAAAGCCTTCCAGACCTACTGGGTACTGGGGTGGCCAAAGGCTGTCTCCCCAAAACCTGG
CCTCAGAACTTCTCATCTCACITCAACCGTTTCCAGGCCCTTCCACGGCTCTTTGATGGGGTGCCACCACTGCC
TACTTCTCAGCGTCCGCCACGACACTCTGCTCCAGGGCCGCAACCGGACCTGGAGGCGGTGCTGGCGGTGATG
GGGAGCGCCAGAGGTTTATCTATGCTTCCGTGATGGAGTATTTCCCAACCAACGGGCTTACAGCCACCCCGAGG
TACTGGCGGTGCTGGACAAACGGCTGCGGGCGCAGCCTTCGGCAAGGGCGTGGCGGTGCGCTGTCTGGTGGC
TGGGACTCAACACGGAACCCACCATGTTCCCTACCTGGGTCCTTGCAGGGCTCAGCAACCCCGCGGCCAAC
GTCTCTGTGAGATGTAAAGTCTTCATCGTCCGGTGGGGAAACCATTCACAACTCCATTACAGAGGGTGAACAC
AGCAAGTTTATGCTCACGGAGAAGGCAAGCTTACATAGGCACCTCCAACTGTCCGAGGATTATTTACAGACGACG
GCGGGGTGGGCTTGGTGTCAACCAAGCCCTGGCGCGCAGCCCGCGGGGCCAGCGTGCAGGAGCAGCTGCCG
CAGCTCTTTGAGCGGGACTGAGTTTCGGCTACGCGCTCGGCTGGACGGACAGGCTCCGGGCCAGGACTGGTT
TGGCAGGGCTGAGGGGGGCTCTTTTTCTCTGGGACCCCGCCCCGCAAGCGCCCTCCCTCTGACCCCGGCT
GGCTTTACGCGCTTCTCCGGCAAGCAGCCCGGTCCGACTGCGCCAGGAGCCCTGCGCAAGCGCCCGGGCT
CGCAAGCGCCGCTGTCTCTGATTTCCGAGTCCAGCCCGCTGAGCCCACTCTCTCAGGGAGCCCTCA
GGAAGCCCCCTTCCCTGACTCTTGGCCCCAGGCCCAAGGCTAAAAAACTCGTGGCTTCAAAAAA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 32

MPFRRPWDRAGTLQVLGALAVLWLGSAVALLICLLWQVPRPPTWQVQPKDVPRSWEHGSSPAWEPLAEAEARQORD
SCQLVLVESITPQDLPSAAGSPSAOPLGQANLQLLDTAQESVHVASYWYSLTGPDIGVNDSSQLGEALLQKLQQL
LGRNISLAVATSSPTLARTSTDLQVLAARGAHRQVPMGRLTRGVLSKFWVVDGRHIYMGSAAMDWRSLTQVKE
LGAVIYNCSHLAQDLEKTFQTYWVLGVPKAVLPKTPQNFSSHFNRFPFHGLFDGVPTTAYFSASPPALCPQGR
TRDLEALLAVMGSAQEFIYASVMEYFPTRFSHPRYWFLDNALRAAAPGKGVVRVLLVGCGLNTDPTMFPTLR
SLQALSNPAAANVSVDVKFIVFVGNHNSIFFSRVNHSKFMVTEKAAAYIGTSNWSEDIYFSSTAGVGLVVTQSPGAQ
PAGATVQEQRLQLFERDWSRYAVGLDGGAPGQDCVWQG

Signal peptide:	Amino acids 1-29
Transmembrane domain:	Amino acids 381-399
N-glycosylation sites:	Amino acids 133-137;154-158;232-236; 264-268;386-390;400-404;410-414;427-431
N-myristoylation sites:	Amino acids 58-64;94-100;131-137; 194-200;251-257;277-283;281-287;361-367; 399-405;440-446;448-454;478-484

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 33

ATCCTCTAGAGATCCCTCGACCTCGACCCACGCGTCCGAGAAGCTCCGCGGACGGGAAGGTAAACTGAGCTCCCC
 AGAGACGCTCATCTCAGCCTCAGCTCGGGCCAGCCTTCTCTCTCAGCTGCCACACAGCCTGGAGGGCGCT
 GCCTCCACCTCCCGAATGGTCTCTCTCAGCAGGCTCGGTCCAGGATCCAGCCCTTTGCCCCCTGCCTT
 GGAGCTGTGTCTCCGGTTTGTACAGTGGACTCCTGTGGCGGAGGGAAAGAACTTTGACACAGCAAGGCTT
 CAGCTTAGGAACCCCACTGACAACTTGAATCTCAACCTTAACCTAGTGTAGGTTCTTCTGTGCCCACTTT
 TCTGCTTTTGGAGAGAGAACTCTTCTCTGGCCATCTAGAGCCAGGAAGCCCAAGCTGGGGCTTGGTCCC
 AGCATGTGAGTCTCTCTTGTGATAGGGCTCTGCCCTCCCCCTGTGAGCATGGCTGAGCTCAGACAGGTTCCAG
 GAGGGCGGAGAGCCCAACAGGGGGAGCTGCGGCTTGAAGTTGTAGAGGATGAAGTCCCTAGGAGCCAGTCCGAG
 AAGAGCTTGGAGGAGTGAAGCAGCAGCTGAGGCAAAATTTGCCAAGAGAGGAGGAAGAACTGGATCTTA
 GATACAGGAGGAGTTGGAGCTCTGAACTCGGCCAGCGAGGATCAACAGCTGGAACTACAGCTGGATGAGG
 CCAAGGACCACTTATCCGAGGATCTACAGGAGTCCGGGAGGAAGTGAATACACAGGTTCCCACTTGGGAGCT
 GCATCGAGAAAGCCCGCTTACTATGAGGCTCGCGCTGCTGTAAGAGGCTCAGCGAGGACACAGAAAGGAG
 CGCTCGGTTACGAGCGGGCCGTAAAGCATGCAACACGCTGCTCGAGAAATGGTGTGTTGTGGTGGAGGGCTCA
 TGGCTGACAGAGCCGACTGGACCCCACTGGCAGGAGATGCTGAACTGCTACCTGCAAGGTGAATGAGCGG
 AGGAAGAGCGGCTTCAGAGTGAAGCGGAGCACACAGGAGTGAATCGGCTGTGCCAACAGGCTGAGGCTCGGGTCC
 AAGCCTTGCAGAGACCTCCGGAGGGCCATCGGCAAGAGCCGCCCTACTTTGAGCTCAAGGCCAGTTGAGCC
 AGATCCTTGGAGAGCAACAGGCCAAGGTGACAGAACTGGAGCAGCAGGTAGCTCAGGCCAAGAGCGGCTACTCCG
 TGGCCTTCTGTAACCTGGAGCAGATCAGCGAGCAGATTACGACAGCGCGCCCGGGGGTCTGCTCCCCACCCCC
 TGGGCCCTCGGCGCTCTCCCCCGTGGGGCCGAGGAGGACCCGAGGACATGGAGGACGGAGACAGCGGGATTG
 AGGGGCGGAGGGTGGCGGGCTGGAGGAGGACAGCCTTGGGGCCGGCCCCCGCCCGACACCGATACCTGGA
 GTCTGTGAGCCTGCGACCGTGGCTTACAGACTGACAGAAAGTGGAGCTCCGTGGAGCACTTGGAGGCTCTCGG
 ACCAGCTCAGTCTGGAGCGCCAGAGCTGGGAACCGGAGTGGAGGGCCCGGGCGAGGAGCGGAGCGCCCTG
 GGGCTCGACCAACCGCAGCTCAGCTGTAGCCGAGGGCCAGGTTCTCGCTTGAATCTGCCACACAGGGCC
 GGTGGGGCCACAGTCTTCTCAGCCTCTCTCTGGGGCTCGTCTTCCGAGGTTCCCTTCTCAGTGTCTT
 CCTCGGAGAGGCGAGCTGTGTGAGTCTCTGTGCTGCTGCGCTTCTCAGAGCTCCCTCTCCCTCAG
 CAGGCGCTCTTCTGCTTACCACTACAGAAAGCTCGCCCTCGGCGCTCTGTCTGCTCTGCTGCGAGCTCAT
 CAGATCTGAGGCACTTGAACCTTTGCTTTCCCTTCTGCTCCCTCTCTTCCATCTGTTGGCTTTTCCCTC
 AGGGAATTTGGTCTAGAAGGCACTGGGAAGCTCATCAGAGAAATGGGTGCTGGGCTGAGTATCCCGTGGAG
 GGGATGACAGTACCCCTCCCTTGGTTTCCAGCCCGCCCTTCCCAAGGCAACTCTGAGGGTACCTAG
 GTATGCTGTGAGCCTGCCCCCTGCTGCTCCAGCCTGCGCGTGTGAACCTGTAAGATGTAATGTGCTC
 CGGAGAGCACACCTTCTCCTTCAAGCATTCCTTCTATGACCTGAGGCACTCTGCGATGTGTGCCCAAGCAGA
 ACTTACAGGGCCTGAGGAAGCTGGTGTGAGGAGAGAAACCAACCCCACTGTCAACATAGGGAGCATCACCAA
 CTCCAGACTGGCTCTGTGGGTATGGTGTTCGCTGGGTGGGTCTTCAACATTGCAAGGTGCTAGTGGGTCC
 CTAGAGAGGCCATGTGTTGGGGTGAAGTCAATGAGTCTTGAAGGCTTAGGCCCTGTATCTCCACCTCACTCT
 TGTCTGACAGTGTGTATCTTTCTGTGGTGAAGATGCTGAACTGACTCGACACCTCTGAGGAGCGGGT
 AGGGAATTTGGTCTCAATGTCTTCTCTCTTCCCAAGTGAATACTACTGAGGATCTCTCGGGC
 ACATCTGAAGCTTGGCTGCAACCTCTTACTCTTCTTGTACAGGGAGGGGTGGCTTGGGGTGAAGGTTCTGC
 CCTCGCAGGAGCAGCTCCAGCTGCTGGCAGTGTCTCCAGTTTGTAGGGAAGCCACACAGATCTGGGTGCT
 TGGGAGAACCACTCTCTTTTGAACCCACCCAGGAAGATGAGTGTCTTTTCTAGGCCCATGTCTGCGAGC
 AACCGGATGCGTGGCAACTGGACTCTGACCGGGGTCTACAGGTTGAGGGAGGTTGGTCACAATGAGAACCTC
 GGGGTTTGAAGTGGCCATGGGACAGACAGCCAAAGGAGGGAGGGTGTGGGTGTGCGTGTGATGTCTGTG
 TGTAGGGGGAAGGCTCTTCTGGTTTATTTAAATAAAGTAGTTTATGTAAAC

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 34

MAELRQVPGRRTFQGEELRPEVVEDEVPRSPVAEPPGGGGSSSEAKLSPREEELDPRIQEELHNLQASEIN
QVELQLDEARTTYRILQESARKLNTQGSHLGSCIEKARFYEARLAKAQEFTQKALRYERAVSMHNAAREM
VFVAEQGVMDKNRLDPTWQEMLNHATCKVNEAEERLRGEREHQEVTRLQQAARVQALQKTLRRAIGKSRPY
FELKAQFSQILEEHKAKVTELEQQVAQKTRYSVALERNLQISEQIHARRRGGLPPHPLGPRSSSPVGAEGPED
MEDGDSGIRGAGAGLEEGSSLGPGPAPDTDTLSLSLRTVASDLQKCDSEVHLRGLSDHVSIDGQELGTRSGGR
RGSDDGGARGRRHQRVSLSL

cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites:
Amino acids 287-291;375-379

N-myristoylation sites: Amino acids 37-43;38-44;39-45;40-46;
103-109;307-313;310-316;315-321;365-371;
369-375;373-379;377-383;380-386;381-387

Amidation site: Amino acids 373-377

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 35

CTGCCAGGTGACAGCGCCCAAGATGGGGTCTTGGGCCCTGCTGTGGCCCTCCCTGCTGTTACCGGGCTGCTCGT
 CCGACCCCGGGGACCATGGCCAGGCCCCAGTACTGCTCTGTGAAACAAGGACATCTTTGAAAGTAGAGGAGAACAC
 AATGTACCCGAGCCCTGTGTGGACATCCACGTCCCGGAGGGCCAGGAGGTGACCTTCGGAGCCTTGTCCACCCC
 CTTTGCATTTTGGATCCAGGGAACCAAGCTGTTCTCAACGTGACTCTGATTACGAGGAGAACTCACTGCTTGA
 GGCTCAGCTGCTGTGTACAGCGGAGGACCAATTGGTGACCCAGCTAAGGGTGTGCTGTGCTGCTGACGCTCAA
 TGACAAATGCCCGCGAATTCCCTTTAAGACCAAGGAGATAAGGGTGGAGGAGGACACGAAAGTGAATCCACCGT
 CATCCCTGAGACGCAACTGCAGGCTGAGGACCGGACAGGACGACATTTCTGTACACCTTCAGGAAATGAC
 AGCAGGTGCCAGTACTACTTCTCCCTGCTGAGTGAACCGCTCCCGCTGAGGCTGACCGGCGCTGGAGCTT
 CTACGAGCGCGGAAATGACCTTCTGGCTGCTGCTGCGGACACTCCAGGGGAGAAATGTGGAACCCAGCCACAC
 TGCCACCGCCACACTAGTGTGCTGAACGTGCTGCCCGGACCTGCGGCGCCCGTGGTTCTGCGCTGCACTTCTC
 AGATGGTACGCTGTGATTCAGGCTCAGTACACCGGGGCTGTCCCGAGGGGACATATGCTGCTTCTCCCTGCT
 CTTGCTCCCGGACCCATCTAGCTGAGGACGAGGACCGCGCATCAACCGCCATCATCTACAGCATCTTTAG
 GGGAAAGTGAATGGTAACTTCACTCACTCACCCGACTCGGCAACCTCAACGTTGGCAGAGTCTCCCGAGCCC
 CATGACTTCTCTCTGCTGAGAGGACCAAGGCGGACCTTGCGCGCTACTCAGTGACCCAGGTCAACGCTGGA
 GGTGTGGCTGCGCCGAGGACCGCGCCGCTTCCCGAGGCTGTATCTGTGGACCGTGGCGGTGGCGCTGG
 AGCGGGGTGTGTGCTCAAGGATGACGCTGCCCTTCTCAGGCTCTGAGGATCCAGGCTCAGGACCGGAGTCTC
 GGAACCTCAACTCGGCCATCACATATCGAATTACCAACCACTCACACTTCCGGATGGAGGAGAGGTGTGTGCTGAC
 CACCAACCACTGGCACAGGCGGGAGCCTTCTACGCGAGGTTGAGGCCCAACAACCGGTGACCTTCTGGACCGC
 AACCACAGTCACTTGGATACAAAGTTTCCGAACAGGAGCCCTTCCACAGAGGCTGGAGGAACTTGGGCGCTG
 GACGAGCACTTCCGAGGTCCCGAGACCCCTGAGCCCTCCAGGAGACCTCCAGCACTGCTGGGGGAGG
 CACAGGCCCTCATCCACCTCTGGCAAACTCTGAGGCCACCACTCGTCCACACCGGGGGGCGCCCGGGTGC
 AGAAAAACAGCACTCCCAACCAAGCACTCCCGGTGGGACACAGCAAGCAACCCAAAGCCAGGAACTCTCA
 GCGATGCCCGCGGTGTGGGAACCAAGCACTCCCAACCAAGCAACCCAGTGGGGGACAGGACAGACCC
 AGAGCCAGGACCTTCTAGCCGATGCCCCCGATATGGGAACCAAGCACTCCCAACCAAGCAACCCAGGACACCCGCTGG
 GGGCACAGCAAGACCCAGAGGACAGGACCTTCAAGCGATGCCCCCGGTATGGGAACCAAGCACTCCCAACCA
 ACCAACCAACCCGCTGGGGGACAGCAAGCAACCCAGAGCAAGCACTTCAAGCGATGCCCCCTCAGCAAGAG
 CACCCCATCTCTAGGTGGCGGCCCTCGAGGACCAAGCGCTTCTCGGTGTGATATGCGCGCTGGCGGGGT
 GCTGGGTGCGCTGCTGCTGCTGCTCTCTTGGCTTCCCGTCTTGTCCACCAAGCACTATGGCGCCCGGCTCAA
 GTGCTGCTCTGCAAGCTCTCGGAGCCCAAGCCCAAGGCTTGTGACCAACAGGCTTCTCTCTGACCAAGGC
 CAACTGGGCGCCGCTCCCGAGCCCAAGCAAGCCCAAGCCCGGAGGACCGATGCGCGAGAGCCCGCACCC
 CCGCGCCCTGCTTCCCGAGCGGTGCGCTGAGCCCGCGAGCGGCGGAGCTGGCGGAGGCCACCGCGGT
 GAGTCCATCTGACCAAGGAGCGCGCGCGGAGGCGGGTACAGGCGCTGTGTTTGGCGAGGACATCGGGAC
 GGAGGCAGACGTGCTGTTCTCAACCGCGCCACCTGGAAGTGAATGGCGCTGCTGCTTGGCGAGGACATCGGGAC
 GGGCGAGGCGCGGGGAGGGGTGGGGTCCCTACGATGCAACCGGTGGTGAAGTCTCACTATCTAAGTGGCGCC
 TCCACCTCTCTCCCGAGCGCACCGGCACTGGAGGTCTCGCTCCCGCGGCTCCGACCCGAGGCGAGAAATAAGCA
 AGGCTCCCGAAACCCAGGCCATGGCTGGGGGAGGCGGTGGGTCCCTGGGGGCCCCATTCACTCAGTCCCTGT
 GCTCATTAGCGCTTGAAGCCAGGTGTGAGATGAGGCGGTGGGTCTGGCCACGCTGTCCCAACCCAGGCTGCA
 GCACTTCCCGTAAACCACTGCACTGCGCGCTTCCCGAGGCTGTGTGCGAGTGTCTGGAGGTTCTCT
 CCGCTCTAACCAACCGCGAGGCGGCTCCCTCCCGGACTGCAACAGAGATCTCAGGCAACCGGCTCACT
 CAGACCTCCCGCTCCCGACCTTACACAGGATTTGCTGGGAGGCTGAGGAGCGGATGCAACCCCGAGGCGAC
 GCACTTTGGGAGCGGTGTCTCAAAACCTTCCCGGGGCTCTAGTCCCTTCTGAAATCTACATGCTTGGGTGG
 AGCGCAGGATTAACACCTTCCAGTGAACCTGAGGCGCGCTGGGGTGGGTGCGCGCTGTGCGCTGAGC
 AGGAGCCAGACCAAGGCGCTAGGGGTGAGAGACATTTCCCTCGCTGCTCCCAAGCCAGAGCCAGGCTGGG
 CGCCATGCCAGAACCACTCAAGGATTCCTTGGGCTTGTGAGCACTTTCCCTAATGGAATACACCAATTAAT
 CTTTCCAAATGTTTT

PCT/US00/03565

FIGURE 36

Signal sequence: Amino acids 1-25

transmembrane domain: Amino acids 663-686

N-glycosylation sites: Amino acids 44-48;140-144;198-202;
297-301;308-312;405-409;520-524

Glycosaminoglycan attachment sites: Amino acids 490-494;647-651;813-817

cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site:
Amino acids 655-659

Tyrosine kinase phosphorylation sites: Amino acids 154-163;776-783

N-myristoylation sites: Amino acids 57-63;102-108;255-261;
294-300;366-372;426-432;441-447;513-519;
517-523;530-536;548-554;550-556;581-587;
592-598;610-616;612-618;623-629;648-654;
666-672;667-673;762-768;763-769;780-786;
809-815;821-827;833-839

Cadherins extracellular repeated domain signature:
Amino acids 112-123

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 37

CTCCTGCACTAGGCTCTCAGCCAGGGATGATGCGCTGCTGCCGCCGCCGCTGCTGCTGCCGGCAACCAACCCCATG
CCCTGAGGCCGTGCTGTGCTGCCCTCGTCCCTTTTACCTCCCTGGCAGCAGCTGCAGGGGCCCAACCGAT
GTGACACCATATACCAGGGCTTGCCGAGTCTCTCATCCGCTTGGGGACAGCATGGGCCGCCGAGGCCAGCTGG
AGACCATCTGCRAGGTCTTGGAATGACTTCCATGCCCTGTGCCCTCTCAGGTCTGTCAAGGCTGTCCGAGGGAGGCAG
CTGCAGTGTGGGAATCACTACAGCAAGAAGCTGCCAGGCCGCCCGTCCGAATACCTTGCACTCTCTGTGGGTGCC
CCGTGCACTGTTCCGGAGCGCGGCACAGGCTCCGAAACCAACAGGAGACGCTGCGGGCTACAGCCCTTGCACTC
CCCATGGCCCTTGCGGCCCACTGCTGGCGCTGCTCTGCTCTGGCTACCTCTGAGGCCCTGTGCTTACCTT
GTTGGGTTGGGTAGCAGCGCCCGTACCTCCAGCCCTGCTCTGGCGGTGGTTGTCCAGGCTCTGCAGAGCGCAGCA
GGGCTTTTCATTAAAGGTATTTATTTGTA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 38

MMRCCRRRCCCRQPPHALRPLLLPLVLLPPLAAAAAGPNRCDTIYQGFACLRRLGDSMGRGGSELTICRSWND
FHACASQVLSGCFEAAAAVWESLQQEARQAPRFNNLHTLCGAPVHVRRERGTGSETNQETLRATAPALPNAPAPPL
LAAALALAYLLRPLA

Signal peptide:	Amino acids 1-35
Transmembrane domain:	Amino acids 141-157
N-myristoylation site:	Amino acids 127-133
Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site:	Amino acids 77-88

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 39

CAGCGTGAAGTGGCGCGGAGAAAGCCAGTGGGAACCCAGACCCATAGGAGACCGCGTCCCGGCTCGGCCTGG
CCAGGCCCCGCGCTATGAGTTCTCTGGGCCCCCTCTCTTGGGTCTGTGCTGCAGTCTGGCGCGCTGCTGATCGCC
ACACCGTCTTCTGGAACAGTTCAAATCCCAAGTTCCGGAATGAGGACTACACCATACATGTGAGCTGAATGACT
ACGTGGACATCATCTGTCGGCACTATGAAGATCACTCTGTGGCAGACGCTGCCATGGAGCAGTACATCACTGTACC
TGGTGGAGCATGAGGATACCACTGTGCCAGCCCCAGTCCAGGACCAAGTCCGCTGGCAGTGCACACCGGCCCA
GTGCCAGCATGCGCGGAGAGCTGTCTGAGAAATTCCAGCGCTTCAACCTTTCACTCTGGGCAAGGAGTTCA
AAGAGGACACAGCTACTACTACATCTCCAAACCCATCCACAGCATGAAGTCCGCTGCTTGAAGTTGAAGTTGA
CTGTCACTGGCAAAATCACTCACAGTCCCTCAGGCCCCATGACAATCCACAGGAGAAAGAGACTTGCAGCAGATGACC
CAGAGGTGCGGTTCTACATAGCATCGGTACAGTGTGCCCCAGGCTCTTCCCACTTGCCTGAGCTGTGCTGC
TCCTTCCACTTCTGCTGTGCAACCCCGTGAAGTGTGTGTCACACCTGGCTTAAAGAGGAGCAGGCTGAAGA
GAGGACAGGCTCTCAAACTGTCTTGGGCGCTTTCAGAGCCCCAGCTGGGACCACTCCCAACACAGG
CATAGCTATCACTAGCAGCTCAAAACGGGTCAATATTAAAGTTTTCACCCGAGAGGCGCAACCAAGCCCGA
CACTGCCATCCCACTTCACTCGGAGGATGGAGAAAGAGTGGAGACAGTCTTCCCACTTCTGCTCTT
TAAGGCAAGAAACAGCTGTGAGGATGCTCCCTTAAGGACAGTGGAGCTGAGCTGGAAGGGGCCACGCTGG
ATGGGCAAGCTTGTCAAGATGCCCCCTTCAAGGAGAGCCAGGATGCCAGATGAAGTGAAGGAAAGC
AAGAAACAGTTTCTTGTGGAAGCCAGGTACAGGAGAGGCGAGCATGCTTGGGCTGACCCAGCATCTCCAGCAA
GACCTCATCTGTGGAGCTGCCACAGAGAGTTTGTAGCCAGGTACTGCTCTCTCCATCTGGGGCAGCACTC
CCCAGAGCTGTGCGAGGAGGGGCTGTGCCAACCTGTCTTAAAGTGTAGCTGTAGGGCAGTGGCCATGTGTA
CATCTGCTAGAGTGTAGCTTAAAGGCGAGGGCCACGTGTATAGTATCTGTATATAAGTGTGTGTGTCTGT
CCTGATTTCTAACCTGGAGTTTTTTTATACATGTCTTGTCTCAAAATAAGCAATGTGTTTTTCGG

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 40

MEFLWAPLLGLCCSLAAADRHTVFWNSSNPKFRNEDYTIHVQLNDYVDIICPHYEDHSADAAMEQYILYLVEHEE
YQLCQPQSKDQVRWQCNRPQSAKHGPEKLSKFORFTPTLGKEPKHGHSYVYISKPIHQHEDRCLRLKVTVSGKI
THSPQAHDNFQEKRLAADDPEVRVLHSHGSAAPRLFPLAWTVLLPLLLQLTP

Signal sequence: Amino acids 1-17
N-glycosylation site: Amino acids 26-30
Tyrosine kinase phosphorylation site: Amino acids 118-127
N-myristoylation site: Amino acids 10-16

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 41

AGCAAAATGGTGTGGCCGAAGCTGCCTCTCTGGTGGCATAGCTAAGACCAAGCTGCACCGCAGTGAAAACACAGTTT
GTTTTCACTGACAAACAAGGCAGAATGTGTACCAAGGATGTGACGTGGGGAACAGGAAGAGGACAGTCTGAGGAT
CATTATTAAGGGACTCCATCCAAGAAAGTTTCCAGCCAGAGGCAAGCTGTAGCCAGAAGAAAGAAATGAGAGAT
CACCTGAATAATAGAACAGAACTGCTGAAATATTGAAACACAGATCTAGATCAAAATGAGGAACATATTGAGGAT
GAAGCAATAAATAAGGCCAGGCGTGGTGGCTCATGCTGGAATCTCAGCTCTTTGGGAGGCCGAGGCTATTCTCC
ATCTCCTGGGCTCCAGTGATCCTCAGCCTGGGCCACCCAAAGTGTGGGATTATAGAGTGAAACCACTGCGCCT
GGCCTATTGAAGTTTAAATCTTCAAGCTTTGACTTTATCAACCAACATAGAGCCACCAAGAAATGCGAG
TGGATCCTAATAGAAATACAGAAGATGGCACTCACTGCATTTATAGAAATTTGAGACTCCATGAAAATGCAGATT
TTCAAGACACCACTCTGGAGAGTCAAGATACAAAATTAATACCTGATTCTATGAGGAGAAATTAACAGGCTTTT
AAGGAGCTGTGCAAAAGGAATTACAACATATCTGTGGATCACAGCACATCAGAGCAGAGAAAGCAGATGTTGGATG
GCTCATGGTTAGATCTGGCCAGAGGAGCAAGCTTGAAAGCTCAGCCTTTTGTCTCATCTCACTATTATATGCCACCG
ACATCCCTCTGGTCCCAAAAGTGAGTCTGTCTTGTGTACCATGATCGGGGTTGGCCAGAGATCTCCACAC
TGACTTTAGCAATGGAAAACTAATAGTTAATCAGGATGGCTTTTATTACCTGTATGCCAAACATTTGCTTTGAC
ATCATGAACCTTCAGGAGACCTAGCTACAGATATCTTCAACTAATGGTGTACGTCATAAACAGCATCAAAA
TCCCAGTTCTCATACCTGTATGAAGGAGGAAGCAACAGTATTGGTCAGGGAATCTGAATTCATTTTATTT
CCATAAAGCTGTGGATTTTTTAAGTTAGGGCTGGAGAGGAAATCAGCATCGAGGCTCCCAACCCCTCTTAC
TGGATCCGGATCAGGATGCAACATACCTTTGGGGCTTTAAAGTTTCAGATATAGATTGAGCCCCAGTTTGGAG
TGTATGTATTTCTGGATGTTTGGAAAATTTTTTAAACCAAGCCAGAAAGATGTATATAGTGTGTGAGACT
ACTAAGAGGCATGGCCCAACGGTACACGACTCAGTATCCATGCTCTTGACCTTGTAGAGAACCGCTATTAC
AGCCAGTGGGAGATGTAGACTCATGCTGTGTACACATGGTTTTTAAATTTGTATGAATTCCTAGAATTAA
ACCAAGTTGGAGCAATACGGGTTGACCTTATGAGAACTGCATGTGGGCTATGGGAGGGTGTGTCCTGGTCA
TGTGCCCTTCGAGCTGAAGTGGAGAGGGTGTCTATAGCGCAATGAAGGATCATCTGAAGGGGCAAAATCTT
TGAATTTGATCATCTGCTGGAACCTGGCAAAAATCTTTTCTAATGAGGAGAGAAATATATGTATTTTAT
ATAATATCTAAGTTATATTTCAGATGTATGTCTTCTTGCAGATATGTAAATATATTTGTGCTATAGAT
TTGATCAAAATTTTAAATGTCTTGTCTGTGACATATTAAATTTTAAAGTACAGACATTTTACTGGT
GCATTTGTAAATTCCTTGGGAAAACCTTGCACTAAGGAGGAAAAAATGTTTCTTATATCAAAATGCA
GTATATTTCTTGTCTTTTAAAGTTAATAGATTTTTCAGACTTGTCAAGCTGTGCAAAATTAATAATGGAT
GCCTTGAATAATAAGCAGGATGTTGGCCACCGGTGCTTTCAAAATTTAGAACTAATTGAATTTAGAAAAGTGA
CATTGCCAAAAGGATACATAATGGGCCACTGAATCTGTCAAGATAGTTATATAATTTGAAACAGGTGTTTT
TCCACAAGTCCGCAATGTACCTTTTTTTTTTTTCAAAATAGAAAAGTTATTAGTGGTTTATCAGCAAAAA
GTCCAAATTTAATTTAGTAAATGTATTATTATCTGTACAATAAAACATTCCTTTGAATGTTAATTTTTTGGT
ACAAAAATAATTTATATGNAACCTGGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 42

MDPNRISEDGTHCIYRILRLHENADFQDTTLESQDTKLIPDSCRRIKQAFQGAQKELQHIYGSQHIAEKAMVD
GSLDLAIGRSKLEAOPFAHLTINATDIPSGSHKVSLSWYHNRGNWAKISNMTFENGKLIVNQDGFYLYANICFR
HHETSGDLATEYLQLMVYVTKTSIKIPSSHTLMKGGSTKYWSGNSEFHFYSINVGGFFKLRSGBEISIEVSNPSL
LDPDQDATYFOAFKVRDID

N-glycosylation sites:

Amino acids 98-102;125-129

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 43

ACCAGAACAGCATAACAAGGCGAGGTCTGACTGCAAGGCTGGGACTGGGAGGCAGAGCCGCCCAAGGGGGCCT
CGGTAAACACTGCTCGTTCAATCACTGCAAGCAGAGGAGGCAAGGATGCTGTTGGCCTGGGTACAAGCATTTC
CTCGTCAGCAACATGCTCTTAGCAGAAAGCCTATGGATCTGGAGGCTGTTTCTGGGACCAAGGCCACCTGTACCGG
GAGGACCAAGACTCCCCCGGCGGGGCTCCGCTGCTCAACTGGCTGGACGCGCAGAGCGGGCTGGCTGGGCCCC
GTGTCGGGGCCCGCAATCACAGTTACTGCCGAAACCCGGAACGAGGACCCGCGCGGGCCCTGGGTCTACGTCAAGT
GGCGAGGCCGCGCTCCCTGAGAAACGGCCTTGCGAGGACCTGCGCTGTCCAGAGACCACTCCAGGCCCTGCCA
GCCTTCACGACAGAAATCCAGGAAGCGCTTGAGGGGCCAGGTGCAGATGAGGTGAGGTGTTCCCTCTGCCAAC
GCCCTGCCCGCTCGGAGTGAGGGGCGCAGCTGTGCAGGCCAGTGATTGGGATCAGCCAGCGGGTGGCGATGAATCC
AAGGAGAAAAAGGACCTGGGAACCTGGGCTAGCTGCTGGGATTACCATGATGGTGATCATATTGCCATCGGA
GCTGGCATCATCTTGGGCTACTCCTACAGAGAGGGGAGGATTTGAAGAAACAGCATGATCAGAAATATGTAG
AGGAGATGCAAGCAGATCATCTGCTGTCTGCTTACCAACCCACCTGTGAGATTGTGATGAGAGACT
GTCTGTGTCACACCAAGCCAGACTCCAGTTGACCTCAGGAGGGCACCAACCCCTTATGGGCCAGGCCGGGACT
CCTGGGGCTGAGCCCCCAGTGGGAGGAGCCCATGCAGACACTGGTGCAGGACAGCCACCCTCTACAGCT
AGGAGGAATACCACTTTGTGTCTGGTTAAACCTTACCACTCCC

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 44

MLLAWVQAFIVSNMLLAAYVSGGCFWNGHLYREDQTSAPGLRCLNWLDAQSGLASAPVSGAGNHSYCRNPDE
DPRGFWCYVSGEAGVPEKRPCEDLRCPTTSQALPAFTTETQKASEGPGADEVQVFAPANALFARSEAAAQVQVVI
GISQVRMRNSKEKDLGLGYVLGITMMVIIAIGAGIILGYSYKRGKDLKEQHDQKVCEREMQRTTLFLSAFTN
PTCEIVDEKTVVVHTSQTFVDPQEGTTLNGQAATPGA

Signal sequence:	Amino acids 1-21
transmembrane domain:	Amino acids 171-189
N-glycosylation site:	Amino acids 66-70
Glycosaminoglycan attachment site:	Amino acids 62-66
N-myristoylation sites:	Amino acids 21-27;187-193
Kringle domain signature:	Amino acids 69-75

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 45

GTCTTTGACGAGT'TTTCCATGTGGACGCTCTTTCAATGGACGTGTCCCCGCGTGCTTCTTAGACGGACTGC
GGTCTCCTAAAGGTCGACCATGGTGGCCGGGACCCGCTGTCTTCTAGCGTTGCTGCTTCCCAGGTCTCTCTGGG
CGGCGCGGCTGGCTCGTTCGGAGCTGGGCGCGAGGAAGTTCGCGCGGCGCTGCTGCGGCGCCCTCATCCCA
GCCCTCTGACGAGGTCTGAGCGAGTTCGAGTTGCGGCTGCTCAGCATGTTGCGGCTGAAACAGAGACCCACCC
CAGCAGGGACGCGGTGGTGGCCCTACATGCTAGACCTGTATCGCAGGCACTCGGTCAGCGGCTCAACCGC
CCACAGCACCGGTTGGAGGGGCGAGCCAGCCGAGCCACACTGTGCGCAGCTTCCACCATGAAGAATCTTTGGA
AGAACTACAGAAACGAGTGGGAAACAAACCGGAGATTCTTTTAAATTTAAGTTCTATCCCAAGGAGGATT
TATCACCTCAGCAGAGCTTCAGGTTTTCCGAGAACAGATGCAAGATGCTTTAGGAAACAAATAGCAGTTTCCATCA
CCGATTTAATATTTATGAATCATAAACCTGCAACAGCCAACTCGAAATTCGCCGTGACAGTCTTTGGACAC
CAGGTTGGTGAATCAGAAATGCAAGCAGGTGGGAAAGTTTGTATGTACCCCGCTGTGTATGCGGTGACTGCACA
GGGACAGCCCAACCATGGATTGTTGGTGGAGTGGCCCACTTGGAGGAGAAACAGGTGTCTCAGAGAGCATGT
TAGGATAAGCAGGTCCTTTGGACCAAGATGAACACAGCTGTGTACAGATAGGCCATTGCTAGTAATCTTTGGCCA
TGATGGAAAGGCGATCTCTCCACAAAGAGAAACAGTCAAGCCAAACACAAACAGCGGAACGCTTAAATTC
CAGCTGTAAAGACACACCTTTGTACGTGGACTTCAGTGACGTGGGTGGAATGACTGGATTGTGGCTCCCGCGG
GTATCAGCGCTTTTACTGCCACGGAGATGCCCTTTTCTCTGGCTGATCATCTGAATCCACTAATCATGCCAT
TGATCAGAGCTTGGTCAACTCTGTAACTTAAGATTCTTAAGCATGCTGTGTCCGACAGAACTCAGTGCTATCTC
GATGCTGTACCTTGACGAGAAATGAAAAGGTTGTATTAAGAACTATCAGGACATGGTTGTGGAGGTTGTGGGTG
TCGCTAGTAGCAGCAAAATTAATACATAATATATATATATATATATATTTCTAGAAAAAGAAAAACAAACAA
ACAAAAAACCCACCCAGTTGACACTTTAATATTTCCCAATGAAGACTTTATTTATGGAATGGAATGGAATAA
AAAAACGATATTTTAAAAATATATTTATATCTACGAAAAGAGTTGGAAAAACAAATATTTTAATCAGAGAAATTA
TTCTTAAAGATTTAAAAATGATTTAGTTGTACATTTATATGSGTTCAACCCAGCACATGAAGTATAATGTCAGA
TTTTATTTTGTATTTTACTATTATAACCACTTTTAGGAAAAAATAGCTAATTTGTATTTATATGTAAATCAA
AAGAAATGATCGGTTTGTACATAATTTCCAAAAATTTAGTTGTTTTCAGTTGTGTATTTAAGATGAAAAGT
CTACATGGAAGTTTACTCTGGCAAGTGTAGACGTTTGTCTTTTGGAGTGTACTCTTGTGATTCACAGTTI
CAGTCCAGAAAAAAGTGGATATCCACTGCTGACTTCAAGATTATATATTTCAATTTCTCAGAAAT
GTTGCAGATGATTTGCCATCCATGAAGATTACATCTTATTAGGTGGATATTTGGATAAGACCAAGACATT
GCTGATCTATATAGAACTCTCTCTCTGCCCCCTAATTTACAGAAAGAAATAAGCAGGATCCATAGAAATATTT
AGGAAAACGATGAACCTGCAGGAAAGTGAATGATGTTGTTGTCTCTTCTTCTAATTAGTGATCCCTTCAAA
GGGGCTGATCTGCCAAAGATTCAATAAAACGTAAGATTCTTCAIT

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 46

MVAGTRCLLALLLPQVLLGGAAGLVPELGRRKFAAASSGRPSGQPSDEVLSSEFELRLLSMFGLKQRPTPSRDAVV
PPYMLDLYRRHSGQPGSPAPDHLRLERAASRANTVRSFHHESLEELPETSGKTRRRFFNLSSIPTEEFITSARL
QVFRBQMQLGNNSSFHHRINIYEITIKPATANSKFPVTSLLDTRLVNQNASRWESFDVTEAVMRWTAQGHANHG
FVVEVAHLEEKQGVSKRHVRISRLHQDEHSWSQIRPLLVTFGHDGKGHFLHKREKRQAKHKQRRLKSSCKRHP
LYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAPVYCHGECFFPLADHLNSTNHAIVQTLVMSVNSKIPKACCVETELSAISMLYLD
ENEKVVLKQYQDMVVEGCGCR

signal sequence: Amino acids 1-19
N-glycosylation sites: Amino acids 135-139;163-167;164-168;
200-204;338-342
cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site:
Amino acids 84-88
N-myristoylation sites: Amino acids 19-25;162-168
Amidation site: Amino acids 28-32
TGF-beta family signature: Amino acids 314-330

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 47

AGTCCTGCCAGCTCTTTGGATCAGTCTGCTGGCCGAGGAGCCCGGTGGAGCCAGGGGTGACCTGGAGGCCAGCC
TGCCCCGAGGAGGCCCGGCTCAGAGCCATGCCAGGTGTCTGTGATAGGGCCCTGACTTCCTCTCCCGTCTGA
AGACCCAGGTGCTGAGGCCCTGCTTGGGCAAGCTCAGTGGCTCTGAACTGCACGGCTTGGGTAGTCTCTGGGCCCA
CTGCTCCTGCTTCAAGTCCAGTGGCTGAAAGACGGGCTTCCATTGGGAATTGGGGGCCACTACAGCTTCCAOGA
GTACTCCTGGGTCAAGGCCAAGCTGTCAAGGTGCTTGTGTCCAGTGTCTCTGGGGGTCAACGTGACCACTGA
AGTCTATGGGGCTTCACTGTCTCATCCAGAACATCAGCTTCTCCTCTCTCACTCTTCAAGAGCTGGCCCTACAA
GCCACGTGGCTGGGTGCTGGCTCCCTCTGTCTCTGCTGGCCCTGCTGCTGGCCGCTGCTCTATGTCAAGT
GCCGTCTCAACGTGCTGCTGTGTACCCAGGACCGGTATGGGGAGGTGGAGATAAACGACGGGAAGCTCTACGAG
CCTAAGTCTCTCAACAGGACTGCCCGAGGACCGCAAGTTCTGTAACTTCTATCCTAAAGCCGAGCTGGAGCGGC
GTGGGGCTACAGCTCTTCTGGACGACCGGCACTCTTGGCCGCGCTGAGCCCTCCGCGACCTCTTGGTGA
ACCTGAGCCGCTGCGGAGCTCATCTGTGTGCTTTGGAGCCCTTCTGAGCCGCTGCTGTGGAGCCAGCT
TCCGGAGGGCTTGTCCGCTGCTGGAAGCTCAACCCGAGACCATCTTCTACCTTCAAGGGCCAGAGCGCG
ACCCGCGCACCCGCGCTCCGCTGCTGCGCAGGACCGCCACCTGTGTGACCTTGTGCTCTGAGAGCCCGGCT
CCGTGATCCTTCTCCGATTTTGGAAAGAAAGTGCAGCTGGCGCTGCGCGGAAGGTGCGGTACAGGCCGCTGG
AAGGAGACCCCGAGACCGAGTGCAGGACGACAGGACCCCATGCTGATTTCTTGGAGCCGAGTCCCTGAGGGC
GGCCCTGGACTCAGAGGTGGAACCGGACCCCTGAGGGCGACCTGGGTATGCCCGCCAGCCCCACTCCCAACTG
GAGAAGCTCAGCACAGGGCGGAGTGGGGCGAGGACAGGGCAAGGGCTGAGGGGCTCTAGGTGTTGAGGACT
CTTCCCGCACCGGGAGCCCTGCACGGCTCTGCTGCTGGAGGTGCTCGGCCCTCGGTCTGCTGGGAACCTCTCT
GGGCTCAGAGCCATCAGCAGGGGGTGAAGAGGGGAGCCCTGAGAGTGGGTCTGGGCCAAGGCTGTGGGT
GGCCACTCAGGCTCTCGGTCTCCCAACCCAGGTGTCCGGGGCTGTTTGGAGAGCCATCAGCTCCACCG
CACACCGTGGGTCTCGCTGGGAGAGAGCCGAGGACAGGAAGTGAAGCTCTCGGATCTCGGCTCGCGAACTACAG
TGCCCGCACAGACTTCTACTGCTGGTGTCCAGGATGATATGTAGCTCCACCCAGAGTGCAGGATCA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 48

MPGVCDRAPDFLSPSEDQVLRPALGSSVALNCTANVVSGPHCSLPSVQWLKDGLPLGIGGHYSLHEYSNVKANLS
EVLVSSVLGVNVTSTEVYGAFTCSIQNISFSSFTLQAGPTSHVAVLASLLVLLALLAALLYVKRLNVLLWY
QDAYGEVEINDKLYDAYVSYSDCPEDRKFNFIKPOLERRRGYKLFDDRDLLPRAEPSADLIJNLSRCRRLI
VVLSDAFLSRWCSSHPREGLCRLLELTRRPITFITFEGQRRDPAPHPALRLLRQHRHLVTLTLLWRFGSVTPSSDFW
KEVQLALPRKVRYPVEGDPQTQLDDKDFMLILRGRVPEGRALDSEVDPEFEGDLGMPAQPHSPTGEAQHRAEW
GQAQGTGPGGALGVEDSSRHREPLHGLCFGGARPSVCLGTSNASQAITAGGEGQGQPLAVGLGQCGWFPQASRSP
HPRCPGACFWRAISSTAHQWGLAGREPEQRSGRLGSLAKLQCPHRLLLPGVQG

Transmembrane domain: Amino acids 120-140

N-glycosylation sites: Amino acids 31-35;73-77;86-90;102-106;
217-221

N-myristoylation sites: Amino acids 25-31;53-59;59-65;84-90;
94-100;376-382;380-386;384-390;388-394;
401-407;406-412;414-420;425-431;429-435;
435-441;437-443;485-491

Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site:
Amino acids 430-441

Leucine zipper pattern: Amino acids 123-145

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 49

CTGGGCCAGCTCCCGAGAGGTGGTGGATCCTCTGGGCTGCTCGGTGATGCTGTGCCACTGACGTCCAGG
CATGAGGTGGTTCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCGCAGCACCCTCTGGCCACGGCCCT
CTCTCCAGCCCTACGACCATGGACTTTATCTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCCTCAGCCGCCAATTCTGCAG
GTGGCATGTGAGTGGCCCATCCCAACCCGCTGCCGCTGGGGGTCAAGCTCATCAGATGGCTGTGAGTG
CTGTAAAGTGTGGCTCAGCAGCTTGGGGAACAATGACAGGAGGCTGCCATCTGTGACCCCCACCGGGGCTCTAC
TGTGACTACAGCGGGACCGCCGAGGTACGCAATAGGAGTGTGTGACAGGTGTCGGTGTGGGCTGCGTCTCTG
GATGGGCTGCGCTACAAACAGGCCAGTCTTCCAGCTTAAGTCAAGTACAACTGCACGTGCATCGACGGCGG
GTGGGTGCACACCACTGTGCTCCGAGTGGCGCCCCCGGTCTCTGGTGCCCCACCGCGGCGCTGTGAGCAT
CCTGGCCACTGTCTGTGAGCAGTGGGTATGTGAGGACGAGGCCAAGAGGCCAGCAGACCCGCGTGACACA
GGAGCCTTCCGATGTGTGGTGTGAGGTGGAGCATGGCAGGAACTGCAATAGCCTACACAGGCCCTGTGAGGCCCT
TGCTCCACAGCTCGGGCTGGGGGTCTCCACTCCGATCTCCATGTGTAAACGCCAGTGTGGCTCAGCAGAGG
AGCCGCTCTGCAACTTGGGCCATGCGATGTGGACATCCATACACTCATTAAAGCAGGGAAGAAGTGTCTGGCT
GTGTACAGCCAGGAGCATCCATGAACCTTCACTTGGGGCTGCTCAGCAGCAGCTCTATCAACCCAGTAC
TGTGGAGTGTGATGAGCAATAGGTGTGCACTCCCTCAAGTCTAAGACTATCGACGTGTCTTCCAGTGTCTCT
GATGGGCTTGGCTTCTCCGCCAGGTCTTATGATTAATGCCGTCTTCTGTAACTGTAGCTGTAGAAATCCCAAT
GACATCTTTGTGACTTGGAACTTACCTGACTTCTCAGAAATTCGCAACTAGGCAGGCAACAATCTTGGGTCT
TGGGACTAAACCAATGCTGTGAAGCAGTCAAGCTTATGGCCAAATACTTTTCAACCAATGAGCTTATGTTACC
CTGATCTGGAGCCCTTGGCTCCATTTCTGTCTCTAACCAATCAATGACGCTGATGGTGTGCTCAGGCCCATG
CTATGATTTTCTCTTGTATATCTTCAAGCTTACTCTTAAAGAAATGCTGTCTCTAGCTGTCTTGAATAC
ACCCAGCTGATCCAGCTTTCCAGTCACTAGAGTCTCTGCTGGATCTTGCCTAAATCCCAAGAAATGGAATC
AGGTAGACTTTTAAATCACTAATTTCTTCTTTAGATGCCAAACCAAGACTCTTGGGTCCATTCAGATGAAT
AGATGGAATTTGGAAACAATAGRAATAATCTATTATTGGAGCTTGGCAAGAGTACTGTAAATGGGTAAATCTGACG
TCAGCGCACCAAACTATCTGATTTCCAAATATGTATGCACTCAGGCTCATCAACATTTGGCAAGTGTGTA
ATAGTTGCTTAATTTGATTTTAAATGGAAGTGTATCCATTAACCTGGGCAATGTGAGGTAAATTTCTCTT
CACCCCTACACTGTGAAGGTAAGATTAGGTTTGTCTCCAGTCAAGAAATAAATTTGATTAACATTTCTTGTGAT
GGGAAAGCCCCAGTTAATCTCCAGAGACAGGGAAGGTCAAGCCATTTCAAGAGGACCAATTAATCTCTACA
CTGAATCAGCTGTGACTGGCAGGCTTTGGGCAAGTGGCCAGGCTCTTCTTGAATCTTCTCCCTGTCTCTGCT
TGGGTTCAAGAAATTTGTAAGGCTTGGGCTGGCTGTCTGGCCCTGAGAGTGGTCCCTGGAACACTCTCT
TACTCTTACAGAGCTTGAAGACCCAGCTGCAGACCATGCCAGACCCACTGAAATGACCAAGACAGGTTCAAGT
AGGGGTGTGGGTCAAAACCAAGAGTGGGTGCCCTTGTGAGCAGCTGGGGTGACCTCTAGAGCTGGAGGCTGTGG
GACTCCAGGGCCCCCGTGTGAGGACACATCTATTGCAAGACTCATTTTCAAGCCTTTCTGTCTGTGACCAA
ATGGCCAGTTTCTGTGAGGAGATGAGGTTTACAGTTGTTTAGAABACAGAAATAGACTTAATAAGGTTTAA
AGCTGAGAGGTTGAAGCTAAAGGAAAAGGTTGTTGTTAATGAATATCAGGCTATTATTATTGTATTAGGAAA
ATATAATATTACTGTGTAAGATTTCTTTATTAGGGCTTTTCTGTGCGAGACATTGCTCTCAGTGTCTTGTGATG
TATTAGCTCACTGAATCTTCAAGCAATGTGAGAACTTCCATTAATTTCTGTTCTTAAGATGTGAACGG
AAGCTCTAGAGGTGAGAAAATCAACCAAGATCAACCGTTGTGCTGGAAAGTTAGGATTCAGATCGAAT
TGGACTGTCTTTATACCCATATTTTCCCCCTGTTTATAGAGCTTCCAAATGTGTGAGATAGGAAAACATTTGCA
ATAATGCTGTGATTTT

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 50

MRWFLFWTLAAVTAASATVLTALGPAPTMDFTPAFLEDTSRRPQCKWPCBCPPSPPRCPGLGVSLLITDGCRC
CKMCAQQLGDNCTRAAICDPHRLGCDYSGDRPRYAIGVCAQVVGVCVLDGVRYNNGQSFPNCKYNCTCIDGA
VGCTPLCLVRPPRLWCNPHRRVSIPIGHCCBQWVCEDDAKRPRTAPRDTGAFDAVGEVAAWHRNCTIAYTSPWSP
CSTSCGLGVSTRISNVNAQCWFBQESLCLNLRPCVDVDTHTLIKAGKKCLAVYQPEASMNFTLAGCISTRSYQPKY
CGVCMNRCIPYKSKTIDVSVFQCPDGLGFSRQVLWINACFCNLSCRNPNDIFADLESYPDFSEIAN

Signal sequence: Amino acids 1-17
Transmembrane domain: Amino acids 110-126
N-glycosylation sites: Amino acids 86-90;143-147;284-288;
343-347
cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site:
Amino acids 171-175
N-myristoylation sites: Amino acids 72-78;127-133;149-155;
201-207;231-237;289-295;327-333
Amidation site: Amino acids 269-273
Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site:
Amino acids 113-124
von Willebrand C1 domain: Amino acids 130-147
Thrombospondin I: Amino acids 223-238
CT (C-Terminal) module: Amino acids 301-313
IGF binding protein (less stringent than prosite's):
Amino acids 72-81

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 51

CAGAGCAGATATGGCAAGCATGGCTGCCTGCTCACCCTGGGCTCTGGCTCTTCTTTCAGCGTTTTCGGCCACCC
AGGCACGGAAGGCTTCTGGGACTACTTCAGCCAGACCAGCGGGGACAAAGGCAGGGTGGAGCAGATCCATCAGC
AGAAAGATGGCTCGCGAGCCCGGACCTTGAAAGACAGCCTTGAGCAGAGACCTCAACAATATGAACAAAGTTCTGG
AAAAGCTGAGGCTCTGAGTGGGAGCGAGGCTCCTCGGCTCCACAGGACCCGGTGGGATGCGGCGGAGCTGC
AGGAGGAGTTGGAGGAGGTGAAGGCTCGCTCCAGCCCTACATGGCAGAGGCGCACGAGCTGGTGGGCTGGAATT
TGGAGGGCTTGGCGAGCAACTGAAGCCCTACACGATGGATCTGATGGAGCAGGTGGCCCTGCGCTGCAGGAGC
TGCAAGAGCAGTTGCGCGTGGTGGGGAAAGACACCAAGGCCAGTTGCTGGGGGGCGTGAGCAGAGCTTGGGCTT
TGCTGAGGAGCTGCAGAGCCCGGTGGTGCACCAACCGGCCGCTTCAAAGAGCTCTTCCACCCATACCGCGAGA
GCCTGGTGGAGCGGCTACGGGGCGCACGTGCAGGAGCTGCACCGCAGTGTGGCTCCGCACGCCCCCGCCAGCCCCG
CGCGCTCAGTGGCTGCGTGCAGGCTCTCCCGGAAGCTCAGCTCAAGGCCAAGGCCCTGCACGCAAGCATCC
AGCAGAACCTTGACCAAGCTGCGGGAAGAGCTCAGCAGAGCCTTTCAGGCACTGGGACTGAGGAGGGGCGCGCC
CGGACCCCTAGATGCTCTCCGAGGAGGTGCGCAGCGACTTCAGGCTTTCGCGCAGGACACTTACCTGCAGATAG
CTGCTTCACTGCGCGCATCGACCAAGGAGTGAAGGCTCAGCAGAGCTGGCCCACTCCACAGGCGCAC
GTGCTTGCGCCCCAGAGTTTCAACAAACAGACAGTGGCAAGTTCTGAGCAAGCTGCAGGCCGTCTGGATGACC
TGTGGGAAGACATCACTACAGCCTTCATGACCAAGGCCACAGCCTTGGGGGACCCCTGAGGATCTACCTGCC
CAGGCCCATTCOCAGCTTCTTGTCTGGGGAGCCTTGGCTCTGAGCCTCTAGCATGGTTAGTCTTGAAGTGGC
CTGTTGGTGGAGGGTGAAGGTCCTGTGCAGGACAGGAGGCCACCAAGGGGCTGCTGTCTCTGCAATATCCA
GCCTCTGCGACTCCCAATCTGGATGCAATTACATTCACCAGGCTTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 52

MASMAAVLTWALALLSAPSATQARKGFWDYFSQTSQDKGRVBIHQKQKAREPATLKDSLEQDLNNMKFLEKLR
PLSGSEAPRLPQDFVGMRRQLQEELEEVKARLQPYMAEAHELVGWNLBGLRQQLKPYTMDLMEQVALRVQELQEQ
LRVVGEDTKAQLLGGVDEAWALLQGLQSRVVHRTGRFKELFHPYAKSLVSGIGRHHVQELHRSVAPAPASPARLS
RCVQVL SRKLTLLKAKALHARIQQNLQDLREELSRFAAGTGTTEGAGPDP

Signal sequence: Amino acids 1-23

Glycosaminoglycan attachment site: Amino acids 200-204

cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site:
Amino acids 233 -237

N-myristoylation sites: Amino acids 165-171;265-271

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 53

CGCCGCCGCGCCTGCTGGGCGGGCCGAGGATGGGCGCAGCGCCTCGGCGGCCAGGCTGCTCCCTCCGG
CAAGCTGCTAACTTCCCGCGCTACGTCCCGTTCGCCGCGGGCGCGCCCGTCTCCCGCGCCCTCCGGGTG
GGTCTCCAGGAGCGCCAGGCGCTGCCGCGTGTGCCCTCCGCGCTCGCCGCGCGCGCGCTCCCGCGCTGC
GCCAGCGCGCGCGCGCCGCGCGCCAGTCTCGGGCGGTCA~~TG~~CTGCCCTCTGCTCGTGGCGCCCTGCTGCTG
GCCGCGGGCGCGCGCCGAGCCTGGGCGACGAAGCCATCCACTGCCCGCCTGCTCGAGGAGAGCTGGCGGC
TGCCGCGCGCGCTGGGCTGCGAGGAGCTGCTGCGAGAGCGGGCTGCGGCTGTTGGCCACTTGGCGCTGGGC
TTGGGATGCCCTGCGGGGTGTACACCCCGTTCGGGCTCGGGCTGCGCTGCTACCGCGCCGAGGGGTGGAG
AAGCCCTTGACACACTGATGCAAGGCGAAGGCGTGTGATGGAGCTGGCGGAGATCGAGGCCATCCAGGAAAGC
CTGACGCCCTCTGACAGGAGCAGGGGTGACCAACCCCAACACAGCTTCAGCCCTGTAGCGCCATGACCGCAGG
TGCTTGACAGAGCACTTCGCCAAATTCAGACCCGAGGACCCAGTGGGGCAGAGATGAAGGTCAATGGGGCGCC
CGGGAGATGCCCGGCTGTGCCAGGCTCTGCGCAGAGCGAGCTGCACCGGGCTGTGAGCGCTGGCGGCT
TCAAGAGCCGACCCACAGAGGACTCTCACTATCCCATCCCACTGCGAGCTGCGACCGCAAGCGCACTTCAACCC
AAGCAGTGTCAACCGACTCTGGATGGGCGAGCTGGCTGGCAAGTGTGTGTGGACCGGAAGAGCGGGGTGAAGCTT
CCGGGGGCTCGAGCGCAAGGGGGAGCTGACTGCCACAGCTGGCTGACAGCTTCGAGAGTGAAGGCTGCGCA
GCAGGCCAGGAGACTCAGCGTCCCTGCTACTCTGTGTCTGGAGGCTGCGAGCTGACCCAGAGTGGAGTCTGA
GTCTGAGTCTGTCTCTGCTGCGGCCAGAAATTTCCCTCAATGCGCGTGTGACAGTGTGCGTGTGCGTGC
GTGTGTGTGTTGTGAGCATGGGTGTGCCCTGGGGTAAGCCAGAGCCTGGGGTGTCTCTTTGGTGTACACAG
CCCAAGAGGACTGAGACTGGCACTTAGCCCAAGAGGTCTGAGCCCTGGTGTGTTCCAGATCGATCTGGATTCA
CTCACTCACTCAITTCCTTCACTCATCCAGCCACCTAAAAACATTTACTGACCATGTACTACGTGCCAGCTCTAGT
TTTCAGCCTTGGGAGGTTTATTCTGACTTCCTCTGATTTTGGCATGTGGAGACACTCTCTATAAGGAGAGTTCAA
GCCTGTGGGAGTAGAAAAATCTCATTCACAGAGTCAAGGAGAGAGACATGTACCTTGACCATCGTCTTCCTC
TCAAGCTAGCCAGAGGTTGGGAGCCTAAGGAAGCGTGGGTTAGCAGATGAGTAATGGTTCAGAGGTCCAGACCC
ACTCCCAAGCTCAGACTTGGCAGGCTCCCTTTCTCTCTTCCCGCAGGTCTTCTCTTAAAGTCTGCTGTGAC
CATCTGCTTGGTTGGCTGAGACTGAGAGCCCTGCTGGAGAGCGAAGGGGTCAAGGAAGACTTGAAGCAG
AGGCTAGGAGGTGGGTACATTTCTCTGAGCAGTCAAGGTGGGAGAAAGATGCAAGATGGACTGAATGTG
CCTAATGGAGAAAGCCCACTGTGCTAGGGATGAGGGGCTTCCTGGGTCTGTCTCCACCCCATTTGTGGTCA
GCCATGAAGTCAACGGGATGAACCTATCCTTCAGTGGCTCGCTCCCTGTAGCTCTGCCCTCCCTCTCCATATCTC
CTTCCCTCAACCTCCCTCCCAACCTCCCTACTCCCTGGGCATCTTCTGGCTTGACTGGATGAGGAGACT
TAGGAACCTACCAAGTTGGCCATGATGTCTTTCTCTCTTTCTTTTAAACAAACAGAACAAAACCAAAAA
TGTCCAAA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 54

MLPLCLVAALLLAAGPGPSLGDDEATHCPFCSEKELARCRPPVGCSELVREPCCGCCATCALGLMPCGVYTTRCG
SGLRCYPPRGVBKFLHTLMHGQGVCMELAEIERAIQESLQPSDKDEGDHPNNSFSPCSAHDRCCLQKHFQAKIRDRS
TSGGKMKVNGAPREDARVPVPGSCQSELHRALERLAASQSRTHEDLYIIPFNCDRNGNFPKQCHPALDGGQRGK
CWCVDRTGVKLPGGLEPKGELDCHQLADSFRE

Signal sequence: Amino acids 1-21
transmembrane domain: Amino acids 51-69 (weak)
N-glycosylation site: Amino acids 125-129
Tyrosine kinase phosphorylation site: Amino acids 191-198
N-myristoylation sites: Amino acids 52-58; 54-60; 64-70; 96-102;
172-178
Insulin-like growth factor binding proteins signature:
Amino acids 52-68
IGF binding protein (less stringent than prosite's):
Amino acids 52-61

[illegible]

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 56

MQSVQSTSFCLRKQCLCLTFLLHLLGQVSGTFLRCFQSYFARLGSPHLVTGLTASSVPAEWFLVSPAFRSLRL
SAALPSARAGALRRRRPAPPGCARCWTAHAHVCPASVARAAQIWSHATRAVASTVIAARTPATRLASARVILL
PLLFDLFSXXXXXXXXXXXXXXXXKRTWVLEHALQILHSFFTVLCSCFSSSSLLFTLLPQYSSGRGR

signal sequence: Amino acids 1-31
transmembrane domains: Amino acids 144-159;186-200
Glycosaminoglycan attachment site: Amino acids 213-217
N-myristoylation sites: Amino acids 27-33;52-58;96-102
Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site:
Amino acids 187-198

61

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 57

GACCCGGCCATGCGCGGCTCGGGCTCTGGCTGCTGGGCGGATGATGCTGCTCGGATTCGCCCCAGCCGGCCC
 TGGGCCCTCATGAGCAGTATGAGGTGCTGTTGCCGCGGCGTCTGCCAGGCCGCCGAGTCCGCGAGCTCTGCC
 TCCACTTGGGCTTGACCCAGAGAGGGTGAGCTACGTCTTGGGSCCAAGGGCAACTTCAACCTCCACCTG
 CGAAGAACAGGGACCTGCTGGGTTCGGCTACACAGAGACCTATACGGCTGCCAATGGCTCCGAGGTGACGGAG
 CAGCCTGCGGGCAGGACCACTGCTTATACAGGGCCACGTAGAGGGGTACCGGACTCAGCCGCGAGCCTCAGC
 ACCTGTGCGGGCTCAGGGGTTCTTCCAGGTGGGGTCAGACCTGACCTGATCGAGCCCTGGATGAGGTGGC
 GAGGGCGGACGGCACCGCTGTACAGGCTGAGCACTGCTGCGAGACGGCCGGGACCTGCGGGGTCAGCGACGAC
 AGCTTGGGCGAGCTCTCTGGGACCCCGGACGGCAGCCGTCTTCAAGGCTCGGCGGGGACTCTCTGSCATCCGGA
 GAGACCCGCTACGTGGAGCTGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 CTTGTATCGGTCTGTGAGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 GGCCTGAGATTTGTGATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 ACCTGGCAGGCTCGGGCAACGGACACGGCGGCACTGCTATGACAACTGTACAGCTCATCAGGGTGTGTGACTTCA
 GGGACTACTGTGGGTTTTGCAGGGTGTTCGACATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 AAGAACCCCGTGGGCTGGCTTGACCATGCGCCATGAGATGGGCCACAACCTGGGCTGTGACCATGTATGAGAAC
 GTCCAGGGCTGCGCTGCGAGGAACCTTCCAGGGCGGCGGCTGCTATGTCAGGGCAGCATTTGGCTTCAGTTTC
 CCCAGGATGTTCAGTGTGCTGAGCCAGGCTTACCTGAGAGGTCTTTTGGAGGGCGCGAGTGGTGTGTGTGTGT
 AACGCCCTGACCTCAGCCACCTGTGTGGCGGGCCGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 GACTGCGGGCCCCCGAGGACTGCGGGAACCGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 TGTGACCTCGAGGAGTTCTGTGAGCGCGGCAACCTGAGTGGCGGAGAGCGCTTCCAGGAGAACGGCAGCGCC
 TGTCTCGGGGGTACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 GGGCAGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 ATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 GCGCTACACACAGAGGATGGCACTGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 TGGAAAGGACGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 TGGAAACCAAGCAGGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 CAGCAGCGTTCGGGAGCCTCCCGTCTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 GCAGGATCATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 GGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 CCGTCCAAACCCCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 CCCCAAGAGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 CCGCCCGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 CAGGTATCAAGCCACGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 GCTGTGGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 GCACCTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 CCAAGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 CATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 GCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 GCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 CTGAGCGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 ACCAGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 CTGATCTTGGGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 CCTTTATGAAAGGGCTATGTGGGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 AGGGCTGAAAGCTTTTATTTTAAATAATGAGAAATGTATATTTTACTAATAAATTAATGACCGAGTCTGTAGA
 TTCTTGTATGA

57/70

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 58

MRGLGLWLLGAMMLPAIAPSRPNALMEQYEVVLPRRLPGPRVRRALPSHLGLHPRVSYVLGATGHNFTLHLRKN
 RDLLGSGYTTETTAANGSEVTEQPRGQDHCLYQGHVEGYDASAASLSTCAGLRGFFQVGSDDLHLIEPLDEGGEGG
 RHAVYQAEHLLQTAGTCGVSDSLGSLGPRTAAVFRPRPGDSLPSRETRYVELYVVVDNARFQMLGSEAAVHR
 VLEVNVHDKLYQKLNFRVVLVGLIWNNSQDRFHVSPDPSTLENLLTWQARQTRRHLHDNVQLITGVDFGT
 VGFARVSAMCSHSSGAVNQDHSKNFVGACTMAHEMGNLGMDDHENVQGCRCQERFEAGRCINAGS1GSSFFPM
 FSDCSQAYLESFLERFQSVCLANAPDLSHLVGGFVCGNLFVERGEQCDGPPEDCRNRCCNSTTCCQLAEGGAQCAH
 GTCCQCKVKPAGELCRPKKMDLLEFCGGRHPECPEDAFQENGTPCSGGYCYMGACPTLAQQCAFWSPGGQA
 AESCFSTIDLLPGCKASRYRADMGVLQCKGSGQLGSAICIVDVCHALTTEDGTATPEPVEGTRCCGPKVCWK9
 RCQDLHVIRSSNCSAQCNHGYCNHKKQECHCHAGWAPPKAKLLTEVHAASSSLPLVLVVVLLLAIVLVLTA
 IVYRKASRLSRNVAPKTTWGRSNPLFHOAAASVPAKGAAPFSGPQELVPTTHFGQPARHPASSVALKRPP
 APPVTVSSPPFPVYVTRQAPKQVIKPTFAPPVPPVKPGAGAANPGPABGAVGPKVALKPP1QRKQAGAPTAP

Signal sequence: Amino acids 1-19
 Transmembrane domain: Amino acids 653-674
 N-glycosylation sites: Amino acids 67-71;91-95;436-440;612-616
 Tyrosine kinase phosphorylation sites: Amino acids 100-108;601-609
 N-myristoylation sites: Amino acids 80-86;92-98;101-107;146-152;
 149-155;217-223;293-299;298-304;327-333;
 366-372;407-413;445-451;495-501;506-512;
 522-528;538-544;550-556;789-795
 Neutral zinc metalloproteinases, zinc-binding region signature:
 Amino acids 331-341

PCT/US00/03565

FIGURE 59

CGAGCGCGTGGGACCCATATCTGTCTGTCTGTATCTATGACAAAGAGCGGGCTGCTAGGCCCTCTGTGCCCGGGCTT
GGAAATCGGTGGAGATGGCCATCTCGATGATGACCGCGCGCGCCCGCTGCAGAAATAGGTGTGGCTCTGTGTAAACG
CTCTCCAGCGGGATCGGCTTGTGCATCTGCGCGGGCTTTGGACCGCGCGGGGCGGCTCTGTCTGAGTAAAG
ATGCGACGAAATGTGGACGAGCGCGGTGTGACCGCTGACGAGGAGAGAGGCTGAGCGTGTGACGGAGCGAG
GTGTGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
CAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
CGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
TGGTGAATGTCTCTCTATGACAGCCTTCAAGTCATCTCTGGCTGCTCACTCTGTTACAAATCTGACATAAGACGCT
TGTCTGGCTGTGACCAAGACCGCTGGCCTATGCTGACCGCTGGCCCGACAGAAATTAAGGGTGTGAATCTGGCTAGC
TCTTAACAGATCACTTTCAGCGAGTCGCTGTGATGTGACAGAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
TAAGAAGAGTTAGGACGACAGAGAGATTTGTGTGGTGGCTGTGTCTCTGTGTGCTCTGAGATGTGACGCTACATCA
CTGGGAGAAACAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TGGGCTCTAGCTCTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
CTCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAAT
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TGTGGCAAGAGAGAGATTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
AAGGAGCAGAGTGTCAAAATTAACAGCTGTGCAATGAGGTGTGCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA
AAAAAA

15-

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 60

MHKAGLLGLCARAWNSVRMASSGMTRRDPLANKVALVTASTDGIGFAIARRLAQDGAHVVSRRKQQNVDQAVAT
LQGBGLSVTGTVCHVGKAEDRELRVATAVKLHGGIDILVSNAAVNPFPGSIMDVTEEVWDKTLIDINVKAPALMTK
AVVPEMEKRGGGSVVIVSSIAAFSPSPGFSFYNVSKTALLGLTKTLAIKLAAPRNIRVNCIAPGLIKTSFSRMLWM
DKEKEESMKETLRIRRLGEPEDCAGIVSFLCEDASYITGETVVVGGGTFSRL

Signal peptide: Amino acids 1-15
N-glycosylation site: Amino acids 183-187
N-myristoylation sites: Amino acids 43-49; 80-86; 191-197; 213-219;
272-278
Microbodies C-terminal targeting signal:
Amino acids 276-280
Short-chain alcohol dehydrogenase: Amino acids 162-199

120

60/70

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 61

ATGGAACTTGGACTTGGAGGCTCTCCACGCTGTCCCACTGCCCTGGCCTAGGCGGCAGCCTGCCCTGTGGCCC
ACCTTGCCGCTCTGGCTCTGCTGAGCAGCGTCGCAGAGGCTCCCTGGGCTCCGCGCCCGCAGCCCTGCCCC
CGCGAAGGCCCCCGCTGTCTGGCTCCCGCGCGCCACCTGCGGGGGGACGCAAGGCCCGCTGGTGCAGT
GGAAGAGCCCGCGCGCGCGCGCAGCTTCTCGGCCCGCGCCCGCGCGCTGCACCCCACTGCTCTTCCC
CGCGGGGCGCGCGCGCGCGCTGGGGGCGCGGGCAGCGCGCTCGGGCAGCGGGGGCGCGGGGCTGCGCGCTG
CGCTCGCAGCTGGTGGCGGTGCGCGCGCTCGCGCTGGGCCACCGCTCCGACGAGCTGGTGCGTTTCGCGCTTCTGC
AGCGGCTCCTGCGCGCGCGCGCTCTCCACAGACCTCAGCCTGGCCAGCCTACTGGGCGCGGGGCGCTGCGA
CCGCCCCCGGGCTCCCGGCCCGTCAGCCAGCCCTGCTGCCGACCCACCGCTACGAAAGCGGTCTCCCTCATGGAC
GTCAACAGCACCTGGAGAACCCTGGACCGCTCTCCGCCACCGCTGCGGCTGCTGGCTGA

/ /

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 62

MELGLGGLSTLSHCFWPRQPALWPTLAALALLSSVAEASLGSAPRSPAPREGPPFVLASPAHRLPGGETARWCS
GRARRPPQPFSRPAPPPFAPPALPRGGRARAGGPGSRARAGARGCRLRSQLVFVRALGLHRSDELVRFRFC
SGSCRRARSFHDLSLASLLGAGALRPPPGSRFVSQPCRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATAACGLG

signal sequence:	Amino acids 1-39
N-glycosylation site:	Amino acids 202-206
N-myristoylation sites:	Amino acids 6-12;67-73;102-108;109-115; 119-125

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 63

GAAGAGGCAACACAGAGCTCCCTATTGTGAAATAAAACCCATTTCAAAAGTTATTGGAAAGAAAGTAAGGTTAC
TGGTGGGAGGCTGAGCCGGTGGAAAAGACACCGGGAAGAGACTCAGAGGCGACCATAAATGTCGTTACGTGTACAC
ACTCTGCCACCCCTGCTTGGAGCGTCTGTCAGACCGGGCTGCAGGGAGCTGCTGTGTTGCTGATGATCACAAG
ACTGTGGGCCCTGCTGCTCTGGGGTGTGCCCCACCGCTTGCACTCTGTGCCACTGACATGTCAGCTGCACCAAC
AAAAACCTGTCCAAAGTGCTGGGAACCTTTTCAGACTGATTAAAGAGACTGGACCTGAGTTATAACAGAATTGGG
CTTCCTGGATTCTGAGTGGATTCCAGTATCGTTTGGCAAAGCTGAACACCCCTAATTCTTGTCTATAACACATCAC
AGCATTTCACGGGCGAGTTTTCACAACTCCAAATTTGAAGTGTCTTGACTTATGCTCCAAATAGCTGAGAGAG
GTGAAAAATGCTGTATTCAGAGTGTGAAGTCTTGGAAAGTCTTCTGCTTTTACAAACATCACTATCCCTATCTC
GATCCTTCAGCCGTTTGGAGGCTCTCCCAAGTTGCAAGAACTCTACTTAAGTGGAAATTTCTCACACAGTTTCCG
ATGATTTGTATGTTGGAAAGTTCAAGCTGGCGAAGACTGATGTTTTTAGATGTTTCTTATACCGAAATTCCTTCC
ATGCCAATGCAACACATAAATTTAGTGCACGGAACACAGCTGAGAGGCACTACCTTCTATGGAACCCATTGTCTC
TGTGACTGTTCCCTGTACTCCTTGTGCTGTTCTTTTGGTATCGTAGGCACTTTAGCTCAGTGATGGAATTTAAGAAC
GATTACACCTGTGCGCTGTGGTCTGACTCCAGGCACTCGCGTCAGGTACTTCTGCTCCAGGATAGCTTTATGAAT
TGCTCTGACAGCATCATCAATGGTTCCTTCTGTGCGCTTGGCTTTATTCATGAGGCTCAGTCCGGGAAAGACTG
ATGGTCCACTTAATTTGTGCTATAATTGTATGATGTCATAATTAACTGTTCATATTAACTTTGTGTGCTGCT
CTGCAAAATAACAGCAGGACAGAAATTTGTGTTGTTTGTCTTTGAATACCAACCAATTCCTTAAAAATGATT
GGTAGGAATGAGGTAAAGTACTTCAGTTCCCTCAATGTGCCAGAGAAAGATGGGGTTGTTTCCAAAGTTTAAAT
TCTAGATCAATATCTTAGCTTTTAGCACTATTGGTAATTTCAAGTAGGCCCAAGGTGATATGACTCCCAAT
GTCCCTTTATTTAGGATATTGAAAGAAAAATAAACTTTATGATTAGTGTCTTTAAAAATAGACTTTTGCTAAC
TTACTAGTACAGAGTTATTTAAAGAAAAACCTAGTGTCCAAATTTCAATTTTAAAGATGTAGAAAGAGAAAT
CAGCATCAATTAATATTAAGCTTAAGCAAGTGAAGTTTGGGGTTATTCAAGCAATTAACCTTTTACAC
CAGATGATAGACTACACTGATAAATGTACTGGATAATGCCACATCCTATATGGTGTATAGAAATAGTGCAA
GGAAAGTACATTTGTTCCCTGTCTTTTCAATTTGTATATCTTCCCAATCTGTATTTCTGTACAAAGATCTCA
TTGAAATTTTAAAGTCACTATAATTTGTGCTATAATATGTAAGTGTCAATACCAAAATGCTGAGTAACTTCT
TAAATCCCTGTTCTAGCAAACTAATATTTGGTTCATGTGCTTGTATATGTAAATCTTAAATTTATGTGAATTTG
AAATAGACCTTACTGTACTGTGCTTTGGACATTTGAATTAATGTAAATATATGTAATCTGTGACTTGAATATTTG
TTTATTTGGCTATTTAAAAACATAAATCTAAATGTCTTATGTTATCAAAAAA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 64

MSLRVHTLPTLLGAVVRFGCRELLCLLMTTVTVGPGASGVCPTACICATDIVSCTNKKNLSKVFGNLFRLIKRLDL
SYNRIGLLDSEWIPVSFAKLNTLLRHNNITSISTGSFSTTPENLKCLDLSNNKLTVKNAVFQELKVLEVLVLLYN
NHISYLDPSAPGGLSQLQLYLSGNFLTQFPMDLYVGRFKLAEMLFLDVSYNRIPSPMPHHINLVPGKQLRGIYL
HGNPFVCDCLYSLLLVFWYRRHFSSVMDPKNDYTCRLWSDSRHSRQVLLQLQDSFMNCSDSIINGSFRLGFIHEA
QVGERLMVHLICAYICMMS

signal sequence: Amino acids 1-38
N-glycosylation sites: Amino acids 58-62;104-108;281-285;
288-292
Tyrosine kinase phosphorylation site:
Amino acids 71-78
N-myristoylation sites: Amino acids 39-45;81-87;111-117;174-180;
289-295
Prenyl group binding site (CAAX box):
Amino acids 316-321
Leucine zipper pattern: Amino acids 170-192

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 65

GCGCCCTGAGCTCCGCCCTCGGGCCCGATAGCGGCATCGAGAGCGCTCCGTCGAGGACAGGCGGGCGCAGGGGG
 CCGCGGGGCGAAGGAGGATGAGGGGGCGCAGCAGCTGCTGACCTGACAGAACAGGTGGCGCGGCTGAGGAGGG
 AGAACCGAGACTTTCTGGCTGCGCTGAGGAGCCGCTATGAGCAGTACAACTGACAGAGCGACCGGCTGCGTGAAC
 AGCAGAGGAGATGTTGGAACTGCGGCTCGGTTAGAGCTGGTGGCGCAGGCTGGGGGGGCTGCGGCTCCTGA
 ATGGCTCGCTCCCGGGTCTTGTGCTCGAAGCTCATACAGCCCGCTGGGGGGTGGCCACGCGCATGTGCTGG
 GCATGGTGGCGCTGCTGCTGCTCCCTGGAGATGAAGTTGGCTCTGAGCAGAGGGGAGAGCAGGTGACAAATGGCA
 GGGAGGCTGAGCTGAGTTGCTGACTGAGTGAACAGGCTGGGAGTGGCTCTCAAGCTCTTACAGAGAGAGAGG
 AGAGAGAGAGCGCGCGAGGCGGACCTTACACCTCGCGAGAGATAGAGATCAGCACTGCACTCAGAGAGCGGGGG
 CACCGCCAGAGAGTCTGCGCAGAGAGAGAGGCGCCAGAGCTTGGCTTGAAGAGTTGGATGAGCCATTCTCAGGCT
 CCAGAGCAGTGTGGTGGAGCAGGCGCGAGTTCAAGCCCGCAGGTCGCCCTGACACAGCTCTAGAGTGGCGGC
 TGGCCCGAGGCGCAGCAGAGATCCGCGAGCTGGCTATCAACCTCCGCTAGAGAGAGGCTTATTGGCGAGCTGG
 TCCGACAGAGAGAGGAGCTCAGGCGCTGACCGCGCAGCAAGCCAGCGTATCCGGAGCTGGAGCAGGAGGCGAG
 AGCAGGTGCGGGCGAGCTGAGTGAAGGCGCAGAGGAGCTGCGGAGCTGAGGGCAGAGAGCTCCAGGATGCTG
 GCGAGCGGTCTCGGCTCCAGGAGTTCCGCGAGAGGGTGGCTGCGGCGCAGAGCCAGGTGCAAGTGTCTGAAGGAGA
 AGAAGCAGGCTACGAGAGCGGCTGGTGTCACTGTGCGGCCAGAGTGAAGAGCAGCTGAGGAGCTGAGCGGAAAG
 TGCAGCTCATGCGGAGCAGCAGGGAAGCTGCGAGAGCGGCTTCCGAGGAGAGCGAGCAGAGCGCGCGCTGG
 AGGCAGAAATGAGCAGCGCAGCAGCCGCTCAGAGAGCTGAGCTGAAGCATGAGCAACAGCAGAGAGATCCTGA
 AGATTAGAGCGAAGAGATCGCGGCTTCCAGAGGAGAGGCGCAGTGGCAGCAAGGCTCTGTGGTCAAGCTGG
 AACAGCAGCAGAGAGATTAGGAGCAGAGAGAGTGGCTGGACAGGAGATGGAGAGGTGCTACAGCAGCGCGGG
 CGCTGGAGGAGCTGGGGAGGAGCTCCACAGCGGAGGAGGCTATCTGGCCAGAGAGAGGCGCTGATGCGAGGAGA
 AGACGGGCTGAGAGAGCAGCGCTGAGATCAGCGCGGCTTCAACAGAGAGATGTTGCGAGTGTCAAGCGGCT
 TGGAGCAGCTGGAGAGAGAGCTGTCAGAGAGAGCGGCGAGCTGCGGAGGCGAGCGCCAGAGCCAGCAGCAGAG
 TCCGCGGAGGAGTCCAGGCTGCGCCAGAGAGAGAGACTCGCTGCTCAAGCAGCGCTGGAGATCGAGCGCAGC
 TGAGCAGGAGGAGTCTGCTGCTCCCGAGGAGGAGCGGAGCTGTTCCAGTTGGATGAGGCGATCGAGGCGCTGG
 ATGCTGCGATGAGTATAGAAATGAGGCGCATCACATGCGCGCAGCGGCTGCTTGGGCTCAGGCTCGTGTGCTGT
 CCCAGTGCAGATGAACCTCATGGCCAGAGCTCAGTACCTCTCATCTCAGAGAGCAGAGCCCTCCTCTGCAAGT
 ATTTTGAACAAGTGTGAGCTCCGAGAGGAGCAGCAGCAGCAGAGATTGCTTCTCGGAGTGGAGATGCGAGC
 TGGAGGAGCAGCAGAGGCTGGTGTACTGGCTGGAGTGGCGCTGGAGCGGCGCGCTGGAGATGAGCCGCGCAGC
 TGAACCTGAGCAGAGAGGAGCAGAGCAGAGACATGAGCTGCTCCTGAGCAGAGTGGAGACCACTCGGTGAAG
 GGTAGCAGCAGAGAGGAGTATGAGGCGCGGATTCAGGCTCTGAGAGAGGAGTGGGCGCTTACATGTGGA
 TAAACAGGAGCTGAACAGAGAGCTCGCGGCTGTGAACGCTGTAGGCCACAGCAGGAGGTTGGGAGAGAGAGGCC
 TGTGCTCGAGGCGCAGCAGGCTCCTGGAAATGAAGATGAGCTCCACCTGGCAGCCGAGCTTCTCTGGCTGCTCC
 CCTCACTGAGGGGGCGCCCGCAGCCCGAGAGGAGCGCGGAGTTGCTCAAGCTCCGTTACCTTGAACCTGGA
 AAGCTCTGAGCTCTGTGTGGTGAAGAGCAGGCGTCCCGAGAGACTGAGGCGAGCGGAGCGGCTGAGCCCTGG
 TGGCGGCGGTCTTCTGTGGTGAAGCAGGCTGCGCTGGAACCTTGGGCTTGTCCAGAGCCCGGCGGGAAC
 TGGAGCAGCGCAGCGCCGCGGATGATTGATGTCCGAAAGAACCCCTGTAAAGCCTTGGGCGAGACCTGCGCTTGG
 AGGAGAGCTCCGAGCTGCTGAAGGGGCGAGCTGCTGTTTGTCTTGTGAGAGGCGAGTCTTACCGCAGACCC
 TAAATCCAGGCGCTCATCTGATCCCTCATCTGGGATCAACAAATTTGGGCGATGGCCAGAGAGACTGGACCTCA
 TTTAAACAAATTAATGCAATTCACCACTTACTTCCATGAAGCTGTGATGCCCAATGCGCGCTTGTGTCTT
 GCTCGAATCTCAGGACATTTCTGTTTCAAGCGTAAATGGATGTCTTGTAGTTCAAGGGTTTGGCCAGAAATCATCA
 CGAAGGGTCCGTGGCAACAGGTTGTGTTTAAATGGTCTTATGTATATAGGGGAACTGGGAGACTTTAGGAT
 CTTAAAGAACATTTAAATAAAGAAATCTTTGAAGGAC

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 66

MEQYKQSDRLREQQEEMVELRLRLLELVRFPGWGLRLNLGFPFGSFVPRPHTAPLGGAAHVLGMVPPACLPFGDS
VGSEQRGEQVTNGREAGAEILLTEVNRIGSSSAASEEEEEERPPRTLHLRRNRISNCSQRAGARPGSLPERKG
PELCLEELDAAIPGSRVGGSKARVQARQVPPATASEWRLAQAAQCKIRELANIRMKELIGELVITGKAAQALN
RQHSQRIRLEQGEAEQVRAELSEGQRLRELEGEKELQDAGERSRLQEFRRVAAASQSVQVLKCKKQATERLVSL
SAQSEKRLQELERNVQLMRQQQQLQRRLEETEQQKRRLEAEMSKRQHRVKELELKHQQQKILKIKTBETIAAFQ
RKRSSGSGSVVSLBQQKIEBQKKWLDQEMSKVLQKRRALEELGSELHKREAILAKKEALMQBKTLGLESKRRLRS
SQALNEDIVRVSSRLBHLKELSEKSGQLRQSSAQSQQIRGBIDSLRQKEDSLKQRLIEDKLRQSSILLSPEE
ERTLFQLDEATEALDAIEYKNEAITCRQVRLASASLLSQCEMNLMAALSILSSSEFALLCKTFDKVVILREE
CHQQIAFSELEBQLEBQRLVYWLVALEKQRLBMDROLTLQCKEHEQMQLLLQSSRDHLGELADSRROYEA
RIQALEKELGRYMWINQELKQKLGGVNAVGHSGGKRLCSBGRQAFQNEDEKLHLAPELLNLSPITEGAPPTRE
ETRDLVHAPLPLTWKRSSLCGREGQSPERLQREAAKPLVGRVLPVGBAGLPMNFGPLSKPRELRRASPGMIDV
RKNFL

Leucine zipper patterns: Amino acids 557-579;794-816

N-glycosylation sites: Amino acids 133-137;383-387

Kinesin related protein Kif-4 Coiled-coil domain:
Amino acids 231-672

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 67

CCCACGCGTCCGCGGCTACACACCTAGGTGCGGTGGGCTTCGGGTGGGGGCTGCAGCTAGCTGATGGCAAGG
 GAGGAATAGCAGGGGTGGGGATTGTGTTGTCGAGAGGTCCCGGGAACGGGGGCTCGGGGTTCTTTCAGACGA
 GATTCCCTTCAGGCTTGGGCCGGGTCCCTTCGCAACGAGATCCCAATGAACCGGGGCTTCGAGGCGGGTGGTT
 GGGGCTTCCGCGTTCGGGATGGGGCGGTACCTAGCCCGTTCCAGCGCTCAGTCGGTTCCTCCATGCCCCC
 AGAGGTGCGCGGGGCAAGCGCGCGCTCTTCTTCTGCTGGGTGGCATCGTCTGGGGCTACCGCTCTGGTG
 GAAGACCAACGAGACCTACCGGCTCGTTGCTTACTCCAGATCAGTGGCTGAATGCCCTTCAGCTCCGCT
 CATGGTGGCTGTACCTGTCTGTTTACCGCGGAGTCACTGCTCCCTGGACACGAGGAGAAGCTGCCCTTCACCGT
 TGTGCTGAAGGAGGATTCCTCTGAATACAAATGAAATCAATGCCGTTTCAGAGGCTTATCGAGGGCT
 TTGAGCCATGAGGAGGAGGCTGCTCATCGGCACTGTGCAAGAGGCAAGGCTTTAGATGAGCTCAGGA
 ACAGCGGAGGGCTCCCTGACTGTGTACCTGATACTGAACACTCTCACTTCTTCCCAAGGACATGATGAGCTA
 CATTTGGGCCAAGAGGACAGCAGTGTGCGGGGATATGCAACCGGAGGCTTTAATCATCATTTGGCCGCGCAT
 AGTCCAGGTGGCCAGGCCATGTCTTTGACTGAGGATGTGCTTGCTGCTCTCTGGCTGACCACTTCACAGGGA
 CAAGTGAGGCGCTGAGAGAGGGGCTCTCAAGTCCAGCTTGGGCTATGAGATCACTTCAGTTTACTCAACCC
 AGACCCCAAGTCCCATGATGTCTACTGGGACATTTAGGGGGCTGTCCGCGCTATGTGCAACCTTTCTGATGC
 CCTCGGTGCGCTGGCACTCTCTGTGACCTCTCAGATTCTTTACTATGCAATGTTGGGGTGAATCCCGCTT
 TGACTCAGCTTCTCCAGCTACTATTTGGACATGCAAGCTCCCAATGTCAATCAACCAAGTGGAGTCCCGCT
 GGGTCCAGTCTGCTCTCTGTACCTGTGCTCACTTTCTACTCTAGTCTGAGCTTGACACATCAACGCT
 GTACATTCAGGACAGGATGGGCTCCAGTGGCCACCATGCTTCCATAGTCCCGCTGGGTGGCATTTATGGT
 ATATAATGTGACTCCAAACCTATAATGCTCAGTCTGCCAGTGAGGTGAGGTGGACATGTTGCGAGTGAT
 GGAGGTGTCTCGGCAAGGTTGGGTGTCTTTGGGATTGCTCAGCCCCAGCTGCTCCAAATGCTGCTTTC
 AGGGCTTACAGGTGAGGGTATGACCTGGGAGCTAGACCGCTGCTCTGCGCTGCTCAGTGGAGAACCTGG
 CACGCGCACCAACCTTACCTCTCTGGCGGAGCTTGGGCAAGTACAGACATGTCTATTAAGGACGCT
 GGCATCTGAGGTGTCAAGGCTGTAGTGGCTCCAGAGTCCGCAAGAGTGGGCTTGGGCACTTGGCATC
 TGCTTTGGCGCAGCAGGAAGTGTGACATCTCTGAGCTTGCCTTCTTGAACCGCTCACTCTCAACCTCTCT
 TTATTTCCCTGATGACCAAGGTTTGCCATCTACATCCCACTCTTCTGCTTATGGCTGTGCCATCTCTCTGT
 CCTGTCAAGATCTCTTGGAGACCGCAAGTCTTGGAGAAAGCTGAGAGACAGACTGAGCAGGGCAGCACT
 CCATAGGAGGCTTCTTCTTGGCCAGGTGGGCGTGTAGATTGTGAGGACAGTACATGGGGCTTCCCGGAAT
 GACTTAAATATTGTCTCAGTCTCACTGTGGCTCTCCAGCAACCAAGTACAACTCCAGATGGGTTCTAT
 CTCTTCTTCTTCCATCACTGGCTCAATCTCTCTCCACCAAGGGGCTCAAAAGGCACATCATCGGGT
 CTCTTATCTGTGATAGGCTGCTGCTCTCTCTCTGTTGGGAGGAGCTTGTCTTCTTCTTGGCCCATTC
 TCAACATAGCACTTGTGCACTGAGAGGAGGAGCATTTAGGGAAGTCCCTGCTTCCACACTCTCTCTAGT
 CCTGTGGGACAGCCCTAGCCCTGTCTGTCATGAAGGGGCAAGGATTTGTCACCTGTGGGACCTTCTCTCTC
 TCCCTCTCTCTAGTTGGCTTTGTCTGTCAAGTGGAGTCTGGCGGAGTCCAGGAGGAGCAGCTCAGGACATG
 GTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 AACAAGTCTGAAATCAATCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 GAGCTCTGATTTTCAATTTGTTCAAATGGCACTGATGATGCTCTCTTCAAGATGTTGTGAGGAGTAAATGTG
 ATCAGCTGTAAAGTGTCTGGCGTGTAGTAGGCTCTTAAATACACTGGCTGAATATGAATGGAATGAT

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 68

MPSEVARGKRAALFFAAVAIVLGLFLWWTETTYRASLPYSQISGLNALQLRLMVPVTVVPTRESVFLDDQEKLP
FTVVHEREIPLKYKMKIKCRFQKAYRRALDHEEALSSGSVQEAEMLDPEQBAEGSLTVYVISEHSSLLPQDM
MSYIGPKRTAVVRGIMHREAFNIIGRRIVQVAQMSLTEDVLAALADHLPEDKWSAEKRRPLKSSLGVEITPFL
LNPDPKSHDVYWDIEGAVREYVQPFLLNALGAAGNFVDSQILYYAMLGVNPRFDSASSSYLDMSLPHVINPVE
SRLGSSAASLYPVLNPLLYPELAHSLPLYIQDKGAPVATNAFHSRPGGIMVYNVDSKTYNASVLEPVRVEVDMV
RVMEVFLAQLRLPLGIAQPQLPPKCLLSGPTSEGLMTWELDRLLMARSVENLATATTLTSLAQLLGKISNIVIK
DDVASEVYKAVAAVQKSAEELASGHLASAFVASQZAVTSSELAFFDPSLLRLLYFPDDQKFAIYIPLFLPMAYPI
LLSLVKIFLETRKSWKPEKTD

Signal peptide:	Amino acids 1-23
Transmembrane domain:	Amino acids 42-60;511-530
N-glycosylation sites:	Amino acids 259-263;362-366
Casein kinase II phosphorylation sites:	Amino acids 115-119;186-190;467-471; 488-494
N-myristoylation sites:	Amino acids 255-261;304-310;335-341
Amidation site:	Amino acids 7-11;174-178

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 69

CCCAAAGAGGTGAGGAGCCGGCAGCGGGGGCGGCTGTAACCTGTGAGGAAAGGCTGCAGAGTGGCGACGCTACGCC
GTAGGTTGGAGGCTGTGGGGGGTGGCCGGGCGCCAGCTCCAGGCCGCGAGAAGTGACCTGCGGTGGAATTCCTC
CTCGCTGCTGGAGAACGGAGGGGAGAGGTTGCTGGCCGGGTGAAGTGCCTCCCTCTGCTTGACGGGGCTGAGGG
GCCCGAAGTCTAGGGCGTCCGTAGTCCGCCCGGCTCCGTGAAGCCCGAGGCTCTAGAGGATATGACCCGAGAGTGC
CCATCTCCGGCCCCGGGGCTGGGGCTCCCGCTGAGTGGATCGGTGCTGGCAGAGGGCGAGTAGTGTITGCAGTG
GTGCTGAGCATCCACGCAACCGTATGGGACCGATACTCGTGGTGGCCCGTGGCCCTCGCAGTGCAGGSCCTTCTAC
GTCCAAATACAGTGGGACCGGCTGCTACAGCAGGGGAGCGCCGTCTTCCAGTTCGGAATGTCCGAAACAGTGGC
CTATTGGCCCGCTCCATGGTCTGCTTTGCTTGGACTAGTCAATGAGGAGCGGTGCCAGACTGCTGGGAACCG
TTCTTTGAGCGTTTGGCATTTGGTGGCAGCCACTGGCATGGCAGTGGCCCTCTCTCATAGTGTGGCGCTC
GGCATCACTCGCCAGTGGCCAAACAACTTGTGTCTCTTGGGCTTGGCTGGAGGTGTATCATTTATATCATG
AAGCACTCGTTGAGCGTGGGGAGGTGATCGAAGTCCCTGGAAGTCCCTCTGATCTTCTTATCTCAACATGATC
CTGCTGTACTGCTGGCCCGCTGCTTCAACCCTGGTGAGGCACTGTGCTATTGGGTGGCATTAGCTTTGTCCCTC
AACCAGCTCATCAAGCGCTCTCTGACACTGGTGGAAAGTCAGGGGGACCCAGTGGACTTCTTCTGCTGGTGGTG
GTAGTAGGGATGGTACTCATGGGCATTTTCTCAGCACTCTGTGTTGTCTTATGGACTCAGGCACCTGGGGCTCC
TCCATCTTCTCCACCTCATGACCTGTGTGCTGAGCCTTGGTGTGTTCTTACCTGGCTGACCGGCTCATCGC
AGGAATCCCTGCTCTGGCTTCTTCAATTTCTTCCAGACAGACACCCGCTCTACCTCTAGCCTATTGGTCT
CTGCTGGCACTTGGCTGCTGCTGGTGGTGTGTACCAAGTGGCAAGCGGTCTCTTCCAGTCCAGAGAC
CAGGCCCCCACTATCGCCGAAAGTATTTCCACCTCATTGGTGGTAGCCACTCATCCAGGTATCATCTTTGAC
CGGCCACTGCTCTATGTAGCCGCACTGTATGCTGGCGGTCTTCTATCTTCTGGAGTATGTGGCTACTTCCGC
ATCAAGCTTTGGGTCACTCTACGAGCTTCTGTCCCTTTTCTGGATGAACGAGACATGGACCACTCAT
CTGACACACTTACCTGCTGGCAATGTCTTCCCATCTGGTGGATCCCGAGCCCTGACACAGAGGT
AGCTGGGAGAGCCAGGGCCCTCGTCCCTATGCCCGGTGTCTGGCTGTGGGTGTGGGTGATCTTGGCCCTCC
ATCTTCGTAGCACCATGGGGGAGATCCGCTGGCTGGAAACAAAGACTTTTGGGGGACCATGACATCTATA
TTTTGGGAGTCAATTTCTGTAGCTCTGATCTTAATCTTTGACAGTGGAGTGGACCTAAATACAGTATGCTTGG
ATTTTGGGTCCATCAGCACTGTGTCCCTCTGGAAGCATACACTACAGATAGACAAATCTCCTCTGCTCTC
TACCTCTGATATTGTGATGGCTAGCTGTTACAGTGACAGCAGTGAACGAGGAAACAGACATGGGGAGGGT
GAACAGTCCCAAGACAGACAGTACTTGGGCTGAAGAGCCAGGTGTGAAGAGCATTTGATTTTTCAGTGT
ATTGAGATTAAATAAAAGCAAAGCTCTCTAGTCTTA

WO 01/53486

PCT/US00/03565

FIGURE 70

MTRECPSPAPGPGAPLSGSLAEAAVVFVVLSTHATVWDYRSCAVALLAVQAFFVQYKWDRLQLQQSSAVFQFRM
SANSGLLPASMMVPLLGLVMKERCQTAGNPFERFPGIVVAATGMAVALFSSVLALGITRFPVPTNTCVILGLAGGV
IIYIMKHSLSVGEVIEVLEVLLIFVYLNMLLYLLPRCFTPGBALVLGGISFVLNQLIKRSLTLVESQGDPEVDF
FLLVVVVGMVLMGIFFSSTLFVFMDSGTWASSIPFHLMTCVLSLGVVLPWLHRLIRRNPLLWLLQFLFQTDTRIYL
LAYWSLLATLACLVLVLYQNAKRSSSESKKHQAFTIARKYFHLIVVATTIPGIIIDRPLLYVAATVCLAVFIFLEY
VRYFRIKPLGHTLRSFLSLFLDERDSGPLILTHIVLLGLMSLPWLIIPRPTQKSSLGGARALVPYAGVLAVGVG
DTVASIFGSTWSELWPGTKTTFEGTWTSTIFAQIISVALILIFDSGVDLWYSYAWILGSSISTVSLLEATTIQIDN
LLLPLVLLILLMA

Signal peptide:	Amino acids 1-36
Transmembrane domains:	Amino acids 77-95;111-133;161-184; 225-248;255-273;299-314;348-373;406-421; 435-456;480-497
N-glycosylation site:	Amino acids 500-504
cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site:	Amino acids 321-325
N-myristoylation sites:	Amino acids 13-19;18-24;80-86;111-117; 118-124;145-151;238-244;251-257;430-436; 433-439;448-454;458-464;468-474;475-481; 496-502;508-514
Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site:	Amino acids 302-313

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern: Application No PCT/US 00/03565
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/574 C12N15/62		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL - EMBEST_HUM3 [Online] Entry/Acc.no. AI079861, 13 August 1998 (1998-08-13) STRAUSBERG, R.: 'oz50b04.x1 Soares_senescent_fibroblasts_NbHSF_Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1678735 3' similar to TR:035608 035608 ANGIOPOTETIN-2.; mRNA sequence." XP002143096	1-11, 16-22, 49-70
Y	the whole document	23-48
Y	SHINJI, T. ET AL.: "Biologic significance of angiotensin-2 expression in human hepatocellular carcinoma." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATIONS, vol. 103, February 1999 (1999-02), pages 341-5, XP000929336 the whole document	23-48
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 July 2000		Date of mailing of the international search report 25. 10. 00
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Smalt, R

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/03565

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL - EMEST HUM5 [Online] Entry/Acc.no. A1363021; 7 January 1999 (1999-01-07) STRAUSBERG, R.: "qy81h12.x1 NC1 CGAP Brn25 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2018471 3', mRNA sequence" XP002143097 the whole document ---	18,19, 49-53, 55,57, 69,70
A	WO 94 00603 A (CORDON CARDO CARLOS ;SLOAN KETTERING INST CANCER (US); FINLAY CATH) 6 January 1994 (1994-01-06) the whole document ---	
A	COLLINS V: "Gene amplification in human gliomas" GLIA,US,WILEY-LISS, NEW YORK, NY, vol. 15, no. 3, November 1995 (1995-11), pages 289-296-96, XP002109702 ISSN: 0994-1491 the whole document ---	
A	WO 93 20238 A (UNIV JOHNS HOPKINS) 14 October 1993 (1993-10-14) the whole document ---	
P,X	WO 99 66041 A (ENDRESS GREGORY A ;FLORENCE KIMBERLY A (US); HUMAN GENOME SCIENCES) 23 December 1999 (1999-12-23) whole document, particularly passages relating to gene 75, seq.ID'2 85 and 447, and the claims. ---	1-11, 16-36, 38-43, 46,49-70
P,X	WO 99 67382 A (SAVITSKY KINNERET ;COMPUGEN LTD (IL); MINTZ LIAT (IL)) 29 December 1999 (1999-12-29) the whole document ---	1-11, 16-36, 38-43, 46,49-70
P,X	WO 99 15654 A (FERRARA NAPOLEONE ;WILLIAMS P MICKEY (US); GENENTECH INC (US); FON) 1 April 1999 (1999-04-01) the whole document ---	1-11, 16-22, 29-33, 38-40, 42,43, 46,49-70
P,X	WO 99 45135 A (DANA FARBER CANCER INST INC ;MILLENNIUM BIOTHERAPEUTICS INC (US)) 10 September 1999 (1999-09-10) whole document, particularly the claims -----	1-11, 16-22, 29-32, 34,36, 38-70

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/03565

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 29-37, in as far as they pertain to in vivo use, are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 12-15
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
invention 1 : claims 1-70, all partially

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US 00/03565

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 12-15

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

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

International Application No. PCT/US 00/03565

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Invention 1: claims 1-70, all partially

An antibody that binds to the protein designated PR0197, represented by seq.ID.2, composition comprising said antibody, nucleic acid sequence that hybridizes to a sequence encoding PR0197, as represented by seq.ID.1, method of determining the presence of said protein by using said antibody, method of diagnosing a tumour through detection of said protein with said antibody, cancer diagnostic kit comprising said antibody, use of said antibody or an antisense sequence to said nucleic acid in a composition for use in inhibiting the growth of tumour cells, kit comprising said antibody or said antisense molecule, method for identifying an inhibitor of an activity or the expression of said protein, isolated nucleic acid with 80% identity to a nucleic acid encoding seq.ID.2, vector comprising it, host comprising said vector, and method for producing said protein using said host, isolated polypeptide having at least 80% identity to seq.ID.2 or the extracellular domain thereof, and chimeric peptide comprising said polypeptide.

Inventions 2-35: claims 1-70,
all partially and as far as applicable

As invention 1, but limited to each of the following designated proteins, with the corresponding DNA and protein sequences, respectively, indicated between brackets;
invention 2 is limited to PR0207 (Seq.ID's 3 and 4),
invention 3 is limited to PR0226 (Seq.ID's 5 and 6),
invention 4 is limited to PR0232 (Seq.ID's 7 and 8),
invention 5 is limited to PR0243 (Seq.ID's 9 and 10),
invention 6 is limited to PR0256 (Seq.ID's 11 and 12),
invention 7 is limited to PR0269 (Seq.ID's 13 and 14),
invention 8 is limited to PR0274 (Seq.ID's 15 and 16),
invention 9 is limited to PR0304 (Seq.ID's 17 and 18),
invention 10 is limited to PR0339 (Seq.ID's 19 and 20),
invention 11 is limited to PR01558 (Seq.ID's 21 and 22),
invention 12 is limited to PR0779 (Seq.ID's 23 and 24),
invention 13 is limited to PR01185 (Seq.ID's 25 and 26),
invention 14 is limited to PR01245 (Seq.ID's 27 and 28),
invention 15 is limited to PR01759 (Seq.ID's 29 and 30),
invention 16 is limited to PR05775 (Seq.ID's 31 and 32),
invention 17 is limited to PR07133 (Seq.ID's 33 and 34),
invention 18 is limited to PR07168 (Seq.ID's 35 and 36),
invention 19 is limited to PR05725 (Seq.ID's 37 and 38),
invention 20 is limited to PR0202 (Seq.ID's 39 and 40),
invention 21 is limited to PR0206 (Seq.ID's 41 and 42),
invention 22 is limited to PR0264 (Seq.ID's 43 and 44),
invention 23 is limited to PR0313 (Seq.ID's 45 and 46),
invention 24 is limited to PR0342 (Seq.ID's 47 and 48),
invention 25 is limited to PR0542 (Seq.ID's 49 and 50),
invention 26 is limited to PR0773 (Seq.ID's 51 and 52),
invention 27 is limited to PR0861 (Seq.ID's 53 and 54),

International Application No. PCT/US 00/03565

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

invention 28 is limited to PR01216 (Seq.ID's 55 and 56),
invention 29 is limited to PR01686 (Seq.ID's 57 and 58),
invention 30 is limited to PR01800 (Seq.ID's 59 and 60),
invention 31 is limited to PR03562 (Seq.ID's 61 and 62),
invention 32 is limited to PR09850 (Seq.ID's 63 and 64),
invention 33 is limited to PR0539 (Seq.ID's 65 and 66),
invention 34 is limited to PR04316 (Seq.ID's 67 and 68), and
invention 35 is limited to PR04980 (Seq.ID's 68 and 70).

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

Internal application No
PCT/US 00/03565

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9400603 A	06-01-1994	AU 4544393 A	24-01-1994
		AU 4545193 A	24-01-1994
		CA 2137822 A	06-01-1994
		EP 0654092 A	24-05-1995
		JP 8500729 T	30-01-1996
		WO 9400601 A	06-01-1994
		US 5843684 A	01-12-1998
WO 9320238 A	14-10-1993	US 5411860 A	02-05-1995
		AT 159985 T	15-11-1997
		AU 681851 B	11-09-1997
		AU 4278893 A	08-11-1993
		CA 2133306 A	14-10-1993
		DE 69315068 D	11-12-1997
		DE 69315068 T	09-04-1998
		DK 635068 T	20-04-1998
		EP 0635068 A	25-01-1995
		ES 2110608 T	16-02-1998
		GR 3025961 T	30-04-1998
		JP 7505294 T	15-06-1995
		US 5420263 A	30-05-1995
		US 5550023 A	27-08-1996
		US 5519118 A	21-05-1996
		US 5618921 A	08-04-1997
		US 5756455 A	26-05-1998
		US 5708136 A	13-01-1998
		US 5736338 A	07-04-1998
		US 5606044 A	25-02-1997
		US 5702903 A	30-12-1997
		US 5858976 A	12-01-1999
WO 9966041 A	23-12-1999	AU 4682999 A	05-01-2000
		AU 8910998 A	08-03-1999
		EP 1005544 A	07-06-2000
		WO 9909155 A	25-02-1999
WO 9967382 A	29-12-1999	AU 4643699 A	10-01-2000
WO 9915654 A	01-04-1999	US 6030831 A	29-02-2000
		AU 9388198 A	12-04-1999
		EP 1015586 A	05-07-2000
		US 6074873 A	13-06-2000
WO 9945135 A	10-09-1999	AU 3065799 A	20-09-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/82	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
C 0 7 K 16/32	C 0 7 K 14/82	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 16/32	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	A
(C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 R 1:91)	C 1 2 N 5/00	A
(C 1 2 P 21/02	C 1 2 R 1:91	
C 1 2 R 1:91)	C 1 2 P 21/02	C
	C 1 2 R 1:91	

- (31)優先権主張番号 PCT/US99/12252
 (32)優先日 平成11年6月2日(1999.6.2)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/140,650
 (32)優先日 平成11年6月22日(1999.6.22)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/140,653
 (32)優先日 平成11年6月22日(1999.6.22)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/144,758
 (32)優先日 平成11年7月20日(1999.7.20)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/145,698
 (32)優先日 平成11年7月26日(1999.7.26)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/146,222
 (32)優先日 平成11年7月28日(1999.7.28)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/149,395
 (32)優先日 平成11年8月17日(1999.8.17)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/151,689
 (32)優先日 平成11年8月31日(1999.8.31)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 PCT/US99/20111
 (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 PCT/US99/21090

- (32)優先日 平成11年9月15日(1999.9.15)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 PCT/US99/28313
 (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 PCT/US99/28301
 (32)優先日 平成11年12月1日(1999.12.1)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 PCT/US99/28634
 (32)優先日 平成11年12月1日(1999.12.1)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 PCT/US00/00219
 (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)

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

- (72)発明者 ゴッダード, オードリー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94131, サン フランシスコ, コンゴ ストリート 110
 (72)発明者 ゴドウスキー, ポール, ジェー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリングゲーム, イーストン ドライブ 2627
 (72)発明者 ガーニー, オースティン, エル.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002, ベルモント, デビー レーン 1
 (72)発明者 ヒラン, ケネス, ジェー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94114, サン フランシスコ, セワード ストリート 64
 (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 パン, ジェームス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002, ベルモント, コロネット ブールバード 2705
 (72)発明者 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, リバティール ストリート 1110
 (72)発明者 ロイ, マーガレット, アン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94123, サン フランシスコ, ウェブスター ストリート 2960, 4号室
 (72)発明者 スミス, ヴィクトリア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリングゲーム, ドウワイト ロード 19
 (72)発明者 ストーン, ドナ, エム.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94005, ブリスベン, シエラ ポイント ロード 684
 (72)発明者 ワタナベ, コリン, ケー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94556, モラガ, コーリス ドライブ 128

(72)発明者 ウッド, ウィリアム, アイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, ヒルズバロ, サウスダウン コート 35

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA45 CA04 CA09 DA02 DA06 HA14 HA17
4B063 QA19 QQ08 QQ43 QQ96 QR40 QR55 QS03 QS32 QS33 QS34
4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CC24 DA05 DA14
4B065 AA26 AA72 AA90 AB01 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA13 AA16 MA02 MA22 MA38 MA52 MA56 MA66 NA14 ZB262
4C085 AA13 AA14 BB11 EE01 EE03 GG02 GG03 GG06 GG08
4C086 AA01 AA03 EA15 MA01 MA02 MA04 MA22 MA38 MA52 MA56
MA66 NA14 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA41 DA22 DA76 EA28 EA51 FA74