

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3993746号
(P3993746)

(45) 発行日 平成19年10月17日(2007.10.17)

(24) 登録日 平成19年8月3日(2007.8.3)

(51) Int.C1.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 N	5/10	(2006.01)	C 12 N	5/00	B
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
C 07 K	14/47	(2006.01)	C 07 K	14/47	

請求項の数 21 (全 132 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-589692 (P2000-589692)
(86) (22) 出願日	平成11年12月2日 (1999.12.2)
(65) 公表番号	特表2003-529317 (P2003-529317A)
(43) 公表日	平成15年10月7日 (2003.10.7)
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/028565
(87) 国際公開番号	W02000/037638
(87) 国際公開日	平成12年6月29日 (2000.6.29)
審査請求日	平成13年6月22日 (2001.6.22)
(31) 優先権主張番号	60/113,296
(32) 優先日	平成10年12月22日 (1998.12.22)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	US9905028
(32) 優先日	平成11年3月8日 (1999.3.8)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	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
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】腫瘍性細胞成長阻害のための組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

図6(配列番号:10)で示されるアミノ酸配列、または図6(配列番号:10)で示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは挿入されたアミノ酸配列を持つPRO320ポリペプチドの有効量を製薬的に許容される担体と混合して含んでなる、腫瘍性細胞成長阻害のために有用な組成物。

【請求項2】

前記PRO320ポリペプチドの成長阻害量を含む請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

哺乳動物における腫瘍の治療のための請求項1又は2に記載の組成物。

10

【請求項4】

前記腫瘍が癌である請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

癌が乳癌、卵巣癌、腎臓癌、直腸結腸癌、肺癌、黒色腫、および白血病からなる群から選択される請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

前記腫瘍細胞を生体外において、図6(配列番号:10)で示されるアミノ酸配列、または図6(配列番号:10)で示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは挿入されたアミノ酸配列を持つPRO320ポリペプチドの有効量に暴露することを含んでなる腫瘍細胞の成長を阻害する方法。

20

【請求項 7】

(a) 容器と

(b) 該容器に収容された組成物とを具備し、前記組成物が請求項 1ないし 5のいずれかに記載の組成物である、製造品。

【請求項 8】

前記組成物の腫瘍性細胞の成長阻害における使用について言及するラベルがさらに前記容器へ取り付けられるか、又は包装挿入物が前記容器に含まれてなる請求項 7に記載の製造品。

【請求項 9】

図 6 (配列番号 : 10) で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする単離された核酸、または図 6 (配列番号 : 10) で示されるアミノ酸配列において、1 または数個のアミノ酸が置換、付加または欠失されたアミノ酸配列からなり、かつ腫瘍性細胞成長阻害活性を有するポリペプチドをコードする単離された核酸。 10

【請求項 10】

図 5 (配列番号 : 9) で示される核酸配列からなる核酸、または該核酸と高度の緊縮性条件下でハイブリダイズし、かつ腫瘍性細胞成長阻害活性を有するポリペプチドをコードする単離された核酸。

【請求項 11】

請求項 9 又は請求項 10 に記載のいずれかの核酸を含んでなるベクター。

【請求項 12】

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 11 に記載のベクター。 20

【請求項 13】

請求項 11 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 14】

前記細胞が C H O 細胞である請求項 13 の宿主細胞。

【請求項 15】

前記細胞が大腸菌である請求項 13 の宿主細胞。

【請求項 16】

前記細胞が酵母細胞である請求項 13 の宿主細胞。 30

【請求項 17】

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 13 の宿主細胞。

【請求項 18】

図 6 (配列番号 : 10) で示されるアミノ酸配列からなるか、または図 6 (配列番号 : 10) で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは挿入されたアミノ酸配列からなり、かつ腫瘍性細胞成長阻害活性を有する、単離されたポリペプチド。 40

【請求項 19】

請求項 18 に記載のポリペプチドの生産方法であって、請求項 13 に記載の宿主細胞を前記ポリペプチドの発現に適する条件下で培養し、前記ポリペプチドを細胞培養液より回収することを含んでなる方法。

【請求項 20】

請求項 18 に記載のポリペプチドを、異種アミノ酸配列へ融合したことからなるキメラ分子であって、該異種アミノ酸配列は、エピトープタグ配列である、キメラ分子。

【請求項 21】

前記異種アミノ酸配列が、イムノグロブリンの Fc 領域である請求項 20 のキメラ分子。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(発明の分野)

50

本発明は、腫瘍性細胞成長を阻害する為の方法及び組成物に関する。特に、本発明は、腫瘍を治療するための抗腫瘍組成物及び方法に関する。さらに本発明は、成長阻害性、例えば抗腫瘍性化合物を同定するめのスクリーニング方法にも関する。

【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(Boring等, CA Cancel J. Clin., 43: 7 [1993])。

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

10

近年の癌治療の発達にも関わらず、腫瘍性細胞成長を阻害することのできる新たな治療薬が大いに必要とされている。従って、本発明の目的は、癌細胞などの腫瘍細胞の成長を阻害できる化合物を同定することである。

【0003】

(発明の概要)

A. 実施態様

本発明は、腫瘍細胞成長を阻害するための方法及び組成物に関する。より詳細には、本発明は、哺乳動物患者、好ましくはヒトにおける癌、例えば乳癌、前立腺癌、直腸癌、肺癌、卵巣癌、腎臓癌及びCNS癌、白血病、骨髄腫などを含む腫瘍を治療するための方法及び組成物に関する。

20

一態様では、本発明は、ここに定義するPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド、又はそのアゴニストを、製薬的に許容される担体と混合して含んでなる腫瘍性細胞成長阻害のために有用な物質の組成物に関する。好ましい実施態様では、この物質の組成物は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド、又はそのアゴニストの成長阻害量を含んでいる。他の好ましい実施態様では、この組成物は、PRO179、PRO297、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド、又はそのアゴニストの細胞毒性量を含む。場合によっては、この物質の組成物は、一又は複数の成長阻害及び/又は細胞毒性及び/又は化学治療薬を含有してよい。

30

さらなる態様では、本発明は、ここに定義されるPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド、又はそのアゴニストの有効量を含んでなる、哺乳動物における腫瘍を治療するために有用な物質の組成物に関する。この腫瘍は、好ましくは癌である。

40

【0004】

他の態様では、本発明は、前記腫瘍細胞を、ここに定義される、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド、又はそのアゴニストの有効量に暴露することを含んでなる、腫瘍細胞の成長を阻害する方法に関する。特別な実施態様では、アゴニストは、抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866アゴニスト抗体である。他の実施態様では、アゴニストは、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219

50

、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの生物学的活性を模倣する小分子である。この方法は、インビトロ又はインビボで実施される。

またさらなる実施態様では、本発明は、

(a) 容器；及び

(b) 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する製造品に関し、当該組成物は新生細胞成長、例えば腫瘍細胞成長を阻害するのに有用であり、当該組成物中の活性剤は、ここに定義されるPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド、又はそのアゴニスト；及び

(c) 前容器に取り付けられた容器、又は前容器に含まれる包装挿入物であって、前記PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド、又はそのアゴニストの腫瘍性細胞の成長阻害における使用について言及するもので、アゴニストはPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドへ結合する抗体であろう製造品からなる。特別な実施態様では、アゴニストは、抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866アゴニスト抗体である。他の実施態様では、アゴニストは、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの生物学的活性を模倣する小分子である。ここに定義されるPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドを腫瘍の治療に有効な量で含有する類似の製造品も本発明の範囲内に包含される。また、ここに定義されるPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド又はそのアゴニストを含み、さらなる成長阻害薬、細胞毒性薬又は化学治療薬を付加的に含む製造品も本発明の範囲内である。

【0005】

B. さらなる実施態様

本発明の他の実施態様では、本発明はPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸を提供する。

一側面では、単離された核酸分子は、(a) PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドのDNA分子で、ここに開示された全長アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示された膜貫通タンパク質でシグナルペプチドを含む又は含まないものの細胞外ドメイン、又はここに開示されたいずれかの特に定義された全長アミノ酸配列の断片と、少なくとも約80%の配列同一性を有する、好ましくは少なくとも約81%の配列同一性を有する、より好ましくは少なくとも約82%の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約83%の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約84%の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約8

10

20

30

40

50

5 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約86 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約87 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約88 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約89 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約90 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約91 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約92 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約93 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約94 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約95 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約96 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約97 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約98 %の配列同一性を有する、さらに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、或いは(b)(a)のDNA分子の補体を有する。

【0006】

他の側面では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示されたPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの全長配列をコードするcDNA、ここに開示されたPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドのシグナル配列を欠く配列、ここに開示されたPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの膜貫通タンパク質の細胞外ドメインでシグナル配列を含む又は含まない配列、又はここに開示されたいずれかの特に定義された全長アミノ酸配列の断片と、少なくとも約80 %の配列同一性を有する、好ましくは少なくとも約81 %の配列同一性を有する、より好ましくは少なくとも約82 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約83 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約84 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約85 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約86 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約87 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約88 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約89 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約90 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約91 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約92 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約93 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約94 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約95 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約96 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約97 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約98 %の配列同一性を有する、さらに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、或いは(b)(a)のDNA分子の補体を有する。

【0007】

さらなる側面では、本発明は、(a)ここに開示されたATCCへ寄託されたいずれかのヒトcDNAによってコードされたのと同じ成熟ポリペプチドをコードするDNA分子と、少なくとも約80 %の配列同一性を有する、好ましくは少なくとも約81 %の配列同一性を有する、より好ましくは少なくとも約82 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約83 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約84 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約85 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約86 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約87 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約88 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約89 %の配列同一性を有する。

10

20

30

40

50

する、さらにより好ましくは少なくとも約90%の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約91%の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約92%の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約93%の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約94%の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約95%の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約96%の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約97%の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約98%の配列同一性を有する、さらに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、或いは(b)(a)のDNA分子の補体を含んでなる単離された核酸分子に関する。

さらに他の側面では、本発明は、膜貫通ドメインが欠損或いは不活性化したPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、又はこのようなヌクレオチド配列の補体を含む単離された核酸分子を提供し、これらポリペプチドの膜貫通ドメインは、ここに開示されている。従って、ここに開示されたPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの可溶性ドメインは考察されている。

【0008】

その他の実施態様は、例えば、抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866抗体の為の結合部位としての、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結合部位を含むポリペプチドを任意にコードするPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドのコード断片の為のハイブリダイゼーションプローブとしての使用を見出すことができるPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドをコード化した配列の断片、又はその補体について指示している。このような核酸断片は、一般的には、少なくとも約20ヌクレオチドの長さであり、好ましくは少なくとも約30ヌクレオチドの長さ、より好ましくは少なくとも約40ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約50ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約60ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約70ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約80ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約90ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約100ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約110ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約120ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約130ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約140ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約150ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約160ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約170ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約180ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約190ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約200ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約250ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約300ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約400ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約450ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約500ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約600ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約700ヌクレオチドの長さ、さらにより

10

20

30

40

50

好ましくは少なくとも約 800 ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約 900 ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは少なくとも約 1000 ヌクレオチドの長さで、この文脈に示した「約」という用語は、参照ヌクレオチド配列の長さのプラスマイナス 10 % の参照長さを意味する。よく知られた配列整列プログラムのいずれかを使用し、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866 ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列と他のヌクレオチド配列を整列させ、どの PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又は PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又は PRO866 ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列が新規であるかを決定する日常的な方法によって、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又は PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又は PRO866 ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規断片が決定できることは知られている。すべてのこのような PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又は PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又は PRO866 ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列は、ここにおいて考察されている。同じく考察されているのは、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又は PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又は PRO866 ポリペプチドのヌクレオチド断片によってコードされているポリペプチド断片で、好ましくは抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866 抗体の為の結合部位を含んでなる、これら PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又は PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又は PRO866 ポリペプチドのヌクレオチド断片である。

【0009】

さらに他の実施態様では、本発明は、上記おいて同定されたいずれかの核酸配列によってコードされている PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又は PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又は PRO866 ポリペプチドを提供する。

【0010】

ある側面では、本発明は、ここに開示されたような全長アミノ酸配列、ここに開示されたようなシグナル配列を欠くアミノ酸配列、ここに開示されたような膜貫通タンパク質の細胞外ドメインでシグナル配列を含む又は含まないもの、又はここに開示されているようないくつかのアミノ酸配列の組合せを有する PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又は PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又は PRO866 ポリペプチドに対して、少なくとも約 80 % の配列同一性を有する、好ましくは少なくとも約 81 % の配列同一性を有する、より好ましくは少なくとも約 82 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 83 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 84 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 85 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 86 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 87 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 88 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 89 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 90 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 91 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 92 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 93 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 94 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 95 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 96 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 97 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 98 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 99 % の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約 100 % の配列同一性を有する。

93 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約94 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約95 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約96 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約97 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約98 %の配列同一性を有する、さらに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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドに関する。

【0011】

さらなる側面では、本発明は、ここに開示された、ATCCへ寄託されたいずれかのヒトcDNAによってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約80 %の配列同一性を有する、好ましくは少なくとも約81 %の配列同一性を有する、より好ましくは少なくとも約82 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約83 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約84 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約85 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約86 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約87 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約88 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約89 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約90 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約91 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約92 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約93 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約94 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約95 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約96 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約97 %の配列同一性を有する、さらにより好ましくは少なくとも約98 %の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドに関する。

【0012】

さらなる側面では、本発明は、ここに開示されたような全長アミノ酸配列、ここに開示されたようなシグナル配列を欠くアミノ酸配列、ここに開示されたような膜貫通タンパク質の細胞外ドメインでシグナル配列を含む又は含まないもの、又はここに開示されているような明確に定義された全長アミノ酸配列断片のいずれかを有するPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドに対して、少なくとも約80 %のポジティブのスコア、好ましくは少なくとも約81 %のポジティブのスコア、より好ましくは少なくとも約82 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約83 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約84 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約85 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約86 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約87 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約88 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約89 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約90 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約91 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約92 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約93 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約94 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約95 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約96 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約97 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約98 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約99 %のポジティブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約100 %のポジティブのスコアを有する。

10

20

30

40

50

ブのスコア、さらにより好ましくは少なくとも約99%のポジティブのスコアのアミノ酸配列を有する含む単離されたPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドに関する。

【0013】

特定の側面では、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欠く単離されたPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドを提供し、さらにこのペプチドは先に示したアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされている。これと同じポリペプチドを生産する工程は、さらにここに示されており、これらの工程は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの発現に適した条件下での適切な核酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞の培養と、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの培養液からの回収を含む。

その他の側面では、本発明は、膜貫通ドメイン欠損、又は膜貫通ドメイン不活性の単離されたPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドを提供する。これと同じポリペプチドを生産する工程は、さらにここに示されており、これら工程は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの発現に適した条件下での適切な核酸分子を含んだベクターを含んでなる宿主細胞の培養と、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの培養液からの回収を含む。

【0014】

さらなる他の実施態様では、本発明は、ここに定義された天然PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドのアゴニストに関する。特定の実施態様では、アゴニストは、抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866アゴニスト抗体、又は小分子である。

よりさらなる実施態様では、本発明は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドを候補分子と接触せしめること、及び前記PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドによって介在される生物活性をモニターすることを含む、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドに対するアゴニストを同定する方法に関する。好ましくは、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328 40 50

、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドは、天然PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドである。

そしてさらなる実施態様では、本発明は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド、或いはここに開示されているPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドのアゴニスト、或いは容器と組み合わせた抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866アゴニスト抗体を含んでなる組成物に関する。任意的に、容器は製薬的に許容可能である。

【0015】

本発明のその他の実施態様は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド、そのアゴニスト、又は抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866アゴニスト抗体へ反応性のある状態の治療に有用な薬剤の調整の為のPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、又はPRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド、或いは上文に示したようなそのアゴニスト、又は抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO526、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO509、又は抗-PRO866アゴニスト抗体の使用を指示している。

本発明の他の実施態様では、上文において示したいずれのポリペプチドをコードするDNAを含むベクターを提供する。そのいずれのベクターを含む宿主細胞も提供する。例としては、宿主細胞は、CHO細胞、大腸菌、酵母、又はバキュウロウイルス感染昆虫細胞である。ここに示されたいずれかのポリペプチドの生産方法がさらに提供され、望ましいポリペプチドの発現に適した条件下での宿主細胞の培養、及び望ましいポリペプチドの培養液からの回収を含む。

【0016】

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を融合させた、ここに示したいずれかのポリペプチドを含むキメラ分子を提供する。そのようなキメラ分子の例とは、ここに示したいずれかのポリペプチドを、エピトープタグ配列、又はイムノグロブリンのFc領域へ融合せしめたものを含む。

さらに他の実施態様では、本発明は、上文及び下文に示されたポリペプチドへ特異的に結合する抗体を提供する。任意的に、抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片、又は单鎖抗体である。

さらに他の実施態様では、本発明は、ゲノム又はcDNA又はクレオチド配列の単離、又はアンチセンスプローブとして有用なオリゴヌクレオチドプローブを提供し、これらプローブは上又は下に示されたいずれかのヌクレオチド配列から得られる。

【0017】

(本発明の詳細な説明)

ここで使用されている「PRO179」、「PRO207」、「PRO320」、「PR

10

20

30

40

50

O 2 1 9」、「P R O 2 2 1」、「P R O 2 2 4」、「P R O 3 2 8」、「P R O 3 0 1」、「P R O 5 2 6」、「P R O 3 6 2」、「P R O 3 5 6」、「P R O 5 0 9」、又は「P R O 8 6 6」ポリペプチド又はタンパク質なる用語は、天然配列P R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、及びP R O 8 6 6ポリペプチド、さらにP R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、及びP R O 8 6 6ポリペプチド変異体（ここで、更に定義される）を包含する。P R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、又はP R O 8 6 6ポリペプチドは、多様なソース、例えばヒト組織やその他のソースから単離可能であり、組み換え法及び／又は合成法によって調整できる
10

【0018】

「天然配列1 7 9」、「天然配列2 0 7」、「天然配列3 2 0」、「天然配列2 1 9」、「天然配列2 2 1」、「天然配列2 2 4」、「天然配列3 2 8」、「天然配列3 0 1」、「天然配列5 2 6」、「天然配列3 6 2」、「天然配列3 5 6」、「天然配列5 0 9」、又は「天然配列8 6 6」は、天然由来のP R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、及びP R O 8 6 6ポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。そのような天然配列P R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、又はP R O 8 6 6ポリペプチドは、天然から単離可能であり、又は組み換え法／又は合成法によって生産可能である。「天然配列」P R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、又はP R O 8 6 6ポリペプチドという用語は、自然に切断、又は選択された型（例 細胞外ドメイン配列）、自然に生じた変異体（例えば選択的スプライス型）、及び自然に生じたP R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、及びP R O 8 6 6ポリペプチドの突然変異体を、特に包含する。本発明の一実施態様においては、天然配列P R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、及びP R O 8 6 6ポリペプチドは、それぞれ、F i g 2（配列番号：2）、F i g 4（配列番号：7）、F i g 6（配列番号：10）、F i g 8（配列番号：15）、F i g 10（配列番号：20）、F i g 12（配列番号：25）、F i g 14（配列番号：30）、F i g 16（配列番号：35）、F i g 18（配列番号：43）、F i g 20（配列番号：48）、F i g 22（配列番号：55）、F i g 24（配列番号：60）、又はF i g 26（配列番号：62）に示されている成熟、又は全長天然配列P R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、又はP R O 8 6 6ポリペプチドである。さらに、それぞれ、F i g 2（配列番号：2）、F i g 4（配列番号：7）、F i g 6（配列番号：10）、F i g 8（配列番号：15）、F i g 10（配列番号：20）、F i g 12（配列番号：25）、F i g 14（配列番号：30）、F i g 16（配列番号：35）、F i g 18（配列番号：43）、F i g 20（配列番号：48）、F i g 22（配列番号：55）、F i g 24（配列番号：60）、又はF i g 26（配列番号：62）に開示されているP R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、及びP R O 8 6 6ポリペプチドは、それらの中で一番目
20
30
40
50

アミノ酸と指定されたメチオニン残基から開始する一方で、Fig 2（配列番号：2）、Fig 4（配列番号：7）、Fig 6（配列番号：10）、Fig 8（配列番号：15）、Fig 10（配列番号：20）、Fig 12（配列番号：25）、Fig 14（配列番号：30）、Fig 16（配列番号：35）、Fig 18（配列番号：43）、Fig 20（配列番号：48）、Fig 22（配列番号：55）、Fig 24（配列番号：60）又はFig 26（配列番号：62）それぞれの一番目のアミノ酸の上流或いは下流に位置するその他のメチオニン残基は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの開始アミノ酸として利用可能であろうことは考えられ、そして可能である。

10

【0019】

ここに開示されたポリペプチドの「細胞外ドメイン」又は「ECD」は、膜貫通及び細胞質ドメインを本質的に有しない型に相当する。通常、ポリペプチドECDは、そのような膜貫通及び/又は細胞質ドメインの約1%未満、好ましくは0.5%未満のそのようなドメインを有する。本発明のポリペプチドのものと同定されたいずれの膜貫通ドメインも、そのタイプの疎水性ドメインを同定するために日常的に用いられている基準に準ずるものであると確認されている。正確な膜貫通ドメインの境界は変動しうるが、それは、最も可能性があるのは、最初に同定され、そして添付図面に示されているような、ドメインの何れの側の僅か約5個以内のアミノ酸に限られている。このようなことから、本発明の一つの実施態様は、本発明のポリペプチドの細胞外ドメインは、成熟アミノ酸配列のアミノ酸1からXを含み、ここでXは、細胞外ドメイン/膜貫通ドメインの境界の何れかの側の5個のアミノ酸の何れかに相当する。

20

【0020】

ここに開示された多様なPROポリペプチドの「シグナルペプチド」のおおよその位置は、添付図に示されている。しかしながら、シグナル配列のC末端境界は変動しうるが、最も可能性があるのは、ここで最初に同定されたようなシグナルペプチドのC末端の境界の何れの側の僅か約5個以内のアミノ酸に限られていることは知られており、ここにおいては、シグナルペプチドのC末端境界は、当該分野で日常的に使用されているアミノ酸配列を同定する基準に従って同定が可能である（例えば、Nielsen等，Prot. Eng. 10: 1-6 (1997)及びvon Heinje等，Nucl. Acids. Res. 14: 4683-4690 (1986)）。さらに、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナルペプチドの切断は完全に均一ではなく、一以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここに定義されるシグナルペプチドのC-末端境界の何れかの側の約5アミノ酸未満内で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

30

【0021】

「PRO179変異体ポリペプチド」は、以下に定義するような（天然配列PRO179ポリペプチド以外の）活性なPRO179ポリペプチドを意味し、(a) Fig 2（配列番号：2）に示すPRO179ポリペプチドの残基1又は約17~460、(b) XがFig 2（配列番号：2）の12~21の任意のアミノ酸残基である場合のFig 2（配列番号：2）に示すPRO179のX~460、又は(c)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。

40

「PRO207変異体ポリペプチド」は、以下に定義するような（天然配列PRO207ポリペプチド以外の）活性なPRO207ポリペプチドを意味し、(a) Fig 4（配列番号：7）に示すPRO207ポリペプチドの残基1又は約41~249、又は(b) XがFig 4（配列番号：7）の36~45の任意のアミノ酸残基である場合のFig 4（配列番号：7）に示すPRO207のX~249、又は(c) Fig 4（配列番号：7）に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。

「PRO320変異体ポリペプチド」は、以下に定義するような（天然配列PRO320ポリペプチド以外の）活性なPRO320ポリペプチドを意味し、(a) Fig 6（配列

50

番号：10)に示すPRO320ポリペプチドの残基1又は約22～338、又は(b)XがFig6(配列番号：10)の17～26の任意のアミノ酸残基である場合のFig6(配列番号：10)に示すPRO207のX～338、又は(c)Fig6(配列番号：10)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0022】

「PRO219変異体ポリペプチド」は、以下に定義するような(天然配列PRO219ポリペプチド以外の)活性なPRO219ポリペプチドを意味し、(a)Fig8(配列番号：15)に示すPRO219ポリペプチドの残基1又は約24～1005、又は(b)XがFig8(配列番号：15)の19～28の任意のアミノ酸残基である場合のFig8(配列番号：15)に示すPRO219のX～1005、又は(c)Fig8(配列番号：15)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。

「PRO221変異体ポリペプチド」は、以下に定義するような(天然配列PRO221ポリペプチド以外の)活性なPRO221ポリペプチドを意味し、(a)Fig10(配列番号：20)に示すPRO221ポリペプチドの残基1又は約34～259、又は(b)XがFig10(配列番号：20)の29～38の任意のアミノ酸残基である場合のFig10(配列番号：20)に示すPRO221のX～259、(c)XがFig10(配列番号：20)の199～208の任意のアミノ酸残基である場合のFig10(配列番号：20)のPRO221の1又は約34～X、又は(d)Fig10(配列番号：20)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。

「PRO224変異体ポリペプチド」は、以下に定義するような(天然配列PRO224ポリペプチド以外の)活性なPRO224ポリペプチドを意味し、(a)Fig12(配列番号：25)に示すPRO224ポリペプチドの残基1又は約1～31、又は(b)XがFig12(配列番号：25)の26～35の任意のアミノ酸残基である場合のFig12(配列番号：25)に示すPRO224のX～282、(c)XがFig12(配列番号：25)の226～235の任意のアミノ酸残基である場合のFig12(配列番号：25)のPRO224の1又は約31～X、又は(d)Fig12(配列番号：25)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0023】

「PRO328変異体ポリペプチド」は、以下に定義するような(天然配列PRO328ポリペプチド以外の)活性なPRO328ポリペプチドを意味し、(a)Fig14(配列番号：30)に示すPRO328ポリペプチドの残基1又は約23～463、又は(b)XがFig14(配列番号：30)の18～27の任意のアミノ酸残基である場合のFig14(配列番号：30)に示すPRO221のX～463、(c)又は(d)Fig14(配列番号：30)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。

「PRO301変異体ポリペプチド」は、以下に定義するような(天然配列PRO301ポリペプチド以外の)活性なPRO301ポリペプチドを意味し、(a)Fig16(配列番号：35)に示すPRO301ポリペプチドの残基1又は約28～229、又は(b)XがFig16(配列番号：35)の23～32の任意のアミノ酸残基である場合のFig16(配列番号：35)に示すPRO301のX～299、(c)XがFig16(配列番号：35)の230～239の任意のアミノ酸残基である場合のFig16(配列番号：35)のPRO301の1又は約28～X、又は(d)Fig16(配列番号：35)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。

「PRO526変異体ポリペプチド」は、以下に定義するような(天然配列PRO526ポリペプチド以外の)活性なPRO526ポリペプチドを意味し、(a)Fig18(配

10

20

30

40

50

列番号：43)に示すPRO526ポリペプチドの残基1又は約27~473、又は(b)XがFig18(配列番号：43)の22~31の任意のアミノ酸残基である場合のFig18(配列番号：43)に示すPRO526のX~473、又は(d)Fig18(配列番号：43)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0024】

「PRO362変異体ポリペプチド」は、以下に定義するような(天然配列PRO362ポリペプチド以外の)活性なPRO362ポリペプチドを意味し、(a)Fig20(配列番号：48)に示すPRO362ポリペプチドの残基1又は約20~321、又は(b)XがFig20(配列番号：48)の15~24の任意のアミノ酸残基である場合のFig20(配列番号：48)に示すPRO362のX~321、(c)XがFig20(配列番号：48)の276~285の任意のアミノ酸残基である場合のFig20(配列番号：48)のPRO362の1又は約20~X、又は(c)Fig20(配列番号：48)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。

「PRO356変異体ポリペプチド」は、以下に定義するような(天然配列PRO356ポリペプチド以外の)活性なPRO356ポリペプチドを意味し、(a)Fig22(配列番号：55)に示すPRO356ポリペプチドの残基1又は約27~346、又は(b)XがFig22(配列番号：55)の22~31の任意のアミノ酸残基である場合のFig22(配列番号：55)に示すPRO362のX~346、又は(c)Fig22(配列番号：55)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。

「PRO509変異体ポリペプチド」は、以下に定義するような(天然配列PRO509ポリペプチド以外の)活性なPRO509ポリペプチドを意味し、(a)Fig24(配列番号：60)に示すPRO509ポリペプチドの残基1又は約37~283、(b)XがFig24(配列番号：60)の32~41の任意のアミノ酸残基である場合のFig24(配列番号：60)に示すPRO509のX~283、(c)XがFig24(配列番号：60)のアミノ酸200~アミノ酸209の任意のアミノ酸である場合のFig24(配列番号：60)の1又は約37~X、又は(d)Fig24(配列番号：60)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。

「PRO866変異体ポリペプチド」は、以下に定義するような(天然配列PRO866ポリペプチド以外の)活性なPRO866ポリペプチドを意味し、(a)Fig26(配列番号：62)に示すPRO866ポリペプチドの残基1又は約27~331、又は(b)XがFig26(配列番号：62)の22~31の任意のアミノ酸残基である場合のFig26(配列番号：62)に示すPRO866のX~331、又は(c)Fig26(配列番号：62)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。

これらのPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866変異体は、例えば、N-及び/又はC-末端並びに一又は複数の内部ドメインにおいて一又は複数のアミノ酸残基が付加又は削除されたPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドを含む。

【0025】

通常、PRO179変異体は(a)Fig2(配列番号：2)に示すPRO179ポリペプチドの残基1又は約17~460、(b)XがFig2(配列番号：2)の12~21の任意のアミノ酸残基である場合のFig2(配列番号：2)に示すPRO179のX~460、又は(c)Fig2(配列番号：2)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片と、

10

20

30

40

50

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する。

通常、PRO207変異体は(a)Fig 4(配列番号:7)に示すPRO207ポリペプチドの残基1又は約41~249、(b)XがFig 4(配列番号:7)の36~45の任意のアミノ酸残基である場合のFig 4(配列番号:7)に示すPRO207のX~249、又は(c)Fig 4(配列番号:7)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片と、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する。

【0026】

通常、PRO320変異体は(a)Fig 6(配列番号:10)に示すPRO320ポリペプチドの残基1又は約22~338、(b)XがFig 6(配列番号:10)の17~26の任意のアミノ酸残基である場合のFig 6(配列番号:10)に示すPRO320のX~338、又は(c)Fig 6(配列番号:10)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片と、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、そして、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

10

20

30

40

50

なくとも約 99 % のアミノ酸配列同一性を有する。

通常、PRO219変異体は(a)Fig 8(配列番号:15)に示すPRO219ポリペプチドの残基1又は約24~1005、(b)XがFig 8(配列番号:15)の19~28の任意のアミノ酸残基である場合のFig 8(配列番号:15)に示すPRO219のX~1005、又は(c)Fig 8(配列番号:15)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片と、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する。

【 0 0 2 7 】

通常、PRO221変異体は(a)Fig10(配列番号:20)に示すPRO221ポリペプチドの残基1又は約34~259、(b)XがFig10(配列番号:20)の29~38の任意のアミノ酸残基である場合のFig10(配列番号:20)に示すPRO221のX~259、(c)XがFig10(配列番号:20)の199~208の任意のアミノ酸残基である場合のFig10(配列番号:20)に示すPRO221の1又は約34~X、又は(d)Fig10(配列番号:20)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片と、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する。

通常、PRO224変異体は(a)Fig12(配列番号:25)に示すPRO224ポリペプチドの残基1又は約31~282、(b)XがFig12(配列番号:25)の26~35の任意のアミノ酸残基である場合のFig12(配列番号:25)に示すPRO221のX~282、(c)XがFig12(配列番号:25)の226~235の任意のアミノ酸残基である場合のFig12(配列番号:25)に示すPRO224の1又は約31~X、又は(d)Fig12(配列番号:25)に示すアミノ酸配列の特異的誘導片と、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 8 6 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 8 7 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 8 8 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 8 9 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 9 0 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 9 1 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 9 2 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 9 3 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 9 4 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 9 5 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 9 6 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 9 7 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 9 8 % 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 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有する。

10

【0028】

通常、PRO328変異体は(a)Fig14(配列番号：30)に示すPRO328ポリペプチドの残基1又は約23～463、(b)XがFig14(配列番号：30)の18～27の任意のアミノ酸残基である場合のFig14(配列番号：30)に示すPRO328のX～463、又は(c)Fig14(配列番号：30)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片と、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、そして、より好ましくは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性を有する。

20

通常、PRO301変異体は(a)Fig16(配列番号：35)に示すPRO301ポリペプチドの残基1又は約28～299、(b)XがFig16(配列番号：35)の23～32の任意のアミノ酸残基である場合のFig16(配列番号：35)に示すPRO301のX～299、(c)Fig16(配列番号：35)XがFig16(配列番号：35)の230～239の任意のアミノ酸残基である場合のFig16(配列番号：35)に示すPRO301の1又は約28～X、又は(d)Fig16(配列番号：35)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片と、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、そして、より好ましくは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性を有する。

40

【0029】

50

通常、PRO526変異体は(a)Fig18(配列番号:43)に示すPRO526ポリペプチドの残基1又は約27~473、(b)XがFig18(配列番号:43)の22~31の任意のアミノ酸残基である場合のFig18(配列番号:43)に示すPRO526のX~473、又は(d)Fig18(配列番号:43)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片と、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する。

通常、PRO362変異体は(a)Fig20(配列番号:48)に示すPRO362ポリペプチドの残基1又は約20~321、(b)XがFig20(配列番号:48)の15~24の任意のアミノ酸残基である場合のFig20(配列番号:48)に示すPRO362のX~321、(c)Fig20(配列番号:48)XがFig20(配列番号:48)の276~285の任意のアミノ酸残基である場合のFig20(配列番号:48)に示すPRO362の1又は約20~X、又は(d)Fig20(配列番号:48)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片と、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、そして、より好ましくは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0030】

通常、PRO356変異体は(a)Fig22(配列番号:55)に示すPRO356ポリペプチドの残基1又は約27~346、(b)XがFig22(配列番号:55)の22~31の任意のアミノ酸残基である場合のFig22(配列番号:55)に示すPRO356のX~346、又は(c)Fig22(配列番号:55)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片と、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、

10

20

30

40

50

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、そして、より好ましくは少なくとも約 98 % のアミノ酸配列同一性を有する。

通常、PRO509変異体は(a)Fig24(配列番号:60)に示すPRO509ポリペプチドの残基1又は約37~283、(b)XがFig24(配列番号:60)の32~41の任意のアミノ酸残基である場合のFig24(配列番号:60)に示すPRO509のX~283、(c)Fig24(配列番号:60)XがFig24(配列番号:60)の200~209の任意のアミノ酸残基である場合のFig24(配列番号:60)に示すPRO507の1又は約34~X、又は(d)Fig24(配列番号:60)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片と、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する。
10
20
30

【0031】

通常、PRO866変異体は(a)Fig26(配列番号:62)に示すPRO866ポリペプチドの残基1又は約27~331、(b)XがFig26(配列番号:62)の22~31の任意のアミノ酸残基である場合のFig26(配列番号:62)に示すPRO866のX~331、(c)Fig26(配列番号:62)に示すアミノ酸配列の特異的誘導断片と、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する。
40

PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO509、及びPRO866変異体ペプチドは、天然PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、P
50

R O 5 2 6 、 P R O 3 6 2 、 P R O 3 5 6 、 P R O 5 0 9 、 及び P R O 8 6 6 ペプチド配列を包含しない。通常は、 P R O 1 7 9 、 P R O 2 0 7 、 P R O 3 2 0 、 P R O 2 1 9 、 P R O 2 2 1 、 P R O 2 2 4 、 P R O 3 2 8 , P R O 3 0 1 、 P R O 5 2 6 、 P R O 3 6 2 、 P R O 3 5 6 、 P R O 5 0 9 、 及び P R O 8 6 6 変異体ポリペプチドは、少なくとも約 1 0 アミノ酸長、より多くは少なくとも約 2 0 アミノ酸長、より多くは少なくとも約 3 0 アミノ酸長、より多くは少なくとも約 4 0 アミノ酸長、より多くは少なくとも約 5 0 アミノ酸長、より多くは少なくとも約 6 0 アミノ酸長、より多くは少なくとも約 7 0 アミノ酸長、より多くは少なくとも約 8 0 アミノ酸長、より多くは少なくとも約 9 0 アミノ酸長、より多くは少なくとも約 1 0 0 アミノ酸長、より多くは少なくとも約 1 5 0 アミノ酸長、より多くは少なくとも約 2 0 0 アミノ酸長、より多くは少なくとも約 2 5 0 アミノ酸長、より多くは少なくとも約 3 0 0 アミノ酸長、又はそれ以上である。
10

【 0 0 3 2 】

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

さらに、表 2 A - 2 D は、 ALIGN-2 配列比較コンピュータプログラムを用いた % アミノ酸配列同一性（表 2 A - 2 B ）及び % 核酸配列同一性（表 2 C - 2 D ）を決定するために下記の方法を使用するための仮説的例示を示し、その場合には「 P R O 」は対象とする仮説的 P R O 1 7 9 、 P R O 2 0 7 、 P R O 3 2 0 、 P R O 2 1 9 、 P R O 2 2 1 、 P R O 2 2 4 、 P R O 3 2 8 , P R O 3 0 1 、 P R O 5 2 6 、 P R O 3 6 2 、 P R O 3 5 6 、 P R O 5 0 9 、 又は P R O 8 6 6 ポリペプチドのアミノ酸配列、「 比較タンパク質 」は対象とする「 P R O 」ポリペプチドが比較されるポリペプチドのアミノ酸配列、「 P R O - D N A 」は対象とする仮説的 P R O 1 7 9 - 、 P R O 2 0 7 - 、 P R O 3 2 0 - 、 P R O 2 1 9 - 、 P R O 2 2 1 - 、 P R O 2 2 4 - 、 P R O 3 2 8 - , P R O 3 0 1 - 、 P R O 5 2 6 - 、 P R O 3 6 2 - 、 P R O 3 5 6 - 、 P R O 5 0 9 - 、 又は P R O 8 6 6 - コード化核酸配列、「 比較 D N A 」は対象とする「 P R O - D N A 」核酸分子が比較される核酸分子のヌクレオチド配列、「 X 」、「 Y 」及び「 Z 」は各々異なる仮説的アミノ酸残基、「 N 」、「 L 」及び「 V 」は各々異なる仮説的ヌクレオチドを表す。
20

【 0 0 3 3 】

表 1

```

/*
 */

#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 J MPS 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 delay) */
    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 *dx;              /* holds diagonals */
struct path pp[2];            /* holds path for seqs */

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

```

10

20

30

40

```

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

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

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

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

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

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

```

main

10

20

30

```

/* 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, *coll;     /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;          /* index into seqs */

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

    ndely = (int *)g_malloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_malloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_malloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    coll = (int *)g_malloc("to get coll", 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

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

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

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

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

```

```

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

...nw
10
20
30
40

```
/*
 *
 * 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
 */
```

10

```
#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 ix, 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;
```

```
    ix = 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);
        ix -= pp[1].spc;
    }
```

```
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        ix -= lastgap;
    }
```

```
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
```

```
    getmat(ix, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}
```

print

20

30

```

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

```

```

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

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

}

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

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

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

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

```

```

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() dumpblock
{
    register i;

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

```



```

int          i;
register char *px;

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

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

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

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

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

```

...putline

stars

10

20

30

```
/*
 * 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                                10
```

```

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

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

int cleanup();                                /* cleanup tmp file */          10
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)                         20
{
    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) {
        sprintf(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) {
        sprintf(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';
}

```

```

...getseq

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

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

char *
g_calloc(msg, nx, sz)
    char    *msg;           /* program, calling routine */
    int     nx, sz;         /* number and size of elements */
{
    char    *px, *calloc();
    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
{
    int          fd = -1;
    int          siz, i0, il;
    register int 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();
        }
    }
    for (i = i0 = il = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                if (dx[dmax].jp.x[j] < xx)
                    break;
            if (j < 0)
                break;
            if (dx[dmax].jp.x[j] >= xx)
                break;
        }
    }
}

```

```
...readjmps
```

```

    if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= J MPS) {
    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 + lenl - 1
         */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + lenl - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
    }
    /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
    siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
    i1++;
}
else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
    pp[0].n[i0] = siz;
    pp[0].x[i0] = xx;
    gapx++;
    ngapx += siz;
}
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
i0++;
}
else
    break;
}

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

```

10

20

30

40

```

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

```

【 0 0 3 4 】

表2A

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

$$5 \div 15 = 33.3\%$$

表2B

PRO	XXXXXXXXXXX	(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間の同一アミノ酸残基の数)を

(PROポリペプチドの全アミノ酸残基)で割る =

$$5 \div 10 = 50\%$$

表2C

PRO-DNA NNNNNNNNNNNNNN
 比較DNA NNNNNNNLLL LLLL
 (長さ= 14 ヌクレオチド)
 (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の同一ヌクレオチドの数)

(PRO-DNAの核酸配列のヌクレオチド数)で割る=

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

10

表2D

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

20

%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の同一ヌクレオチドの数)を

(PRO-DNAの核酸配列の全ヌクレオチド数)で割る=

$$6 \div 12 = 33.3\%$$

30

【0035】

ここに定義される PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチド配列に関する「パーセントアミノ酸配列同一性」は、配列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間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列の同一性の一部として考慮せず、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド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メントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアライ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、アライメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、以下に記載するように、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが表1に与えられている配列比較プログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテク社によって作成され、表1に示したソースコードは米国著作権事務所、Washington D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2は

40

50

ジェネンテク社、South San Francisco, Californiaを通して公的に入手可能であり、また表1に与えたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0036】

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

10

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対であると記録された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%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2 A - 2 Bは、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「PRO」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸配列同一性の計算方法を示す。

【0037】

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

20

【0038】

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

30

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対であると記録された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%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。

【0039】

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

40

50

、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。

【0040】

「PRO179変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO179変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性な PRO179 ポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、(a) Fig 2 (配列番号: 2) に示す PRO179 ポリペプチドの残基 1 又は約 17 ~ 460 をコードする核酸配列、(b) X が Fig 2 (配列番号: 2) の 12 ~ 21 の任意のアミノ酸残基である場合の Fig 2 (配列番号: 2) に示す PRO179 のアミノ酸 X ~ 460 をコードする核酸配列、又は(c) Fig 2 (配列番号: 2) に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列に対して少なくとも約 80 % の核酸配列同一性を有する。通常、PRO179 変異体ポリヌクレオチドは、(a) Fig 2 (配列番号: 2) に示す PRO179 ポリペプチドの残基 1 又は約 17 ~ 460 をコードする核酸配列、(b) X が Fig 2 (配列番号: 2) の 12 ~ 21 の任意のアミノ酸残基である場合の Fig 2 (配列番号: 2) に示す PRO179 のアミノ酸 X ~ 460 をコードする核酸配列、又は(c) Fig 2 (配列番号: 2) に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列のいずれかと少なくとも約 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。PRO179 ポリヌクレオチド変異体は、天然の PRO179 ヌクレオチド配列を含まない。

【0041】

「PRO207変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO207変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性な PRO207 ポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、(a) Fig 4 (配列番号: 7) に示す PRO207 ポリペプチドの残基 1 又は約 41 ~ 249 をコードする核酸配列、(b) X が Fig 4 (配列番号: 7) の 36 ~ 45 の任意のアミノ酸残基である場合の Fig 4 (配列番号: 7) に示す PRO179 のアミノ酸 X ~ 249 をコードする核酸配列、又は(c) Fig 4 (配列番号: 7) に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列に対して少なくとも約 80 % の核酸配列同一性を有する。通常、PRO207 変異体ポリヌクレオチドは、(a) Fig 4 (配列番号: 7) に示す PRO207 ポリペプチドの残基 1 又は約 41 ~ 249 をコードする核酸配列、(b) X が Fig 4 (配列番号: 7) の 36 ~ 45 の任意のアミノ酸残基である場合の Fig 4 (配列番号: 7) に示す PRO207 のアミノ酸 X ~ 249 をコードする核酸配列、又は(c) Fig 4 (配列番号: 7) に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列のいずれかと少なくとも約 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 85 % 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 90 % の核酸配列同一性、

10

20

30

40

50

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。PRO207ポリヌクレオチド変異体は、天然のPRO207ヌクレオチド配列を含まない。

【0042】

「PRO320変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO320変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性なPRO320ポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、(a)Fig6(配列番号：10)に示すPRO320ポリペプチドの残基1又は約22～338をコードする核酸配列、(b)XがFig6(配列番号：10)の17～26の任意のアミノ酸残基である場合のFig6(配列番号：10)に示すPRO320のアミノ酸X～338をコードする核酸配列、又は(c)Fig6(配列番号：10)に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列に対して少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する。通常、PRO320変異体ポリヌクレオチドは、(a)Fig6(配列番号：10)に示すPRO320ポリペプチドの残基1又は約17～26をコードする核酸配列、(b)XがFig6(配列番号：10)の17～26の任意のアミノ酸残基である場合のFig6(配列番号：10)に示すPRO320のアミノ酸X～338をコードする核酸配列、又は(c)Fig6(配列番号：10)に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列のいずれかと少なくとも約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。PRO320ポリヌクレオチド変異体は、天然のPRO320ヌクレオチド配列を含まない。

【0043】

「PRO219変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO219変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性なPRO219ポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、(a)Fig8(配列番号：15)に示すPRO219ポリペプチドの残基1又は約17～460をコードする核酸配列、(b)XがFig2(配列番号：2)の24～1005の任意のアミノ酸残基である場合のFig8(配列番号：15)に示すPRO219のアミノ酸X～1005をコードする核酸配列、又は(c)Fig8(配列番号：15)に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列に対して少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する。通常、PRO219変異体ポリヌクレオチドは、(a)Fig8(配列番号：15)に示すPRO219ポリペプチドの残基1又は約24～1005をコードする核酸配列、(b)XがFig8(配列番号：15)の19～28の任意のアミノ酸残基である場合のFig8(配列番号：15)に示すPRO219のアミノ酸X～1005をコードする核酸配列、又は(c)Fig8(配列番号：15)に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列のいずれかと少なくとも約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

10

20

30

40

50

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。PRO219ポリヌクレオチド変異体は、天然のPRO219ヌクレオチド配列を含まない。

【0044】

「PRO221変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO221変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性なPRO221ポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、(a)Fig10(配列番号：20)に示すPRO221ポリペプチドの残基1又は約34～259をコードする核酸配列、(b)XがFig10(配列番号：20)の29～38の任意のアミノ酸残基である場合のFig10(配列番号：20)に示すPRO221のアミノ酸X～259をコードする核酸配列、(c)XがFig10(配列番号：20)のアミノ酸199～アミノ酸208の任意のアミノ酸である場合のFig10(配列番号：20)のアミノ酸1又は約34～Xをコードする核酸配列、又は(d)Fig10(配列番号：20)に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列に対して少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する。通常、PRO221変異体ポリヌクレオチドは、(a)Fig10(配列番号：20)に示すPRO221ポリペプチドの残基1又は約34～259をコードする核酸配列、(b)XがFig10(配列番号：20)の29～38の任意のアミノ酸残基である場合のFig10(配列番号：20)に示すPRO221のアミノ酸X～259をコードする核酸配列、(c)XがFig10(配列番号：20)のアミノ酸199～アミノ酸208の任意のアミノ酸である場合のFig10(配列番号：20)のアミノ酸1又は約34～Xをコードする核酸配列、又は(c)Fig10(配列番号：20)に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列のいずれかと少なくとも約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。PRO221ポリヌクレオチド変異体は、天然のPRO221ヌクレオチド配列を含まない。

【0045】

「PRO224変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO224変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性なPRO224ポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、(a)Fig12(配列番号：25)に示すPRO224ポリペプチドの残基1又は約31～282をコードする核酸配列、(b)XがFig12(配列番号：25)の26～35の

任意のアミノ酸残基である場合の Fig 12 (配列番号: 25) に示す PRO224 のアミノ酸 X ~ 282 をコードする核酸配列、(c) X が Fig 12 (配列番号: 25) のアミノ酸 226 ~ アミノ酸 235 の任意のアミノ酸である場合の Fig 12 (配列番号: 25) のアミノ酸 1 又は約 31 ~ X をコードする核酸配列、又は (d) Fig 12 (配列番号: 25) に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列に対して少なくとも約 80% の核酸配列同一性を有する。通常、PRO224 変異体ポリヌクレオチドは、(a) Fig 12 (配列番号: 25) に示す PRO224 ポリペプチドの残基 1 又は約 31 ~ 282 をコードする核酸配列、(b) X が Fig 12 (配列番号: 25) の 26 ~ 35 の任意のアミノ酸残基である場合の Fig 12 (配列番号: 25) に示す PRO224 のアミノ酸 X ~ 282 をコードする核酸配列、(c) X が Fig 12 (配列番号: 25) のアミノ酸 226 ~ アミノ酸 235 の任意のアミノ酸である場合の Fig 12 (配列番号: 25) のアミノ酸 1 又は約 31 ~ X をコードする核酸配列、又は (d) Fig 10 (配列番号: 25) に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列のいずれかと少なくとも約 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。PRO224 ポリヌクレオチド変異体は、天然の PRO224 ヌクレオチド配列を含まない。

【0046】

「PRO328 変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO328 変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性な PRO328 ポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、(a) Fig 14 (配列番号: 30) に示す PRO328 ポリペプチドの残基 1 又は約 23 ~ 463 をコードする核酸配列、(b) X が Fig 14 (配列番号: 30) の 18 ~ 27 の任意のアミノ酸残基である場合の Fig 14 (配列番号: 30) に示す PRO328 のアミノ酸 X ~ 463 をコードする核酸配列、又は (c) Fig 14 (配列番号: 30) に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列に対して少なくとも約 80% の核酸配列同一性を有する。通常、PRO328 変異体ポリヌクレオチドは、(a) Fig 14 (配列番号: 30) に示す PRO328 ポリペプチドの残基 1 又は約 23 ~ 463 をコードする核酸配列、(b) X が Fig 14 (配列番号: 30) の 18 ~ 27 の任意のアミノ酸残基である場合の Fig 14 (配列番号: 30) に示す PRO328 のアミノ酸 X ~ 463 をコードする核酸配列、又は (c) Fig 14 (配列番号: 30) に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列のいずれかと少なくとも約 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、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。

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。PRO328ポリヌクレオチド変異体は、天然のPRO328又クレオチド配列を含まない。

【0047】

「PRO301変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO301変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性なPRO301ポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、(a) Fig 16(配列番号：35)に示すPRO301ポリペプチドの残基1又は約28～299をコードする核酸配列、(b) XがFig 16(配列番号：35)の23～32の任意のアミノ酸残基である場合のFig 16(配列番号：35)に示すPRO301のアミノ酸X～299をコードする核酸配列、(c) XがFig 16(配列番号：35)のアミノ酸230～アミノ酸239の任意のアミノ酸である場合のFig 16(配列番号：35)のアミノ酸1又は約28～Xをコードする核酸配列、又は(d) Fig 16(配列番号：35)に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列に対して少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する。通常、PRO301変異体ポリヌクレオチドは、(a) Fig 16(配列番号：35)に示すPRO301ポリペプチドの残基1又は約28～299をコードする核酸配列、(b) XがFig 16(配列番号：35)の23～299の任意のアミノ酸残基である場合のFig 16(配列番号：35)に示すPRO301のアミノ酸X～299をコードする核酸配列、(c) XがFig 16(配列番号：35)のアミノ酸230～アミノ酸239の任意のアミノ酸である場合のFig 16(配列番号：35)のアミノ酸1又は約28～Xをコードする核酸配列、又は(c) F6g10(配列番号：35)に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列のいずれかと少なくとも約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。PRO301変異体ポリヌクレオチド変異体は、天然のPRO301ヌクレオチド配列を含まない。

【0048】

「PRO526変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO526変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性なPRO526ポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、(a) Fig 18(配列番号：43)に示すPRO526ポリペプチドの残基1又は約27～473をコードする核酸配列、(b) XがFig 18(配列番号：43)の22～31の任意のアミノ酸残基である場合のFig 18(配列番号：43)に示すPRO526のアミノ酸X～473をコードする核酸配列、又は(c) Fig 18(配列番号：43)に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列に対して少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する。通常、PRO526変異体ポリヌクレオチドは、(a) Fig 18(配列番号：43)に示すPRO526ポリペプチドの残基1又は約27～473をコードする核酸配列、(b) XがFig 18(配列番号：43)の22～31の任意のアミノ酸残基である場合のFig 18(配列番号：43)に示すPRO526のアミノ酸X～473をコードする核酸配列、又は(c) Fig 18(配列番号：43)に示すアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列のいずれかと少なくとも約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。PRO526ポリヌクレオチド変異体は、天然のPRO526又クレオチド配列を含まない。

【0049】

「PRO362変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO362変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性なPRO362ポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、(a)Fig20(配列番号：48)に示すPRO362ポリペプチドの残基1又は約20～321をコードする核酸配列、(b)XがFig20(配列番号：48)の15～24の任意のアミノ酸残基である場合のFig20(配列番号：48)に示すPRO362のアミノ酸X～321をコードする核酸配列、(c)XがFig20(配列番号：48)のアミノ酸276～アミノ酸285の任意のアミノ酸である場合のFig20(配列番号：48)のアミノ酸1又は約20～Xをコードする核酸配列、又は(d)Fig20(配列番号：48)に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列に対して少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する。通常、PRO362変異体ポリヌクレオチドは、(a)Fig20(配列番号：48)に示すPRO362ポリペプチドの残基1又は約20～321をコードする核酸配列、(b)XがFig20(配列番号：48)の15～24の任意のアミノ酸残基である場合のFig20(配列番号：48)に示すPRO362のアミノ酸X～321をコードする核酸配列、(c)XがFig20(配列番号：48)のアミノ酸276～アミノ酸285の任意のアミノ酸である場合のFig20(配列番号：48)のアミノ酸1又は約20～Xをコードする核酸配列、又は(d)Fig20(配列番号：48)に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列のいずれかと少なくとも約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。PRO2362ポリヌクレオチド変異体は、天然のPRO362又クレオチド配列を含まない。

【0050】

「PRO356変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO356変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性なPRO356ポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、(a)

10

20

30

40

50

) Fig 22 (配列番号 : 55) に示す PRO356 ポリペプチドの残基 1 又は約 27 ~ 346 をコードする核酸配列、(b) X が Fig 22 (配列番号 : 55) の 22 ~ 31 の任意のアミノ酸残基である場合の Fig 22 (配列番号 : 55) に示す PRO356 のアミノ酸 X ~ 346 をコードする核酸配列、又は (c) Fig 22 (配列番号 : 55) に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列に対して少なくとも約 80 % の核酸配列同一性を有する。通常、PRO356 変異体ポリヌクレオチドは、(a) Fig 22 (配列番号 : 55) に示す PRO356 ポリペプチドの残基 1 又は約 27 ~ 346 をコードする核酸配列、(b) X が Fig 22 (配列番号 : 55) の 22 ~ 31 の任意のアミノ酸残基である場合の Fig 22 (配列番号 : 55) に示す PRO356 のアミノ酸 X ~ 346 をコードする核酸配列、又は (c) Fig 22 (配列番号 : 55) に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列のいずれかと少なくとも約 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。PRO356 ポリヌクレオチド変異体は、天然の PRO356 又はクレオチド配列を含まない。
10

【0051】

「PRO509 変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO509 変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性な PRO509 ポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、(a) Fig 24 (配列番号 : 60) に示す PRO509 ポリペプチドの残基 1 又は約 37 ~ 283 をコードする核酸配列、(b) X が Fig 24 (配列番号 : 60) の 32 ~ 41 の任意のアミノ酸残基である場合の Fig 24 (配列番号 : 60) に示す PRO509 のアミノ酸 X ~ 283 をコードする核酸配列、(c) X が Fig 24 (配列番号 : 60) のアミノ酸 200 ~ アミノ酸 209 の任意のアミノ酸である場合の Fig 24 (配列番号 : 60) のアミノ酸 1 又は約 37 ~ X をコードする核酸配列、又は (d) Fig 24 (配列番号 : 60) に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列に対して少なくとも約 80 % の核酸配列同一性を有する。通常、PRO221 変異体ポリヌクレオチドは、(a) Fig 24 (配列番号 : 60) に示す PRO509 ポリペプチドの残基 1 又は約 37 ~ 283 をコードする核酸配列、(b) X が Fig 24 (配列番号 : 60) の 32 ~ 41 の任意のアミノ酸残基である場合の Fig 24 (配列番号 : 60) に示す PRO509 のアミノ酸 X ~ 283 をコードする核酸配列、(c) X が Fig 24 (配列番号 : 60) のアミノ酸 200 ~ アミノ酸 209 の任意のアミノ酸である場合の Fig 24 (配列番号 : 60) のアミノ酸 1 又は約 37 ~ X をコードする核酸配列、又は (d) Fig 24 (配列番号 : 60) に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列のいずれかと少なくとも約 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20
30
40
50

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。PRO509ポリヌクレオチド変異体は、天然のPRO509ヌクレオチド配列を含まない。

【0052】

「PRO866変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO866変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性なPRO866ポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、(a)Fig26(配列番号：62)に示すPRO866ポリペプチドの残基1又は約27～331をコードする核酸配列、(b)XがFig26(配列番号：62)の22～31の任意のアミノ酸残基である場合のFig26(配列番号：62)に示すPRO866のアミノ酸X～331をコードする核酸配列、又は(c)(d)Fig26(配列番号：62)に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列に対して少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する。通常、PRO866変異体ポリヌクレオチドは、(a)Fig26(配列番号：62)に示すPRO866ポリペプチドの残基1又は約22～31をコードする核酸配列、(b)XがFig26(配列番号：62)の22～31の任意のアミノ酸残基である場合のFig26(配列番号：62)に示すPRO866のアミノ酸X～331をコードする核酸配列、又は(c)Fig26(配列番号：62)に示すアミノ酸配列の他の特異的誘導断片をコードする核酸配列のいずれかと少なくとも約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。PRO866ポリヌクレオチド変異体は、天然のPRO866ヌクレオチド配列を含まない。

【0053】

通常は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866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。

【0054】

ここに定義されるPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチドコード化核酸配列に対して同定

10

20

30

40

50

されている「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、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、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドコード化配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、以下に記載するように、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが表1に与えられている配列比較プログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテク社によって作成され、表1に示したソースコードは米国著作権事務所、Washington D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2はジェネンテク社、South San Francisco, Californiaを通して公的に入手可能であり、またFig 2 A-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オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。10 20

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対であると記録された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2 C-2 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。30

【0055】

特に断らない限りは、ここでの全ての%核酸配列同一性値は上記のようにALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%核酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschul等, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードできる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask=可、鎖=全て、予測される発生=10、最小低複合長=15/5、マルチパスe-値=0.01、マルチパスの定数=25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ=25、及びスコアリングマトリクス=BLOSUM62を含む。40

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対であると記録されたのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチド数50

である。核酸配列 C の長さが核酸配列 D の長さと異なる場合、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。

【0056】

他の実施態様では、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及び PRO866 变異体ポリヌクレオチドは、各々活性な PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又は PRO866 ポリペプチドをコードする核酸分子であり、好ましくは緊縮性ハイブリッド形成及び洗浄条件下で、各々 Fig 2 (配列番号 : 2) に示す全長 PRO179 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Fig 4 (配列番号 : 7) に示す全長 PRO207 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Fig 6 (配列番号 : 10) に示す全長 PRO320 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Fig 8 (配列番号 : 15) に示す全長 PRO219 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Fig 10 (配列番号 : 20) に示す全長 PRO221 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Fig 12 (配列番号 : 25) に示す全長 PRO224 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Fig 14 (配列番号 : 30) に示す全長 PRO328 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Fig 16 (配列番号 : 35) に示す全長 PRO301 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Fig 18 (配列番号 : 43) に示す全長 PRO526 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Fig 20 (配列番号 : 48) に示す全長 PRO362 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Fig 22 (配列番号 : 55) に示す全長 PRO356 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Fig 24 (配列番号 : 60) に示す全長 PRO509 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、Fig 26 (配列番号 : 62) に示す全長 PRO866 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリッド形成できる。PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又は PRO866 变異体ポリヌクレオチドにコードされるものであつてもよい。

【0057】

上記のように実施されるアミノ酸配列同一性比較の文脈における「ポジティブ（陽性）」という用語は、比較された配列において同一であるアミノ酸残基ばかりでなく類似した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記録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 (

10

20

30

40

50

下記の表3で特定するように) 好ましい置換基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値を記録した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。

10

【0058】

「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、それに自然に付随する全ての付随物を持たない。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カ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充分なほど、あるいは、(2)クーマシープ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、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO228、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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。

20

【0059】

PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドをコードする「単離された」核酸分子、或いは抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866抗体をコードする「単離された核酸分子」は、同定され、PRO179-、PRO207-、PRO320-、PRO219-、PRO221-、PRO224-、PRO328-、PRO301-、PRO526-、PRO362-、PRO356-、PRO509-、又はPRO866-をコードする核酸、或いは抗-PRO179-、抗-PRO207-、抗-PRO320-、抗-PRO219-、抗-PRO221-、抗-PRO224-、抗-PRO328-、抗-PRO301-、抗-PRO526-、抗-PRO362-、抗-PRO356-、抗-PRO509-、又は抗-PRO866-抗体をコードする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、それに自然に付隨する全ての成分が付隨していない。単離されたPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866をコードする核酸分子、或いは抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866をコードする核酸分子は、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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301

30

40

50

1、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866をコードする核酸分子、或いは抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866をコードする核酸分子とは区別される。しかし、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328，PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドをコードする単離された核酸分子、或いは抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866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場合にPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328，PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド、或いは抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866抗体を通常発現する細胞に含まれるPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328，PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866核酸分子又は抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866核酸分子を含む。
10

【0060】

「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化配列の発現に必要なDNA配列を意味する。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、コード化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、コード化配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接していて読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。
30

【0061】

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、特に、例えば单一の抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、及び抗-PRO866モノクローナル抗体(アゴニスト抗体を含む)、ポリエピトープ特異性を持つ抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、及び抗-PRO866抗体組成物、一本鎖抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO3
40

40

50

28、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、及び抗-PRO866抗体、抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、及び抗-PRO866抗体断片(下記参照)を包含している。ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団、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。

【0062】

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度、例えば、50において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2)ハイブリッド形成中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42において50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；(3)42における50%ホルムアミド、5xSSC(0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5xデンハード液、超音波処理サケ精子DNA(50μg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストララン硫酸と、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デンハード液、10%デキストララン硫酸、及び20mg/mLの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の37での終夜インキュベーション、次いで1xSSC中37-50でのフィルターの洗浄といった条件である。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。

【0063】

「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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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、その長さは融合の対象となる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にかなり独特である。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

10

20

30

40

50

～約50のアミノ酸残基(好ましくは約10～約20の残基)を有する。

ここで用いる「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と異種タンパク質(「アドヘシン」)の結合特異性を結合させ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。

10

【0064】

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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866の生物学的及び/又は免疫学的活性を保持するPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866の形態を意味し、ここで「生物学的」活性とは、天然又は天然発生PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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。

20

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、「治療的有効量」の定義に関連してここに列挙する効果の一以上を発揮する能力を指すのに使用される。特別な実施態様では、「生物学的活性」は、腫瘍性細胞成長又は増殖を阻害する能力である。好ましい生物学的活性は、標的腫瘍(例えば癌)細胞の成長の遅延又は完全な停止を含む阻害である。他の好ましい生物学的活性は、標的腫瘍(例えば癌)細胞の死をもたらす細胞毒性活性である。さらに他の好ましい生物学的活性は、標的腫瘍(例えば癌)細胞のアポトーシスの誘発である。

30

【0065】

「免疫学的活性」という語は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの定性的生物学的活性を、公知の活性PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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

50

ント中の周知の活性類似物を皮下注射し、次いで不完全フロイント中で腹膜内又は皮下に追加免疫することにより従来の方法で調製される。免疫学的交差反応性は好ましくは「特異的」であり、これは同定される免疫学的交差反応性分子（例えば抗体）の対応する PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 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6倍、最も好ましくは少なくとも約8倍高い）ことを意味する。

【0066】

10

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、肺腺癌、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。

【0067】

20

「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。

【0068】

30

ここに開示されるポリペプチド又はそのアゴニストの「有効量」とは、腫瘍性細胞成長、腫瘍成長に関しては、標的細胞の成長を或る程度阻害できる量である。この用語は、標的細胞の成長阻害、細胞分裂停止及び／又は細胞毒性効果及び／又はアポトーシスを誘起することができる量を含む。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のためのPRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド又はそのアゴニストの「有効量」は、経験的に日常的手法で決定できる。

「治療的有効量」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）疾患に伴う徵候の1つ又は複数の或る程度の軽減の1つ又は複数を誘起することができる量を意味する。腫瘍の治療の目的のためのPRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド又はそのアゴニストの「治療的有効量」は、経験的に日常的手法で決定できる。

【0069】

40

PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド又はそのアゴニストの「治療的有効量」は、経験的に日常的手法で決定できる。

PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド又はそのアゴニストの「治療的有効量」は、経験的に日常的手法で決定できる。

PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド又はそのアゴニストの「治療的有効量」は、経験的に日常的手法で決定できる。

PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド又はそのアゴニストの「治療的有効量」は、経験的に日常的手法で決定できる。

PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド又はそのアゴニストの「治療的有効量」は、経験的に日常的手法で決定できる。

PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド又はそのアゴニストの「治療的有効量」は、経験的に日常的手法で決定できる。

50

509、又はPRO866ポリペプチド又はそのアゴニストの「成長阻害量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の成長をインビトロ又はインビボで阻害できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のためのPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド又はそのアゴニストの「成長阻害量」は、経験的に日常的手法で決定できる。

PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド又はそのアゴニストの「細胞毒性量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞をインビトロ又はインビボで破壊できる量である。腫瘍性細胞成長の阻害の目的のためのPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド又はそのアゴニストの「細胞毒性量」は、経験的に日常的手法で決定できる。
10

【0070】

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} と 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。

「化学治療薬」は、腫瘍、例えば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、チオテバ、ブスルファン、サイトキシン、タキソイド、例えばパクリタキセル（Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ）及びドキセタキセル（Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Rance）、トキソテール、メトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ビンプラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イフオスファミド、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、カルボプラチニン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミニノマイシン、アミノブテリン、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）、メルファラン、及び他の関連するナイトロジエンマスターを含む。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。
20
30

【0071】

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、細胞、特にここで同定される任意の遺伝子を過剰発現する癌細胞の成長をインビトロ又はインビボで阻害する化合物又は組成物を意味する。即ち、成長阻害剤は、S期でそのような遺伝子を過剰発現する細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期を（S期以外の位置で）阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ビンカス（ビンクリスチン及びビンプラスチン）、タキソール、及びトポII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド及びブレオマイシンを含む。G1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも溢流し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトレキセート、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。
40

【0072】

「サイトカイン」という用語は、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、例えば滌胞刺激ホルモン（F S H）、甲状腺刺激ホルモン（T S H）、及び黄体化ホルモン（L H）；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；腫瘍壞死因子-₋ 及び-₋；ミューラー阻害因子；マウス生殖腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（T P O）；N G F - 等の神経成長因子；血小板成長因子；T G F - 及びT G F - 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I I；エリスロポエチン（E P O）；骨誘発因子；インターフェロン-₋、-₋、及び-₋ 等のインターフェロン；コロニー刺激因子（C S F s）、例えばマクロファージ-C S F（M-C S F）；顆粒球-マクロファージ-C S F（G M-C S F）；及び顆粒球-C S F（G-C S F）；インターロイキン（I L s）、例えばI L-1、I L-1、I L-2、I L-3、I L-4、I L-5、I L-6、I L-7、I L-8、I L-9、I L-11、I L-12；腫瘍壞死因子、例えばT N F - 及びT N F - ；及びL I F 及びキットリガンド（K L）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。

【0073】

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」，B 20
iochemical 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.247-267, 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、グリコシリ化プロドラッグ、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、本発明で使用され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。

「アゴニスト」という用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示する天然のP R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8，P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、又はP R O 8 6 6 ポリペプチドの生物学的活性に類似する任意の分子を含む。好適なアゴニスト分子は特に、アゴニスト抗体又は抗体断片、天然のP R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8，P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、又はP R O 8 6 6 ポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、有機小分子などを含む。P R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8，P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、又はP R O 8 6 6 ポリペプチドのアゴニストを同定する方法は、腫瘍細胞を候補アゴニストに暴露し、腫瘍細胞成長の阻害を測定することを含みうる。

【0074】

「慢性」投与とは、初期の治療効果（活性）を長期間にわたって維持するようにするために、急性態様とは異なり連続的な態様での薬剤の投与を意味する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ本質的に周期的になされる処理である。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、ウシなどを含む。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

10

20

30

40

50

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。

【0075】

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、又は免疫グロブリン；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单糖類、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；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び／又はTWEEN(商品名)、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONIC CS(商品名)等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0076】

「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。

「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。それは、共に軽鎖及び重鎖の可変ドメインにある相補性決定領域(CDRs)又は高頻度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、大きく -シート構造をとり、 -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、CDRsにより連結された4つのFR領域をそれぞれ含んでいる。各鎖のCDRは、FRにより近接して結合せしめられ、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, NIH Publ. No.91-3242, Vol.1, 647-669頁(1991)参照)。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、抗体依存性細胞毒性への抗体の関与といった種々のエフェクター機能を示す。

【0077】

ここで使用される場合の「高頻度可変領域」は、抗原結合の原因となる抗体のアミノ酸残基を指す。高頻度可変領域は、「相補性決定領域」又は「CDR」（例えば、軽鎖可変領域の残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)及び重鎖可変領域の31-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3)；Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)）からのアミノ酸残基、及び／又は「高頻度可変ループ」（例えば、軽鎖可変領域の残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)及び重鎖可変領域の残基26-32(H1)、53-55(L2)及び96-101(L3)；Chothia及びLesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)）からの残基を含む。「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。

「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

10

20

30

40

50

を含む。抗体断片の例は、F_ab、F_ab'、F(a b')₂、及びF_v断片；ダイアボディ(diabody)；直鎖状抗体(Zapata等, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995])；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成される多重特異的抗体を含む。

抗体のパパイン消化は、「F_ab」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、及び容易に結晶化する能力を反映した名称の残りの「F_c」断片を生成する。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。

【0078】

「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CDRが相互作用する。正確には、6つのCDRが抗体に抗原結合特異性を与える。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原特異的な3つのCDR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。
10

また、F_ab断片は軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)も含む。F_ab断片は、抗体ヒンジ領域からの1つ又は複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端における数個の残基の付加によりF_ab断片と相違する。F_ab'-SHは、ここにおいて、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を持つF_ab'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_ab'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。
20

任意の脊椎動物種からの抗体(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：IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMがあり、これらの幾つかは、更にサブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及びIgA2に分けられる。

【0079】

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、Kohler等, Nature, 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、Clackson等, Nature, 352: 624-628 [1991]及びMarks等, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)に記載された技術を用いて単離してもよい。また、ファージミド及びファージベクターを用いた抗体の調製を記載した米国特許第5,750,373号、第5,571,698号、第5,403,484号及び第5,223,409号も参照。
30
40

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
50

ある（米国特許第4,816,567号；Morrison等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 [1984]）。

【0080】

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。幾つかの場合では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）の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又はフレームワーク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大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)；及びPresta, Curr. Op. struct. Biol. 2: 593-596 (1992)を参照のこと。ヒト化抗体は、抗体の抗原結合領域が対象とする抗原でマカゲ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PRIMATIZED（商品名）抗体を含む。10
20

【0081】

「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ンクーを更に含み、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。30

「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クーを使用して、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；W093/11161；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。30

【0082】

「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ケン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充分な程度まで、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、組換え体細胞内のインサル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。40

【0083】

「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50

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。

「固相」とは、本発明の化合物が接着できる非水性マトリクスを意味する。ここに含まれる固相の例は、部分的又は全体的にガラス（例えば、孔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ー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ーカラム）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。

【0084】

10

「リポソーム」は、哺乳動物への薬物（PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO228、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド又はそれに対する抗体）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。

「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。

【0085】

I I . 本発明の組成物と方法

A . 全長PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチド

20

本発明は、本出願においてPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチドと称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ヌクレオチド配列を提供する。特に、以下の実施例で更に詳細に開示するように、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチドをコードするcDNAを同定し単離した。

30

以下の実施例に開示するように、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチドをコードするcDNAクローニングはATCCに寄託されている〔例外として、PRO509ポリペプチドをコードするcDNAはATCCに寄託されていない〕。クローニングの実際の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ニングの配列決定することにより当業者によって容易に決定される。予測されるアミノ酸配列は、日常的な技量を用いて又クレオチド配列から決定できる。ここに記載するPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチド及びコード化配列について、本出願人は現時点で入手可能な配列情報に最も適合するリーディングフレームと考えられるものを同定した。

40

【0086】

B . PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866変異体

ここに記載した全長天然配列PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチドに加えて、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチド

50

O328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866変異体も調製できると考えられる。PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866変異体は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866DNAに適当なヌクレオチド変化を導入することにより、及び/又は所望のPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドを合成することにより調製できる。
10 当業者は、適切なアミノ酸変化がPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの翻訳後プロセスを変えうること、例えばグリコシル化部位の数の変化又は膜固着特性の改変を理解するであろう。

【0087】

ここに記載したPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866の天然全長配列又はPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866の種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第5,364,934号に記載されている保存的及び非保存的変異についての任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドと比較してPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドのアミノ酸配列が変化するような、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドをコードするコドンの一又は複数の置換、欠失又は挿入であってよい。場合によつては、変異は少なくとも1つのアミノ酸のPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。いずれのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、本発明のポリペプチドの配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸を類似した構造又は化学特性を持つ他のアミノ酸で置換した結果、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とすることができます。挿入及び欠失は、場合によつては1から5のアミノ酸の範囲内とすることができます。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、得られた変異体を全長又は成熟天然配列によって発揮される活性について試験することにより決定される。
40

【0088】

PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチドの断片もここに提供される。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場合、N-末端又はC-末端で切断されていてもよいし、あるいは内部残基を欠いていてもよい。或る種の断片はPRO179、PRO207、
50

PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの所望の生物活性に対して必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866断片は多くの従来の方法の任意のものによって調製することができる。所望のペプチド断片を化学的に合成してもよい。他のアプローチは、酵素消化により、例えば特定のアミノ酸残基により定まる部位でタンパク質を切断することが知られている酵素でタンパク質を処理するか、適当な制限酵素でDNAを消化させることによりPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチド断片を產生し、所望の断片を単離することを含む。10。さらに他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応法(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定めるオリゴヌクレオチドをPCRにおける5'及び3'プライマーとして使用する。好ましくは、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチドポリペプチド断片は、各々Fig 2(配列番号：15)、Fig 16(配列番号：35)、Fig 18(配列番号：43)、Fig 20(配列番号：48)、Fig 22(配列番号：55、Fig 24(配列番号：60)20)、又はFig 26(配列番号：62)に示される天然のPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド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。

【0089】

特別の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換という見出しの下に表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の例示的置換と名前付けた、又はさらに下段に示したアミノ酸分類に関するような、より大幅な変化が導入されて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	10
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	20
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	

【0090】

PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの機能及び免疫学的同一性の大幅な修飾は、(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)側鎖の大部分、の維持への効果が有意に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は、共通の側鎖特性に基づいてグループに分けられる：

- (1) 疎水性：ノルノイシン、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) 鎮配向に影響する残基：gly, pro; 及び
- (6) 芳香族：trp, tyr, phe

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

【0091】

変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びPCR突然変異誘発等のこの分野で周知の技術を用いてなすことができる。部位特異的突然変異誘発[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[Wellis等, Gene, 34: 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発[Wellis等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 450

15 (1986)] 又は他のこの分野で知られた技術をクローニングしたDNAに実施して、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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。中でも好ましいスキャンニングアミノ酸は、比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham及びWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman and 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。

【0092】

C. PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチドの修飾

PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。
共有結合的修飾のひとつの型は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの選択された側鎖又はN-又はC-末端残基と反応可能な有機誘導体化試薬と反応させることを含む。二官能性試薬での誘導体化が、例えばPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドを水不溶性支持体マトリクスあるいは抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328, 抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866抗体の精製方法又はその逆で用いるための表面に架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬を含む。

他の修飾は、グルタミニル及びアスパラギニル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-N-アミノ基のメチル化[T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman and 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。

【0093】

本発明の範囲内に含まれるPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの共有結合的修飾の他

10

20

30

40

50

の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンを変更することを含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、ここでの目的のためには、天然配列 PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチドに見出される1つ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による)、及び/又は天然配列 PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチドに存在しない1つ又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。さらに、この語句は、存在する種々の炭水化物部分の性質及び比率の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化の定性的変化を含む。
10

PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 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によって達成されうる。この変更は、例えば、天然配列 PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 への一又は複数のセリン又はスレオニン残基の付加、又はこれによる置換によつてもなされる(O-結合グリコシル化部位の場合)。場合によつては、PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 アミノ酸配列はDNAレベルでの変化によつて、特に所望のアミノ酸に翻訳されるコドンが產生されるように予め選んだ塩基においてPRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチドをコードしているDNAを突然変異させることによつて変更される。
20

【0094】

本発明のPRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド上の炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、ポリペプチドへのグリコシドの化学的又は酵素的結合による。これらの方法は1987年9月11日公開の国際特許出願第W0 87/05330号及びAplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp259-306 (1981)に記載されている。
30

PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的あるいはグリコシル化の標的となるアミノ酸残基をコードするコドンの突然変異的置換によりなされる。例えば、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)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開裂は、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-グリコシダーゼを使用して達成することができる。
40

【0095】

PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 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4,6450

0,835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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866を含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。

【0096】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドと、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドとの融合体を含む。エピトープタグは、一般的にはPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドのアミノ-又はカルボキシル-末端に位置する。このようなPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドを容易に精製できるようになる。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(Flag)-ペプチド[Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド[Martin等, Science, 255:192-194 (1992)]；-チューブリンエピトープペプチド[Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ[Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)]を含む。

これに換わる実施態様では、キメラ分子はPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドと免疫グロブリン或いは免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態(「イムノアドヘシン」とも呼ばれる)については、そのような融合体はIgG分子のFc領域であり得る。IgG融合体は、好ましくはIgG分子内の少なくとも1つの可変領域に換えてPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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、IgG1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。

【0097】

D . PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチドの調製

以下の説明は、主として、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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るPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866の生産に関する。 10

もちろん、当該分野において良く知られている他の方法を用いてPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866を調製することができると考えられる。例えば、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド配列、或いはその一部は、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。PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの種々の部分を別々に化学的に合成し、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて、全長のPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドを製造してもよい。 20

【0098】

1 . PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866をコードするDNAの単離 30

PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866をコードするDNAは、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866 mRNAを保有し、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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866 DNAは、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製されたcDNAライブラリから簡便に得ることができる。またPRO179-、PRO207-、PRO320-、PRO219-、PRO221-、PRO224-、PRO328-、PRO301-、PRO526-、PRO362-、PRO356-、PRO509-、又はPRO866-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリーから又は公知の合成方法 (例えば、自動化核酸合成) により得てもよい。

ライブラリーは、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 (PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866に対する抗体、或いは少なくとも 50

約20-80塩基のオリゴヌクレオチド等の)プローブ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。PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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)]。

【0099】

10

下記の実施例は、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、充分な長さで、疑陽性が最小化されるよう充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。中程度の緊縮性及び高度の緊縮性を含むハイブリッド形成条件は、上掲のSambrook等に与えられている。

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列は、Genbank等の公共データベース又は個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の所定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、この分野で知られここに記載する方法を用いて決定できる。

20

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することにより選択したcDNA又はゲノムライブラリーのスクリーニングにより得られる。

【0100】

2.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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866生産のための発現或い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增幅するために適当に改変された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M.Butler編(IRL Press, 1991)及びSambrook等, 上掲に見出すことができる。

30

真核生物細胞形質移入及び原核生物形質転換の方法、例えば、CaCl₂、CaPO₄、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、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細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が用いられる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母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

40

50

チオン、例えばポリブレン、ポリオルニチンでの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。

【0101】

ここに記載のベクターにおいて、DNAをクローニング或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、例えば、大腸菌 K 12 株 MM 294 (ATCC31,446)；大腸菌 X 1776 (ATCC31,537)；大腸菌株 W 3110 (ATCC27,325) 及び K 5772 (ATCC53,635) が公衆に利用可能である。他の好ましい原核生物宿主細胞は、例えば、大腸菌(*Escherichia*)、例えば大腸菌(*E.coli*)、エンテロバクター、エルヴィニア(*Erwinia*)、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ、例えばネズミチフス菌、セラチア、例えば霊菌、及び赤痢菌等の腸内細菌科；枯草菌及びビー・リシェニフォルミス(*B. licheniformis*)等の桿菌(例えば、1989年4月12日に発行されたDD 266,710に開示されたビー・リシェニフォルミス 41P)；緑膿菌等のシュードモナス；及びストレプトマイセスである。これらの例は例示的であり限定するものではない。大腸菌株 W 3110 は、組み換えDNA生産発酵の共通の宿主株であるので、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 W 3110 は宿主に外因性のタンパク質をコードする遺伝子において遺伝子変異をもたらすために修飾してもよく、そのような宿主の例は、完全な遺伝子型 *tonA* を有する大腸菌 W 3110 株 1A2；完全な遺伝子型 *tonA ptr3* を有する大腸菌 W 3110 株 9E4；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degPompT kanr* を有する大腸菌 W 3110 株 27C7 (ATCC 55,244)；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degPompT rbs7 ilvG kanr* を有する大腸菌 W 3110 株 37D6；株 37D6 の非カナマイシン耐性 *degP* 欠失変異体である大腸菌 W 3110 株 40B4；及び1990年8月7日に発行された米国特許第4,946,783号に記載された変異体周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、インビトロのクローニング法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【0102】

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、PRO179-、PRO207-、PRO320-、PRO219-、PRO221-、PRO224-、PRO328-，PRO301-、PRO526-、PRO362-、PRO356-、PRO509-、又はPRO866-をコードするベクターの適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセスプロンブ(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日発行のEP 139,383)；クルベロミセスホスツ(*Kluveromyces hosts*) (米国特許第4,943,529号; Fleer等, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991))、例えばケーラクチス(*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt等, *J. Bacteriol.* 737 [1983])、ケーフラギリス(*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、ケーブルガリクス(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、ケーウィケラミイ(*K. wickeramii*) (ATCC 24,178)、ケーワルチイ(*K. waltii*) (ATCC 56,500)、ケードロソフィラルム(*K. drosophilae*) (ATCC 36,906; Van den Berg等, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990))、ケーテモトレランス(*K. themotolerans*)及びケーマルキシアヌス(*K. marxianus*)；ヤロウイア(yarrowia) (EP 402,226)；ピッチャパストリス(*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sheekrishna等, *J. Basic Microbiol.* 28: 265-278 [1988])；カンジダ；トリコデルマレーシア(*reesia*) (EP 244,234)；アカパンカビ (Case等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979])；シュワニオマイセス(*schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス(*occidentalis*) (1990年10月31日発行のEP 394,538)；及び糸状真菌、例えば、ニュー

10

20

30

40

50

ロスボラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(*Tolypocladium*) (1991年1月10日発行のWO 91/00357)；及びコウジ菌、例えば偽巣性コウジ菌(Ballance等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburn等, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984])及びクロカビ(Kelly及びHynes, *E MBO J.*, 4: 475-479 [1985])が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(Hansenula)、カンジダ、クロエケラ(Kloeckera)、ピチア(Pichia)、サッカロミセス、トルロプシス(Torulopsis)、及びロドトルラ(Rhodotorula)からなる属から選択されるメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982)に記載されている。

10

【0103】

グリコシリ化されたPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎生物細胞の例としては、ショウジョウバエS2及びスピードスペラ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細胞系の例は、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ニングされた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/-DHF R(CHO), (Urlaub及びChasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980));マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980));ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75);ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065);及びマウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATTC CCL51)を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

20

【0104】

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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の增幅)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ます。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、エンハンサー要素、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。

30

PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866は、必ずしも直接的に組換え手法によって生産されるだけではなく、シグナル配列、或いは成熟タンパク質又はポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のペプチドのような異種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、又はベクターに挿入されるPRO179-、PRO207-、PRO320-、PRO219-、PRO221-、PRO224-、PRO328-、PRO301-、PRO526-、PRO362-、PRO356-、PRO509-、又はPRO866-をコードするDNAの一部となれる。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、Ippあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーザーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーザー、アルファ因子リーザー(酵母菌属(

40

50

Saccharomyces)及びクルイベロマイシス(*Kluyveromyces*) 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスフォターゼリーダー、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 362,179)、又は1990年11月15日に公開された国際特許出願第WO 90/13646号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、同一あるいは関連する種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列、ウイルス分泌リーダーのような他の哺乳動物のシグナル配列をタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【0105】

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、酵母菌及びウイルスに対してよく知られている。プラスミド p B R 3 2 2 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菌に適しており、様々なウイルス開始点(S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V 又はB P V)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選択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対する耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)バチルスの遺伝子コードD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子の例のように、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。

【0106】

哺乳動物細胞のための適切な選択マーカーの他の例としては、D H F Rあるいはチミジンキナーゼのように、PRO 1 7 9 -、PRO 2 0 7 -、PRO 3 2 0 -、PRO 2 1 9 -、PRO 2 2 1 -、PRO 2 2 4 -、PRO 3 2 8 -、PRO 3 0 1 -、PRO 5 2 6 -、PRO 3 6 2 -、PRO 3 5 6 -、PRO 5 0 9 -、又はPRO 8 6 6 -をコードした核酸を取り込むことのできる細胞の能力を同定することのできるものである。野生型D H F Rを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub等により、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたD H F R活性欠損のC H O細胞系である。酵母菌中の使用に好適な選択遺伝子は酵母菌プラスミドY R p 7 に存在するt r p 1 遺伝子である [Stinchcomb等, Nature, 282: 39(1979); Kingman等, Gene, 7: 141(1979); Tschemper等, Gene, 10: 157(1980)]。t r p 1 遺伝子は、例えば、ATCC第44076号あるいはP E P 4 - 1 のようなトリプトファン存在下で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

発現及びクローニングベクターは、通常、PRO 1 7 9 -、PRO 2 0 7 -、PRO 3 2 0 -、PRO 2 1 9 -、PRO 2 2 1 -、PRO 2 2 4 -、PRO 3 2 8 -、PRO 3 0 1 -、PRO 5 2 6 -、PRO 3 6 2 -、PRO 3 5 6 -、PRO 5 0 9 -、又はPRO 8 6 6 -コード化核酸配列に作用可能に結合し、mRNA合成を指示するプロモーターを含む。種々の潜在的な宿主細胞により認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 [Cahng等, Nature, 275:615 (1978); Goeddel等, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、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t a c 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もまたPRO 1 7 9 -、PRO 2 0 7 -、PRO 3 2 0 -、PRO 2 1 9 -、PRO 2 2 1 -、PRO 2 2 4 -、PRO 3 2 8 -、PRO 3 0 1 -、PRO 5 2 6 -、PRO 3 6 2 -、PRO 3 5 6 -、PRO 5 0 9 -、又はPRO 8 6 6 -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。

【0107】

酵母菌宿主と共に用いる好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ [Hitzeman等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 又は他の糖分解酵素 [Hess

10

20

30

40

50

等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900(1978)]、例えはエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母菌プロモーターで、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としては、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はEP 73, 10 657に更に記載されている。

【0108】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866の転写は、例えは、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(例えはアデノウィルス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、異種性哺乳動物から得られるプロモーター、例えはアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

より高等の真核生物によるPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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、エラスターーゼ、アルブミン、-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)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

【0109】

また真核生物宿主細胞(酵母菌、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由來の有核細胞)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、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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。

組換え体細胞培養でのPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866の合成を適応化するのに適切なさらに他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei等,

10

20

30

40

50

Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060; 及びEP 117,058に記載されている。

【0110】

4. 遺伝子増幅 / 発現の検出

遺伝子の増幅又は発現は、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、従来からのサザンプロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンプロット法 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、ドットプロット法(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-タンパク二重鎖を含む、特異的二重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、ここで二重鎖は表面に結合しており、その結果二重鎖の表面での形成の時点でその二重鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。10

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、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの天然配列に対して、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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866DNA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。20

【0111】

5. ポリペプチドの精製

PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866の形態は、培地又は宿主細胞の溶解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。PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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。30

PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866を組換え体細胞タンパク質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filtration；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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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)に記載されている種々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、用いられる産生方法及び特に産生されるPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PR40
50

O 3 5 6、PRO 5 0 9、又はPRO 8 6 6の性質に依存する。

【0112】

E. 抗体

本発明の組成物及び方法で使用するための候補薬剤の幾つかは、PRO 1 7 9、PRO 2 0 7、PRO 3 2 0、PRO 2 1 9、PRO 2 2 1、PRO 2 2 4、PRO 3 2 8、PRO 3 0 1、PRO 5 2 6、PRO 3 6 2、PRO 3 5 6、PRO 5 0 9、又はPRO 8 6 6ポリペプチドの生物学的活性を模倣す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、PRO 1 7 9、PRO 2 0 7、PRO 3 2 0、PRO 2 1 9、PRO 2 2 1、PRO 2 2 4、PRO 3 2 8、PRO 3 0 1、PRO 5 2 6、PRO 3 6 2、PRO 3 5 6、PRO 5 0 9、又はPRO 8 6 6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。10 20

【0113】

2. モノクローナル抗体

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

免疫化剤は、典型的にはPRO 1 7 9、PRO 2 0 7、PRO 3 2 0、PRO 2 1 9、PRO 2 2 1、PRO 2 2 4、PRO 3 2 8、PRO 3 0 1、PRO 5 2 6、PRO 3 6 2、PRO 3 5 6、PRO 5 0 9、又はPRO 8 6 6ポリペプチド或いはその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「PBL」)が使用されるか、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、ポリエチレンギリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化細胞系と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。不死化細胞系は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髄腫細胞系が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好みしくは、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、アミノブ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 40

【0114】

好み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。より好みしい不死化細胞系はマウス骨髄腫系であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやメリーランド州ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャーコレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体50

を生成するためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒト異種骨髄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]。

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866に対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(RIA)や酵素結合免疫測定法(ELISA)等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキヤツチャード分析法によって測定することができる。10

【0115】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを制限希釈工程によりサブクローンングし、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、ダルベッコの変形イーグル培地及び 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。

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティ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。20

【0116】

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髄腫細胞内に形質移入され、組換え体宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより [US. Patent No.4,816,567; Morrison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產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。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いる。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。

【0117】

3. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化型とは、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、50

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)]。

【0118】

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); Verhoeven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。

【0119】

また、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリー [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; Boerner等, J. Immunol., 147 (1): 86-95(1991); 米国特許第5,750,373号))。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。負荷試験の際に、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。

【0120】

4. 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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO35

10

20

30

40

50

6、PRO509、又はPRO866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

【0121】

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。

WO 96/27011に記載された他のアプローチによれば、一対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ダイマーのパーセントを最大にすることができます。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)と置き換えられる。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(アラニン又はトレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面を作り出す。これにより、ホモダイマー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。

20

【0122】

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产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断片を产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砒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。產生されたF(ab')₂断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。F(ab')₂-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF(ab')₂-チオールに再転換し、他のF(ab')₂-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。生成さ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。

30

大腸菌からF(ab')₂断片を直接回収し、化学的に結合して二重特異性抗体を形成してもよい。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F(ab')₂断片は大腸菌から別個に分泌され、インピトロで定方向化学結合させて二重特異性抗体を形成する。このように形成された二重特異性抗体は、Erbb2レセプターを過剰発現している細胞及び正常なヒトT細胞に結合でき、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の溶解活性をトリガーする。

40

【0123】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片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た。Kostel

50

ny等, J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。F o s 及びJ u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドが遺伝子融合により二つの異なった抗体のF a b'部分に結合された。抗体ホモダイマーはヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、ついで再酸化させ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断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短いリンクアーキ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、一つの断片の V_H 及び V_L ドメインは他の断片の相補的 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。一本鎖Fv(sFv)ダイマーを使用する他の二重特異性抗体断片製造方法もまた報告されている。Gruber等, J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい。10

【0124】

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。Tuttlar J. Immunol. 147:60(1991)。

例示的二重特異性抗体は、ここで与えられるPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド上の2つの異なるエピトープに結合しうる。あるいは、抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866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Fc_{RI}(CD64)、Fc_{RII}(CD32)及びFc_{RIII}(CD16)等のIgGのFcレセプター(Fc_R)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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド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、細胞毒性薬を特定のPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドを発現する細胞に局在化させるのに使用してもよい。これらの抗体は、PRO179-、PRO207-、PRO320-、PRO219-、PRO221-、PRO224-、PRO328-、PRO301-、PRO526-、PRO362-、PRO356-、PRO509-、又はPRO866-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、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328, PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドに結合し、さらに組織因子(TF)に結合する。2030

【0125】

5. 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内である。ヘテロ抱合抗体は2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため[米国特許第4,676,980号]及びHIV感染の治療のために[WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されているものが含まれる。4050

【0126】

6. 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トイ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. 176:1191-1195 (1992) 及びShopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)を参照されたい。抗腫瘍活性が高められたホモダイマー抗体は、Wolff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, Anti-cancer Drug Design 3:219-230 (1989)を参照。

【0127】

7. 免疫複合体

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

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬は上記した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片は、ジフテリア A鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、コレラ毒素、ボツリヌス毒素、(緑膿菌からの)外毒素 A鎖、リシン A鎖、アブリン A鎖、モデクシン(modeccin) A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)タンパク質(PAP I、PAP II、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サバオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロンин(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(trichothecene)を含む。様々な放射性又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²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y 及び¹⁸⁶Re を含む。

【0128】

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(SPD P)、イミノチオラン(IFT)、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ペレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta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(MXTPA)は、放射性又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」(ストレプトアビシン等)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、放射性又クレオチド等)に抱合された「リガンド」(例えばアビシン)を投与する。

【0129】

8. 免疫リポソーム

また、ここに開示するタンパク質、抗体などは免疫リポソームとして調製してもよい。抗体を含むリポソームは、Epstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hw 50

ang等, Proc. natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

特に有用なりポソームは、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(ドキソルビシン等)は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizon等, J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989)参照。

10

【0130】

F. 腫瘍性細胞成長又は増殖を阻害できるタンパク質の同定

本出願で開示したタンパク質を、国立癌学会(NCI)の実験的、疾患指向性、インビトロ薬剤スクリーニングで現在使用されている60腫瘍系のパネルで検定した。このスクリーニングの目的は、異なる型の腫瘍に対する細胞毒性及び/又は細胞増殖抑制活性を有する分子を同定することである。NCIは毎年10,000を越える新たな分子をスクリーニングしている(Monks等, J. Natl. Cancer Inst., 83: 757-766 (1991); Boyd, Cancer: Principles Pract. Oncol. Update, 3(10): 1-12 [1989])。この実験に使用された腫瘍細胞系は、上掲のMonks等に記載されている。本出願のタンパク質によって成長が有意に阻害された細胞系を実施例で特定した。

20

【0131】

結果は、試験したタンパク質が種々の癌細胞系において細胞増殖抑制性、そして或る場合及び濃度では細胞毒性活性を示すことを明らかにした。

腫瘍(例えば癌)についての他の細胞ベースのアッセイ及び動物モデルも、NCI癌スクリーニングの発見を裏付け、ここで同定したタンパク質と腫瘍精細胞成長の進行及び病因当量の関係をさらに理解するのに使用できる。例えば、(以下に記載するような)トランスジェニック動物における腫瘍から一次培地は、こここの細胞ベースのアッセイで使用できるが、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公知である(例えば、Small等, Mol. Cell. Biol., 5: 642-648 [1985]参照)。

30

【0132】

G. 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オの性質により、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。)

40

【0133】

癌遺伝子の研究におそらく最もしばしば用いられる動物種は、免疫不全マウス、特にヌードマウスである。ハイポ/形成不全を持つヌードマウスがヒト腫瘍異種移植の宿主として行動するという観察は、この目的のための広い用途を導いた。常染色体劣性nu遺伝子が、例えば、ASW、A/He、AKR、BALB/c、B10.LP、C17、C3H、C57BL、C57、CBA、DBA、DDD、I/st、NC、NFR、NFS、NFS/N、NZB、NZC、NZW、P、RIII及びSJLを含むヌードマウスの極めて多数の異なる共通遺伝子系統に導入された。さらに、遺伝的な免疫不全を持つヌードマウ

50

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。

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(*n*euプロトオンコジーンで形質移入された安定N_IH-3T3細胞系)；ras-形質移入N_IH-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])。 10

【0134】

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。乳癌の動物モデルは、例えば、神経芽腫細胞(それから*n*eu癌遺伝子が最初に単離される)、又は*n*eu形質移入N_IH-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。 20

【0135】

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. (SanDiego, California)から市販の「METAMOUSE」に基づく。

動物に生じた腫瘍は、取り出してインビトロで培養することができる。インビトロ培地からの細胞は、次いで動物に継代することができる。これらの腫瘍は、さらなる試験及び薬物スクリーニングの標的として提供され得る。あるいは、継代から得られる腫瘍は単離でき、継代前細胞及び1又はそれ以上の継代後に単離した細胞のRNAを、対象とする遺伝子の識別可能な発現について分析する。このような継代技術は、周知の腫瘍又は癌細胞系で実施することができる。 30

【0136】

例えば、Meth A、CMS4、CMS5、CMS21、及びWEHI-164がBALB/c雌マウスの線維肉腫に導入され(DeLeo等, J. Exp. Med. 146, 720 [1977])、それは、種々の抗原の抗-腫瘍活性の研究のための高度に制御可能なモデル系を提供する(Palladino等, J. Immunol. 138, 4023-4032 [1987])。簡便には、腫瘍細胞は細胞培地中でインビトロで成長させる。動物に注射する前に、細胞系は洗浄してバッファー中に約10×10⁶から10×10⁷細胞/mlの細胞密度で懸濁する。次いで動物を10から100μl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。 40

【0137】

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關していた。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, H 50

aemostasis 16, 300-320 [1986]を参照のこと。

【0138】

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。

10

【0139】

組換え（トランスジェニック）動物モデルは、ここに同定された遺伝子のコード部分を、トランスジェニック動物作成のための標準的技術を用いて、対象とする動物のゲノムに導入することにより加工できる。トランスジェニック操作の標的として提供できる動物は、限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、及び非ヒト霊長類、例えばヒヒ、チンパンジー及びサルを含む。これらの動物に導入遺伝子を導入するのにこの分野で知られた技術は、前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. Cel. 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。

20

【0140】

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。

30

【0141】

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モニターできる。例えば、導入遺伝子の組み込みの確認にサザンプロット分析又はPCR增幅が用いられる。次いで、mRNA発現のレベルは、インサイツハイブリッド形成、ノーザンプロット分析、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、腫瘍又は癌発生の徵候についてさらに試験される。

【0142】

40

自然発生性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態による。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

50

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。

【0143】

さらに、他の自然発生性動物腫瘍、例えばイヌ、ネコ、及びヒヒの線維肉腫、腺癌、リンパ腫、クロンドローマ(chondroma)、平滑筋肉腫も試験できる。これらのイヌ及びネコでの乳腺癌は、その発現及び挙動がヒトのものに極めて類似しているので、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。

10

【0144】

H. 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、個々に同定されたポリペプチドのレセプターと競合的に結合又は複合体形成する化合物、及びそのようなレセプターを通じたシグナル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、抗体合成有機又は無機化合物を含むと考え、それらは、ペプチド、好ましくは可溶性ペプチド、(ポリ)ペプチド-免疫グロブリン融合体、特に、限定されないが、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びそれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。アッセイは、種々の形式で実施でき、この分野で良く特徴付けられたタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ及び細胞ベースのアッセイを含む。

20

【0145】

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、例えばミクロタイターブ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、固定化すべきポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、それを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体によって検出できる。

30

【0146】

候補化合物が相互作用するが特定のレセプターに結合しない場合、そのレセプターとの相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、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モニターすることができる。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

40

50

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。GAL1-1acZ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。相互作用するペプチドを含むコロニーは、-ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（MATCHMAKER（商品名））は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこ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。10

【0147】

I. 製薬組成物

本発明のペプチド、ここに同定したタンパク質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、癌を含む腫瘍の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。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、化学的に合成でき及び／又は組換えDNA技術によって生成できる（例えば、Marasco等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 78 20 89-7893 [1993]）。20

【0148】

また、ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に1以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、例えば細胞毒性薬、サイトカイン、化学治療薬、又は成長阻害剤といったその機能を向上させる薬剤を含んでもよい。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。

【0149】

ここで同定されるペプチド、又はそれらのアゴニストの治療用製剤は、所望される程度の純度を持つ活性成分を、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；シクロヘキサンノール；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）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单糖類、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）及び／又はトウイーン（TWEEN）（商品名）、フルロニクス（PLURONICS）（商品名）、及びポリエチレン glycol（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。3040

【0150】

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に1以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、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50

子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

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

【0151】

インビオ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。

治療的抗体組成物は、一般的に無菌のアクセスポートを具備する容器、例えば、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針で貫通可能なストッパーを備えたバッグ又はバイアルに入れられる。

【0152】

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

【0153】

J. 治療方法

本発明のポリペプチド及び抗体、ペプチド及び小分子アゴニストを含むそれらのアゴニストは、種々の腫瘍、例えば癌の治療に用いてもよい。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、結腸直腸、前立腺、肺、外陰部、胸腺、肝癌(hepatocarcinoma)；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、視床下部及び腺、マクロファージ、上皮、間質及び胞胚腔疾患などの疾患；及び炎症、脈管形成及び免疫学的疾患が含まれる。本発明の抗腫瘍剤(ここに開示したポリペプチド及びそれらの活性に類似したアゴニスト、例えば抗体、ペプチド及び有機小分子を含む)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、又は筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、眼内、動脈内、病巣内、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。

【0154】

他の治療的養生法を本発明の抗癌剤の投与に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.

10

20

30

40

50

Perry編, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。化学治療薬は、本発明の抗腫瘍剤の投与に先立って、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。本発明の抗癌剤は、タモキシフェンなどの抗エストロゲン化合物又はオナブリストンなどの抗プロゲステロン(EP 616812参照)の、こ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。

【0155】

また、腫瘍関連抗原に対する抗体、例えばErB2、EGFR、ErB3、ErB4、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、こここの抗癌剤は成長阻害剤と同時投与される。例えば、まず成長阻害剤を投与し、続いて本発明の抗癌剤を投与する。しかしながら、同時投与、又は本発明の抗癌剤を最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は現在用いられている量であるが、成長阻害剤とこの抗体との組み合わせ(相乗)効果により減少させ得る。10

【0156】

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、患者に、一回又は一連の治療に渡って適切に投与される。動物実験は、ヒトの治療に有効な用量を決定するための信頼性のある指針を提供する。有効な用量の種間スケーリングは、例えば、Mordenti J.及びChappell W.「The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics」, Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobiら編, Pergamon Press, New York 1989, 42-46に開示されているような原理に従い実施することができる。20

【0157】

例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約1μg/kgから15mg/kg(例えば、0.1-20mg/kg)の抗腫瘍剤が、例えば、1又はそれ以上の別々の投与あるいは連続注入により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1μg/kgから100mg/kg以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徵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モニターされる。特に用量及び送達方法に対する指針は文献にて提供されており；例えば米国特許第4,657,760号、同5,206,344号又は同5,255,212号を参照のこと。異なる調製物が異なる治療用化合物及び異なる疾患に有効であること、例えば一つの器官又は組織を標的とする投与には他の器官又は組織とは異なる方式で輸送することが必要であることが予想される。30

【0158】

K. 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具備する。好適な容器は、例えば、ピン、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本発明の抗腫瘍剤である。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。40

【0159】

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。

【0160】

(実施例)

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC登録番号により以下の実施例及び明細書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、マナッサス、VAである。

【0161】

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の公知の分泌タンパク質の細胞外ドメイン(ECD)配列(必要ならば、分泌シグナル配列を含む)を、ESTデータベースの検索に使用した。ESTデータベースは、公的データベース(例えば、Dayhoff、GenBank)及び独自に開発したデータベース(例えば、LIFSEQ(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BLAST2(Altschul et al., Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて、ECDタンパク質配列のEST配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。公知のタンパク質をコードせず、Blastスコア70(90の場合もある)又はそれ以上を持つ比較は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, WA; <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>)でクラスター形成してコンセンサスDNA配列に構築した。10 20

この細胞外ドメイン相同性スクリーニングを用いて、phrapを用いて他の同定されたEST配列に対してコンセンサスDNA配列を構築した。さらに、得られたコンセンサスDNA配列を、しばしば(全てではない)BLAST又はBLAST2及びphrapの繰り返しサイクルを用いて伸長し、コンセンサス配列を上で議論したEST配列の供給源を用いて可能な限り伸長させた。

上記のように得られたコンセンサス配列に基づいて、次いでオリゴヌクレオチドを合成し、PCRにより対象とする配列を含むcDNAライプラリを同定するため、及びPROポリペプチドの全長コード化配列のクローンを単離スループローブとして用いるために使用した。正方向及び逆方向PCRプライマーは一般的に20から30ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約100-1000bp長のPCR産物を与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。或る場合には、コンセンサス配列が約1-1.5kbより大きいときに付加的なオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライプラリをスクリーニングするために、ライプラリからのDNAを、Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology, のように、PCRプライマー対でのPCRによりスクリーニングした。ポジティブライプラリーを、次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて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。30

cDNAクローンの単離に用いたcDNAライプラリは、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へ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(pRK B又はpRK D等；pRK5 B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。40

【0162】

実施例2：ヒトPRO179をコードするcDNAの単離

天然ヒトPRO179ポリペプチドをコードするcDNAクローン(DNA16451-1078)は、酵母スクリーニングを用いて、cDNAクローンの5'末端を優先的に表すヒト胎児腎臓cDNAライプラリから同定された。

D N A 1 6 4 5 1 - 1 0 7 8 の同定に使用されたプライマーは、次の通りである：

O L I 1 1 4 :

5'-CCACGTTGGCTTGAAATTGA-3' (配列番号：3)

O L I 1 1 5 :

5'-CCTTCTAGAATTGATCAAGACAATTATGATTTGATTCTCTATCTCCAGAG-3'

(配列番号：4)

O L I 1 1 6 :

5'-TCGTCTAACATAGCAAATC-3' (配列番号：5)

D N A 1 6 4 5 1 - 1 0 7 8 全長クローンは、単一のオーブンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 37 - 39 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 1417 - 1419 に停止シグナルを持っていた (Fig 1；配列番号：1)。予測されるポリペプチド前駆体は 460 アミノ酸長である。全長 P R O 1 7 9 タンパク質は、Fig 2 (配列番号：2) に示されている。

Fig 2 (配列番号：2) に示された全長 P R O 1 7 9 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証明されたが、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 P R O 1 7 9 配列の分析により次のことが証明された：シグナルペプチドはおよそアミノ酸 1 - 16 にある。N-グリコシリ化部位はおよそアミノ酸 23 - 27、およそ 115 - 119、およそ 296 - 300、及びおよそ 357 - 361 にある。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はおよそアミノ酸 100 - 104、及びおよそ 204 - 208 にある。チロシンキナーゼリン酸化部位はおよそアミノ酸 342 - 351 にある。N-ミリストイル化部位はおよそアミノ酸 279 - 285、およそアミノ酸 352 - 358、およそアミノ酸 367 - 373 にあり、ロイシンジッパーパターンはおよそアミノ酸 120 - 142、及び 127 - 149 にある。

クローン D N A 1 6 4 5 1 - 1 0 7 8 は 1997 年 9 月 18 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 209281 が付与された。Fig 2 に示されている全長 P R O 1 7 9 タンパク質は、見積もり分子量がおよそ 53,637 ダルトン、p I が 6.61 を有する。

Fig 2 (配列番号：2) に示した全長配列の D a y h o f f データベース (バージョン 35.45 SwissProt 35) の分析により、T I E - 2 レセプター (h-T I E - 2 L 1 と h-T I E - 2 L 2) の二つ既知のヒトリガンドと有意な配列同一性を示すフィブリノーゲン様ドメインの存在が証明された。「T I E」という略語は頭文字であり、「チロシンキナーゼ含有 I g 及び E G F 相同ドメイン」を意味し、チロシンキナーゼレセプターの新しいファミリーを称するために作られた。従って、P R O 1 7 9 は、T I E リガンドファミリーの新規メンバーと同定された。

【0163】

実施例 3 : ヒト P R O 2 0 7 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 (LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceutical s、Palo Alto, CA) を検索し、A p o - 2 リガンドと相同性を持つ E S T を同定した。そして、ヒト胎児腎臓 c D N A 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 (クローンテック) から単離された m R N A が c D N A ライブラリーの調製のために使用された。この R N A は、Life Technologies, Gaithersburg, MD (Super Script PI asmid System) からの試薬及びプロトコールを用いるベクター p R K 5 D におけるオリゴ d T プライムした c D N A 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 c D N A は 1000 b p を越えるサイズに分類され、S a l I / N o t I 結合 c D N A を X h o I / N o t I 切断ベクターにクローニングした。p R K 5 D は、s p 6 転写開始部位、それに続く S f i I 制限酵素部位、さらに X h o I / N o t I c D N A クローニング部位を持クローニングベクターである。ライブラリーは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：

5'-CCAGCCCTCTGCGCTACAACCGCCAGATCGGGAGTTATAGTCACCCGG-3' (配列番号：8)

10

20

30

40

50

E S T に基づく。

c D N A クローンの配列は、すべておこなわれた。D N A 3 0 8 7 9 - 1 1 5 2 全長クローンは、F i g 3 (配列番号：6)に示されている。クローンD N A 3 0 8 7 9 - 1 1 5 2は、単一のオーブンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置5 8 - 6 0 (F i g 3 ; 配列番号：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 0 5 - 8 0 7に見かけの停止シグナルを持っていた。予測されるポリペプチド前駆体は2 4 9 アミノ酸長である。

F i g 4 (配列番号：7)に示された全長P R O 2 0 7 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証明されたが、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P R O 2 0 7 配列 (F i g 4 ; 配列番号：7)の分析により次のことが証明された：シグナルペプチドはおよそアミノ酸1 - 4 0にある。N - グリコシリ化部位はおよそアミノ酸1 3 9 - 1 4 3、N - ミリストイル化部位はおよそアミノ酸2 7 - 3 3、およそアミノ酸2 9 - 3 5、およそアミノ酸3 6 - 4 2、およそアミノ酸4 5 - 5 1、およそアミノ酸1 1 8 - 1 2 4、およそアミノ酸1 2 1 - 1 2 7、およそアミノ酸1 2 5 - 1 3 1、及びおよそアミノ酸1 2 8 - 1 3 4にあり、アミド化部位はおおよそアミノ酸1 0 - 1 4、及び9 7 - 1 0 1、原核生物膜のリポタンパク質付着部位はおおよそアミノ酸2 4 - 3 5にある。クローンD N A 3 0 8 7 9 - 1 1 5 2は1 9 9 7年1 0月1 0日にA T C Cに寄託され、A T C C 寄託番号2 0 9 3 5 8が付与された。F i g 4 に示されている全長P R O 2 0 7 タンパク質は、見積もり分子量がおよそ2 7 , 2 1 6 ダルトン、p Iが9 . 6 1を有する。

F i g 4 (配列番号：7)に示したP R O 2 0 7 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と、P R O 2 0 7 はT N F 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- (2 3 . 4 %) 及びヒトC D 4 0 - リガンド (1 9 . 8 %) を示す。

【0 1 6 4】

実施例4：ヒトP R O 3 2 0 をコードするc D N A の単離

上記実施例1に記載したようにphrapを使用して、コンセンサスD N A 配列を他のE S T 配列に対して構築した。このコンセンサス配列は、ここにD N A 2 8 7 3 9と命名される。D N A 2 8 7 3 9 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 ライブライアリを同定するため、及び2) P R O 3 2 0 の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した：

正方向P C R プライマー

一对のP C R プライマー（正及び逆方向）が合成された：

5'-CCTCAGTGGCACATGCTCA-3' (配列番号：1 1)

逆方向P C R プライマー

5'-GGCTGCACGTATGGCTATCCATAG-3' (配列番号：1 2)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブは、以下の核酸配列を持つD N A 2 8 7 3 9 配列から作成した。

ハイブリダイゼーションプローブ

5'-GATAAACTGTCA GTACAGCTGTGAAGACACAGAAGAAGGGCCACAGTGCC-3'

(配列番号：1 3)

全長クローンの供給源として幾つかのライブライアリをスクリーニングするために、ライブライアリからのD N A を上で同定したP C R プライマー対によるP C R 増幅によって選別した。次いで、ポジティブライブライアリを、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 3 2 0 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 ライブライアリ作成のためのR N A は、ヒト胎児肺組織 (L I B 0 2 5) から単離した。上記のように単離したクローンのD N A 配列は、D N A 3 2 2 8 4 - 1 3 0 7 の全長配列 [F i g 5、配列番号：9] とP R O 3 2 0 の誘導タンパク質配列を与えた。

D N A 3 2 2 8 4 - 1 3 0 7 の全核酸配列をF i g 5 (配列番号：9) に示す。クローンD N A 3 2 2 8 4 - 1 3 0 7 は、単一のオーブンリーディングフレームを含み、ヌクレオ

10

20

30

40

50

チド位置 135 - 137 に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置 1149 - 1151 に見かけの停止コドンを含む。予測されるポリペプチド前駆体は 338 アミノ酸長である。Fig 6 (配列番号: 10) に示された全長 PRO320 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証明されたが、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 6 に示された全長 PRO320 配列の分析により次のことが証明された: シグナルペプチドはおおよそアミノ酸 1-21 にある。アミド化部位はおおよそアミノ酸 330 - 334、アスパラギン酸とアスパラギンの水酸化部位はおおよそアミノ酸 109 - 121、おおよそアミノ酸 191 - 203、及びおおよそアミノ酸部位 236 - 248、EGF 様ドメインのシステインパターンシグネチャーはおおよそアミノ酸 80 - 91、カルシュウム結合 EGF 様ドメインはおおよそアミノ酸 103 - 125、おおよそアミノ酸 230 - 252、及びおおよそアミノ酸 185 - 207 にある。クローン DNA 32284 - 1307 は 1998 年 3 月 11 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 209670 が付与された。Fig 6 に示されている全長 PRO320 タンパク質は、見積もり分子量がおおよそ 37,143 ダルトン、pI が 8.92 を有する。

【 0 1 6 5 】

実施例5：ヒトPRO219をコードするcDNAの単離

上記実施例 1 に記載したように phrap を使用して、コンセンサス DNA 配列を他の EST 配列に対して構築した。このコンセンサス配列は、ここに DNA28729 と命名される。DNA28729 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 ライブライリを同定するため、及び 2) PRO219 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：

一組の PCR プライマー（正方向と逆方向）が合成された：

正方向 PCR プライマー

5'-GTGACCCCTGGTTGTGAATACTCC-3' (配列番号: 1-6)

逆方向 PCR プライマー

5'-ACAGCCATGGTCTATAGCTTGG-3' (配列番号: 17)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブは、以下の核酸配列を持つ DNA 28729 配列から作成した。

ハイブリダイゼーションプローブ

5'-GCCTGTCAGTGTCTGAGGGACACGTGCTCCGAGCGATGGGAAG-3' (配列番号: 18)

全長クローンの供給源として幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを上で同定したPCRプライマー対によるPCR増幅によって選別した。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマー対の一方を用いてPRO219遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリー作成のためのRNA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ニのDNA配列は、DNA 32290-1164の全長配列 [Fig 7、配列番号：14] と PRO219の誘導タンパク質配列を与えた。

D N A 3 2 2 9 0 - 1 1 6 4 の全核酸配列を F i g 7 (配列番号 : 1 4) に示す。クローリン D N A 3 2 2 9 0 - 1 1 6 4 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 2 0 4 - 2 0 6 に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置 2 9 4 9 - 2 9 5 1 に見かけの停止コドンを含む。予測されるポリペプチド前駆体は 1 0 0 5 アミノ酸長である。F i g 8 (配列番号 : 1 5) に示された全長 P R O 2 1 9 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証明されたが、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。F i g 8 に示された全長 P R O 2 1 9 配列の分析により次のことが証明された : シグナルペプチドはおおよそアミノ酸 1 - 2 3 にある。N - グリコシル化部位はおおよそアミノ酸 2 2 1 - 2 2 5 。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はおおよそアミノ酸 1 1 5 - 1 1 9 、おおよそアミノ酸 6 0 6 - 6 1 0 、及びおおよそアミノ酸 8 9 2 - 8 9 6 である。N - ミリストイル化部位はおおよそアミノ酸 1 3 3 - 1 3 9 、おおよそ 2 5 8 - 2 6 4 、おおよそ 2 7 8 - 2 8 0 である。

よそ299-305、おおよそ340-346、おおよそ453-459、おおよそ494-500、おおよそ639-645、おおよそ690-694、おおよそ752-758、おおよそ792-798である。アミド化部位はおおよそアミノ酸314-318、おおよそ560-564、及びおおよそ601-605である。アスパラギン酸とアスパラギンの水酸化部位はおおよそアミノ酸253-265、おおよそ294-306、おおよそ335-347、おおよそ376-388、おおよそ417-429、おおよそ458-470、おおよそ540-552、及びおおよそ581-593である。クローンDNA32290-1164は1997年10月17日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209384が付与された。Fig 8に示されている全長PRO219タンパク質は、見積もり分子量がおおよそ102,233ダルトン、pIが6.02を有する。

Fig 8(配列番号:15)に示されている全長PRO219の分析は、ある部分がマウス及びヒトマトリシン-2前駆体ポリペプチドと高い相同意を有することを示唆する。

【0166】

実施例6:ヒトPRO221をコードするcDNAの単離

上記実施例1に記載したようにphrapを使用して、コンセンサスDNA配列を他のEST配列に対して構築した。このコンセンサス配列は、ここにDNA28756と命名される。DNA28756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)PRO221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:

一組のPCRプライマー(正方向と逆方向)が合成された:

正方向PCRプライマー

5'-CCATGTGTCTCCTCCTACAAAG-3' (配列番号:21)

逆方向PCRプライマー

5'-GGGAATAGATGTGATCTGATTGG-3' (配列番号:22)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブは、以下の核酸配列を持つDNA28756配列から作成した。

ハイブリダイゼーションプローブ

5'-CACCTGTAGCAATGCAAATCTCAAGGAAATACCTAGAGATCTTCCTCCTG-3'

(配列番号:23)

全長クローンの供給源として幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを上で同定したPCRプライマー対によるPCR増幅によって選別した。次いで、ポジティブプライマーを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマー対の一方を用いてPRO221遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリー作成のためのRNAは、ヒト胎児肺組織から単離した。

上記のように単離したクローンのDNA配列は、DNA33089-1132の全長配列[Fig 9、配列番号:19]とPRO221の誘導タンパク質配列を与えた。

DNA33089-1132の全核酸配列をFig 9(配列番号:19)に示す。クローンDNA33089-1132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179-181に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置956-958に見かけの停止コドンを含む。予測されるポリペプチド前駆体は259アミノ酸長である。Fig 10(配列番号:20)に示された全長PRO221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証明されたが、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に示された全長PRO221配列の分析により次のことが証明された:シグナルペプチドはおおよそアミノ酸1-33にある。膜貫通ドメインはおおよそアミノ酸204-219; N-グリコシル化部位はおおよそアミノ酸47-51、おおよそアミノ酸94-98; cAMP及びcGMP依存性プロテインキナーゼリン酸化部位がおおよそアミノ酸199-203; N-ミリストイル化部位はおおよそアミノ酸37-43、おおよそアミノ酸45-51、おおよそアミノ酸110-116にある。クローンDNA33089-1132は1997年9月16日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209262が付与された。Fig 10

10

20

30

40

50

に示されている全長 P R O 2 2 1 タンパク質は、見積もり分子量がおよそ 2 9 , 2 7 5 ダルトン、p I が 6 . 9 2 を有する。

F i g 1 0 (配列番号 : 2 0) に示されている全長 P R O 2 2 1 の分析は、全長 P R O 2 2 1 が、SLITタンパク質を含むロイシンリッチリピートプロテインスパーファミリーと有意な相同性を有することを示す。

【 0 1 6 7 】

実施例 7 : ヒト P R O 2 2 4 をコードする c D N A の単離

上記実施例 1 に記載したように pharp を使用して、コンセンサス D N A 配列を他の E S T 配列に対して構築した。このコンセンサス配列は、ここに D N A 3 0 8 4 5 と命名される。D N A 3 0 8 4 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 2 4 の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した：

一組の P C R プライマー (正方向と逆方向) が合成された :

正方向 P C R プライマー

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

逆方向 P C R プライマー

5' -TTGGTCCACAGCCGAGCTCGTCG-3' (配列番号 : 2 7)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブは、以下の核酸配列を持つ D N A 3 0 8 4 5 配列から作成した。

ハイブリダイゼーションプローブ

5' -GAGGAGGAGTGCAGGATTGAGCCATGTACCCAGAAAGGGCAATGCCACC-3'

(配列番号 : 2 8)

全長クローンの供給源として幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからの D N A を上で同定した P C R プライマー対による P C R 増幅によって選別した。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及び P C R プライマー対の一方を用いて P R O 2 2 4 遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。c D N A ライブラリー作成のための R N A は、ヒト胎児肝組織から単離した。

上記のように単離したクローンの D N A 配列の決定により、D N A 3 3 2 2 1 - 1 1 3 3 の全長配列 [F i g 1 1 、配列番号 : 2 4] と P R O 2 2 4 の誘導タンパク質配列が得られた。

D N A 3 3 2 2 1 - 1 1 3 3 の全核酸配列を F i g 1 1 (配列番号 : 2 4) に示す。クローン D N A 3 3 2 2 1 - 1 1 3 3 は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 3 3 - 3 5 に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置 8 7 9 - 8 8 1 に見かけの停止コドンを含む。予測されるポリペプチド前駆体は 2 8 2 アミノ酸長である。F i g 1 2 (配列番号 : 2 5) に示された全長 P R O 2 2 4 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証明されたが、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。F i g 1 2 に示された全長 P R O 2 2 4 配列の分析により次のことが証明された : シグナルペプチドはおよそアミノ酸 1 - 3 0 にある。膜貫通ドメインはおよそアミノ酸 2 3 1 - 2 4 8 にある。N - グリコシル化部位はおよそアミノ酸 1 2 6 - 1 3 0 、およそ 1 9 5 - 1 9 9 、およそ 2 1 3 - 2 1 7 にある。N - ミリストイル化部位はおよそアミノ酸 3 - 9 、およそ 1 0 - 1 6 、およそ 2 6 - 3 2 、およそ 3 0 - 3 6 、およそ 1 1 2 - 1 1 8 、およそ 1 6 6 - 1 7 2 、およそ 2 1 2 - 2 1 8 、およそ 2 2 4 - 2 3 0 、およそ 2 3 0 - 2 3 6 、及びおよそ 2 6 3 - 2 6 9 にある。原核生物膜リポタンパク脂質付着部はおよそアミノ酸 4 4 - 5 5 にある。ロイシンジッパーパターンはおよそアミノ酸 1 7 - 3 9 にある。クローン D N A 3 3 2 2 1 - 1 1 3 3 は、1 9 9 7 年 9 月 1 6 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 2 6 3 が付与された。F i g 1 2 に示されている全長 P R O 2 2 4 タンパク質は、見積もり分子量がおよそ 2 8 , 9 9 1 ダルトン、p I が 4 . 6 2 を有する。

F i g 1 2 (配列番号 : 2 5) に示されている全長 P R O 2 2 4 の分析は、全長 P R O 2

10

20

30

40

50

24が低密度リポタンパク質受容体、アポリポタンパク質E受容体、及びニワトリ卵母細胞受容体P95と相同性を有することが示唆する。全長配列のBLAST及びFastA配列アライメント分析に基づくと、PRO224は28%から45%の範囲でこれらのタンパク質の部分とアミノ酸同一性を有し、33%から39%の範囲でこれらのタンパク質と全体的同一性を有している。

【0168】

実施例8：ヒトPRO328をコードするcDNAクローンの単離

上記実施例1に記載したようにphrapを用いて、DNAコンセンサス配列を他のEST配列に対して構築した。このコンセンサス配列を、ここでDNA35615と命名した。このDNA35615コンセンサス配列に基づいて、1)対象とする配列を含むcDNAライブラリをPCRにより同定するため、及び2)PRO328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。

一对の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'-TCCTGCAGTTCCCTGATGC-3'（配列番号：31）

逆方向PCRプライマー

5'-CTCATATTGCACACCACTAATTG-3'（配列番号：32）

また、次のヌクレオチド配列を持つ合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブをコンセンサスDNA35615配列から作成した。

ハイブリダイゼーションプローブ

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

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でのPCR増幅によりスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマーの一方を用いてPRO328遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリーの作成のためのRNA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DNA配列決定により、DNA40587-1231の全長DNA配列[Fig13、（配列番号：29）]及びPRO328の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA40587-1231の全ヌクレオチド配列をFig13（配列番号：29）に示す。クローンDNA40587-1231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15-17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1404-1406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463アミノ酸長である。Fig14（配列番号：30）に示された全長PRO328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証明されたが、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。Fig14に示された全長PRO328配列の分析により次のことが証明された：シグナルペプチドはおよそアミノ酸1-22にある。N-グリコシル化部位はおよそアミノ酸114-118、およそ403-407、およそ409-413にある。グリコサミノグリカン付着部位はおよそアミノ酸439-443である。N-ミリストイル化部位はおよそアミノ酸123-129、およそ143-149、およそ152-158、およそ169-175、およそ180-186、およそ231-237、及びおよそ250-256にある。アミド化部位はおよそアミノ酸82-88、及び172-176である。パーオキシダーゼ近位のヘムリガンドシグネチャーはおよそアミノ酸287-298にある。細胞外タンパク質SCP/Tpx-1/Arg5/PR-1/Sct7シグネチャードメインはおよそアミノ酸127-138、細胞外タンパク質SCP/Tpx-1/Arg5/PR-1/Sct7シグネチャードメインはおよそ160-172にある。クローンDNA40587-1231は、1997年11月7日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209438が付与された。Fig14に示されている全長PRO3

10

20

30

40

50

28タンパク質は、見積もり分子量がおおよそ49,471ダルトン、pIが5.36を有する。

Fig 14(配列番号：30)に示されている全長PRO328の分析は、全長PRO328配列の一部がヒトグリア芽腫、及びシステインリッチ分泌タンパク質と有意な相同性を有することを示唆し、それによりPRO328が新規なグリア芽腫、又はシステインリッチ分泌タンパク質であることを示す。

【0169】

実施例9：ヒトPRO301をコードするcDNAの単離

上記実施例1に記載したようにphrapを使用して、DNAコンセンサス配列を他のEST配列に対して構築した。このコンセンサス配列は、ここにDNA35936と命名される。DNA35936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ライプラリを同定するため、及び2)PRO301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。

上記の手段に用いられたオリゴヌクレオチドは、次に示す。

正方向PCRプライマー1：

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

正方向PCRプライマー2：

5'-ACACCTGGTCAAAGATGGG-3' (配列番号：37)

正方向PCRプライマー3：

5'-TTGCCTTACTCAGGTGCTAC-3' (配列番号：38)

逆方向PCRプライマー1：

5'-TAGGAAGAGTTGCTGAAGGCACGG-3' (配列番号：39)

逆方向PCRプライマー2：

5'-ACTCAGCAGTGGTAGGAAAG-3' (配列番号：40)

ハイブリダイゼーションプローブ1：

5'-TGATCGCGATGGGACAAGGCGCAAGCTCGAGAGGAACTGTTGTGCCT-3'

(配列番号：41)

全長クローンの供給源として幾つかのライプラリをスクリーニングするために、ライプラリからDNAを、上記で同定したPCRプライマー対によるPCR增幅によって選別した。次いで、ポジティブライプラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマー対の一方を用いてPRO301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ライプラリ作成のためのRNA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DNA配列の決定により、DNA40628-1216の全長配列[Fig 15、配列番号：34]とPRO301の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA40628-1216の全核酸配列をFig 15(配列番号：34)に示す。クローンDNA40628-1216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52-54に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置949-951に見かけの停止コドンを含む。予測されるポリペプチド前駆体は299アミノ酸長である。Fig 16(配列番号：35)に示された全長PRO301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証明されたが、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 16に示された全長PRO301配列の分析により次のことが証明された：シグナルペプチドはおおよそアミノ酸1-27にある。膜貫通ドメインはおおよそアミノ酸235-256にある。N-グリコシリ化部位はおおよそアミノ酸185-189、cAMP-とcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位はおおよそアミノ酸270-274にある。N-ミリストイル化部位はおおよそアミノ酸105-111、おおよそ116-122、おおよそ158-164、おおよそ219-225、おおよそ237-243、おおよそ256-262にある。クローンDNA40628-1216は、1997年11月7日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209432が付与された。Fig 16に示されている全長PRO30

10

20

30

40

50

1タンパク質は、見積もり分子量がおよそ32,583ダルトン、pIが8.29を有する。

Fig 16(配列番号：35)に示されている全長PRO301配列のBLAST及びFastA配列アラインメント分析に基づくと、PRO301はA33抗原前駆体(30%)、コクサッキー及びアデノウイルス(29%)とアミノ酸配列同一性を示す。

【0170】

実施例10：ヒトPRO526をコードするcDNAの単離

上記実施例1に記載したようにphrapを使用して、DNAコンセンサス配列を他のEST配列に対して構築した。このコンセンサス配列は、ここにDNA39626.initと命名される。さらに、上記で論じたようにEST配列の供給源を使用し、初期コンセンサス配列を可能な限り伸張するためにBLAST及びプログラム「phrap」の繰り返しサイクルを用いて初期のコンセンサス配列は伸張させられた。構築したコンセンサス配列は、ここで<consen01>と命名された。<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)PRO526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。

一对のPCRプライマー(正と逆方向)が合成された。

正方向PCRプライマー：

5'-TGGCTGCCCTGCAGTACCTCTACC-3' (配列番号：44)

逆方向PCRプライマー：

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

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブが、以下に示すヌクレオチド配列をもつ<consen01>コンセンサス配列が構築された：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-AGGCACTGCCTGATGACACCTTCCGCGACCTGGGCAACCTCACAC-3' (配列番号：46)

全長クローンの供給源とし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、上記で同定したPCRプライマー対によるPCR増幅によって選別した。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマー対の一方を用いてPRO526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ライブラリ作成のためのRNAは、ヒト胎児肝組織(LIB228)から単離した。

上記のように単離したクローンのDNA配列の決定により、DNA44184-1319の全長配列[Fig 17、配列番号：42]とPRO526の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA44184-1319の全核酸配列をFig 17(配列番号：42)に示す。クローンDNA44184-1319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514-516に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置1933-1935に見かけの停止コドンを含む。予測されるポリペプチド前駆体は473アミノ酸長である。Fig 18(配列番号：43)に示された全長PRO526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証明されたが、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 18に示された全長PRO526配列の分析により次のことが証明された：シグナルペプチドはおよそアミノ酸1-26にある。ロイシンジッパーパターンはおよそアミノ酸135-157である。グリコサミノグリカン付着部位はおよそアミノ酸436-440である。N-グリコシリ化部位はおよそアミノ酸82-86、およそ179-183、およそ237-241、およそ372-376、およそ423-427である。フォンウィルブランド因子(VWF)型CDメインは、およそアミノ酸411-427に見られる。クローンDNA44184-1319は、1998年3月26日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209704が付与された。Fig 18に示されている全長PRO526タンパク質は、見積もり分子量がおよそ50,708ダルトン、pIが9.28を有する。

10

20

30

40

50

F i g 1 8 (配列番号：4 3) に示されている全長 P R O 5 2 6 配列の分析は、その一部分が、ALS、SLIT、カルボキシペプチダーゼ、及び血小板グリコプロテインVを含むロイシンリピートプロテインと有意な相同意を有することを示唆し、それにより P R O 5 2 6 がタンパク質 - タンパク質相互作用に関与する新規なタンパク質であることを示す。

【0 1 7 1】

実施例 1 1 : ヒト P R O 3 6 2 をコードする c D N A の単離

上記実施例 1 に記載したように phrap を使用して、D N A コンセンサス配列を他の E S T 配列に対して構築した。このコンセンサス配列は、ここに D N A 4 2 2 5 7 と命名される。D N A 4 2 2 5 7 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 ライブライアリを同定するため、及び 2) P R O 3 6 2 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。

一組の P C R プライマー（正及び逆方向）が合成された：

正方向 P C R プライマー 1 :

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

正方向 P C R プライマー 2 :

5'-GTCGGAAGACATCCCAACAAG-3' (配列番号：5 0)

逆方向 P C R プライマー 1 :

5'-CTTCACAATGTCGCTGTGCTGCTC-3' (配列番号：5 1)

逆方向 P C R プライマー 2 :

5'-AGCCAAATCCAGCAGCTGGCTTAC-3' (配列番号：5 2)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下に示すヌクレオチド配列を有する D N A 4 2 2 5 7 コンセンサス配列から構築した。

ハイブリダイゼーション プローブ :

5'-TGGATGACCGGAGCCACTACACGTGTGAAGTCACCTGGCAGACTCCTGAT-3'

(配列番号：5 3)

全長クローンの供給源として幾つかのライブライアリをスクリーニングするために、ライブライアリからの D N A を、上記で同定した P C R プライマー対による P C R 増幅によって選別した。次いで、ポジティブライブライアリを、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 3 6 2 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 ライブライアリ作成のための R N A は、ヒト胎児脳組織(LIB153)から単離した。

上記に示したようにして単離したクローンの D N A 配列の決定により、D N A 4 5 4 1 6 - 1 2 5 1 の全長配列 [F i g 1 9 、配列番号：4 7] と P R O 3 6 2 の誘導タンパク質配列が得られた。

D N A 4 5 4 1 6 - 1 2 5 1 の全核酸配列を F i g 1 9 (配列番号：4 7) に示す。クローン D N A 4 5 4 1 6 - 1 2 5 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 1 9 - 1 2 1 に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置 1 0 8 2 - 1 0 8 4 に見かけの停止コドンを含む。予測されるポリペプチド前駆体は 3 2 1 アミノ酸長である。F i g 2 0 (配列番号：4 8) に示された全長 P R O 3 6 2 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証明されたが、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。F i g 2 0 に示された全長 P R O 3 6 2 配列の分析により次のことが証明された：シグナルペプチドはおおよそアミノ酸 1 - 1 9 にある。膜貫通ドメインはおおよそアミノ酸 2 8 1 - 3 0 0 にある。グリコサミノグリカンの付着部位はおおよそアミノ酸 1 4 9 - 1 5 3 にある。c A M P - と c G M P - 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位はおおよそアミノ酸 3 0 8 - 3 1 2 にある。N - ミリストイル化部位はおおよそアミノ酸 2 - 8 、おおよそ 1 4 8 - 1 5 4 、おおよそ 1 5 8 - 1 6 4 、おおよそ 2 0 7 - 2 1 3 、おおよそ 2 1 5 - 2 2 1 にある。クローン D N A 4 5 4 1 6 - 1 2 5 1 は、1 9 9 8 年 2 月 5 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 6 0 が付与された。F i g 2 0 に示されている全長 P R O 3 6 2 タンパク質は、見積もり分子量がおおよそ 3 5 , 5 4 4 ダルトン、p I が 8 . 5 1 を有する。

10

20

30

40

50

Fig 20(配列番号：48)に示されている全長PRO362配列の分析は、全長PRO362配列がA33抗原タンパク質とHCArタンパク質と有意な類似性を有することを示唆する。より明確には、Dayhoffデータベース(version 33.45 SwissProt 35)の分析は、PRO362アミノ酸配列と以下のDayhoff配列；AB002341_1、HSU55258_1、HSC7NRCAM_1、RNU81037_1、A33_HUMAN、P_W14158、NMNCAMRI_1、HSTITINN2_1、S71824_1、及びHSU63041_1との間の有意な配列類似性を実証した。

【0172】

実施例12：ヒトPRO356をコードするcDNAの単離

発現された配列タグ(EST)DNAデータベース(LIFESEQ(商品名), Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を検索し、EST(#2939340)はPRO179[実施例10]で同定され、DNA16451-1078と命名された(Fig 1;配列番号：1)と相同性を有すると同定された。PRO356をクローニングするためにClontech Inc.(Palo Alto, CA), カタログ#6528-1から購入したmRNAで調製したヒト胎児肺離ライブリーアが製造者の指示に従って使用された。

ヒトPRO356をコードするcDNAクローナーを単離するために用いたcDNAライブルリーは、例えばInvitrogen、San Diego, CAから商業的に入手可能な試薬を使用した標準的な方法によって作製された。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(pRK B又はpRK D; 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。

上記に示したESTに基づいて、1)PCRにより興味ある配列を含むcDNAライブルリーを同定するため、及び2)PRO356の全長コード化配列のクローナーを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。正方向及び逆方向PCRプライマーは一般に20から30ヌクレオチドの範囲であり、約100-1000bp長のPCR産物を与えるように設計されることが多い。プローブ配列は典型的には40-55bp長である。全長クローナーについて幾つかのライブルリーをスクリーニングするために、ライブルリーからのDNAをAusubel等, Current Protocols in Molecular Biology,のように、PCRプライマー対でのPCR增幅によりスクリーニングした。ポジティブライブルリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いた興味ある遺伝子をコードするクローナーの単離に使用した。

使用されたオリゴヌクレオチドは、次の通りである：

5'-TTCAGCACCAAGGACAAGGACAATGACAATC-3' (配列番号：56)

5'-TGTGCACACTTGTCCAAGCAGTTGTATTGTC-3' (配列番号：57)

5'-GTAGTACACTCCATTGAGGTTGG-3' (配列番号：58)

cDNAクローナーは、同定され、配列が完全に決定した。DNA47470-1130-P1の全ヌクレオチド配列は、Fig 21(配列番号：54)に示されている。クローナーDNA47470-1130-P1は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置215-217に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置1253-1255に見かけの停止コドンを含む(Fig 21、配列番号：54)。予測されるポリペプチド前駆体は346アミノ酸長で、およそ40,018ダルトンの計算上の分子量、及び見積もりpI 8.19を有する。全長PRO356タンパク質は、Fig 22(配列番号：55)に示されている。

Fig 22(配列番号：55)に示された全長PRO356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証明されたが、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 22に示された全長PRO356配列の分析により次のことが証明された：シグナルペプチドはおおよそアミノ酸1-26にある。N-グリコシル化部位はおおよそアミノ酸58-62、おおよそ253-257、及びおおよそ267-271にある。グルコサミノグリカン接着部位はおおよそ16

10

20

30

40

50

7 - 1 7 1 、 c A M P - と c G M P - 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位はおおよそアミノ酸 1 7 6 - 1 8 0 にある。 N - ミリストイル化部位はおおよそアミノ酸 1 6 8 - 1 7 4 、 おおよそ 1 9 6 - 2 0 2 、 おおよそ 2 4 1 - 2 4 7 、 おおよそ 2 5 2 - 2 5 8 、 おおよそ 2 5 6 - 2 6 2 、 おおよそ 3 2 7 - 3 3 3 にある。 細胞接着部位はおおよそアミノ酸配列 1 9 9 - 2 0 2 にある。

クローン D N A 4 7 4 7 0 - 1 1 3 0 - P 1 は、 1 9 9 7 年 1 0 月 2 8 日に A T C C に寄託され、 A T C C 寄託番号 2 0 9 4 2 2 が付与された。 寄託されたクローンは、 ここに示されたものよりも、 実際に正確な配列を有している。

F i g 2 2 (配列番号 : 5 5) に示した全長配列の ALIGN-2 配列アラインメント分析法を用いた Dayhoff データベース (バージョン 35.45 SwissProt 35) の分析は、 P R O 3 5 6 10 アミノ酸配列と T I E - 2 L 1 (3 2 %) 及び T I E - 2 L 2 (3 4 %) の両方との間のアミノ酸配列同一性が示す。 「 T I E 」 という略語は、「チロシンキナーゼ含有 Ig 及び EGF 相同ドメイン (tyrosine kinase containing Ig and EGF homology domains) 」 の頭文字を表し、 レセプターチロシンキナーゼ類の新たなファミリーを指すのに作られた。

【 0 1 7 3 】

実施例 1 3 : ヒト P R O 5 0 9 をコードする c D N A の単離

D N A 5 0 1 4 8 - 1 0 6 8 の c D N A を単離するために、 ヒト網膜 c D N A のバクテリオファージライブラリー (Clontech から市販) を、 T N F R ファミリーに幾分の相同性を示す E S T 配列 (GenBank locus AA021617) に基づく合成オリゴヌクレオチドプローブでハイブリッド形成することによりスクリーニングした。 このスクリーニングで使用されたオリゴヌクレオチドプローブは、 6 0 b p の長さであった。 五つの陽性クローン (1 . 8 - 1 . 9 K b の c D N A 挿入部を含む) が c D N A ライブラリーから得られ、 この五つの陽性クローンは、 上記に示したハイブリダイゼーションプローブを P C R プライマーとして使用した P C R によって対象とするものであると確認された。 各々の陽性クローンを含む単一ファージplaques は、 限界希釀法によって単離され、 D N A は Wizard Lambda Prep DNA 精製キット (Promega から市販) を使用して精製された。

五つのバクテリオファージクローンのうちの三つからの c D N A は、 E c o R I 消化、 ゲル精製によってベクターームから切り出され、 さらに p R K 5 へサブクローニングされて両鎖において配列が決定された。 この三つのクローンは、 同一のオープンリーディングフレームを有していた (例外として、 一つのクローンにイントロンが発見された) 。

D N A 5 0 1 4 8 - 1 0 6 8 の全ヌクレオチド配列は、 F i g 2 3 (配列番号 : 5 9) に示されている。 c D N A は 1 つのオープンリーディングフレームを含み、 それはヌクレオチド位置 8 2 - 8 4 の A T G コドンに割り当てられた開始部位を持つ。 このオープンリーディングフレームは、 ヌクレオチド位置 9 3 1 - 9 3 3 の停止コドン T G A で終端する。

予測される P R O 5 0 9 の全長アミノ酸配列は 2 8 3 アミノ酸長である。 全長 P R O 5 0 9 タンパク質は F i g 2 4 (配列番号 : 6 0) に示され、 見積もり分子量がおよそ 3 0 , 4 2 0 ダルトン、 及びおよそ p I 7 . 3 4 を有する。

F i g 2 4 (配列番号 : 6 0) に示された全長 P R O 5 0 9 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証明されたが、 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。 F i g 2 4 に示された全長 P R O 5 0 9 配列 (F i g 2 4 (配列番号 : 6 0)) の分析により次のことが証明された： シグナルペプチドはおおよそアミノ酸 1 - 3 6 にある。 膜貫通タンパク質はおおよそアミノ酸 2 0 5 - 2 2 1 にある。 N - グリコシル化部位はおおよそアミノ酸 1 1 0 - 1 1 4 、 及びおおよそ 1 7 3 - 1 7 7 にある。 N - ミリストイル化部位はおおよそアミノ酸 8 1 - 8 7 、 おおよそ 8 9 - 9 5 、 おおよそ 1 0 4 - 1 1 0 、 おおよそ 1 2 0 - 1 2 6 、 おおよそ 1 5 3 - 1 5 9 、 おおよそ 1 9 3 - 1 9 9 、 おおよそ 1 9 5 - 2 0 1 、 及びおおよそ 2 2 0 - 2 2 6 にある。 細胞接着部位はおおよそアミノ酸配列 2 3 1 - 2 3 4 にある。

P R O 5 0 9 の 5 8 アミノ酸長の細胞質領域と既知のヒト T N F 受容体ファミリーのメンバーとのアライメント (A L I G N ™ コンピュータープログラムを使用する) は、 いくつかの配列の類似性、 特に C D 4 0 (1 2 の同一性) と L T - ベーター受容体 (1 1 の同一

10

20

20

30

40

50

性)を示した。

【0174】

実施例14：PRO866をコードするcDNAの単離

上記実施例1に記載したようにphrapを使用して、DNAコンセンサス配列を他のEST配列に対して構築した。このコンセンサス配列は、ここにDNA44708と命名される。DNA44708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)PRO866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(正及び逆)は合成された：

正方向PCRプライマー1：

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

10

正方向PCRプライマー2：

5'-CAGGACTCGCTACGTCCG-3' (配列番号：64)

正方向PCRプライマー3：

5'-CAGCCCCTTCTCCTCCTTCTCCC-3' (配列番号：65)

逆方向PCRプライマー1：

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

逆方向PCRプライマー2：

5'-CCAGCGAGAGGCAGATAG-3' (配列番号：67)

逆方向PCRプライマー3：

5'-CGGTCAACCGTGTCTGCAGGATG-3' (配列番号：68)

20

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブは、次のヌクレオチド配列を有するDNA44708から構築された：

ハイブリダイゼーションプローブ：

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

全長クローンの供給源として幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを、上記で同定したPCRプライマー対によるPCR増幅によって選別した。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマー対の一方を用いてPRO866遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリー作成のためのRNAは、ヒト胎児腎臓組織(LIB228)から単離した。

30

上記に示したようにして単離したクローンのDNA配列の決定により、DNA53971-1359の全長配列[Fig 25、配列番号：61]とPRO866の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA53971-1359の全核酸配列をFig 25(配列番号：61)に示す。クローンDNA53971-1359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275-277に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置1268-1270に見かけの停止コドンを含む。予測されるポリペプチド前駆体は331アミノ酸長である。Fig 26(配列番号：62)に示された全長PRO866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証明されたが、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 26に示された全長PRO866配列の分析により次のことが証明された：シグナルペプチドはおおよそアミノ酸1-26にある。グリコサミノグリカン接着部位はおおよそアミノ酸131-135にある。cAMP-とcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位はおおよそアミノ酸144-148にある。N-ミリストイル化部位はおおよそアミノ酸26-32、おおよそ74-80、おおよそ132-138、おおよそ134-140、おおよそ190-196、おおよそ287-293、及びおおよそ290-296にある。クローンDNA53971-1359は、1998年4月7日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号20975が付与された。Fig 26に示されている全長PRO866タンパク質は、見積もり分子量がおおよそ35,844ダルトン、pIが5.45を有する。

40

50

Fig 26(配列番号: 62)に示されている全長PRO866ポリペプチドのアミノ酸配列の分析は、それがミンジン(mindin)/スponジン(spondin)ファミリーと有意な配列類似性を有することを示唆し、それによりPRO866が新規なミンジン相同体となりうることが示されている。より詳細には、Dayhoffデータベース(version 35.45 SwissProt 35)は、PRO866アミノ酸配列と以下のDayhoff配列、AB006085_1, AB006084_1, AB006086_1, AF017267_1, CWU42213_1, AC004160_1, CPMICRP_1, S49108, A48569及びI46687との間の有意な相同性を実証した。

【0175】

実施例15：インサイツハイブリダイゼーション

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。

インサイツハイブリッド形成は、Lu及びGillett, Cell Vision 1: 169-176 (1994)のプロトコールの最適な変形に従って、PCR生成³³P-標識リボプローブを用いて実施される。簡単には、ホルマリン固定、パラフィン包埋ヒト組織を切片化し、脱パラフィンし、プロテイナーゼK(20g/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-P-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 NTB2TM核トラックエマルションに浸漬して4週間露出する。

【0176】

³³P-リボプローブ合成

6.0 μl(125mCi)の³³P-UTP(Amersham BF 1002, SA<2000 Ci/mmol)をスピード真空乾燥させた。乾燥³³P-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(100mM)

2.0 μlのNTP混合物(2.5mM: 10 μl; 10mMのGTP, CTP; ATP+10 μlのH₂O)

1.0 μlのUTP(50 μM)

1.0 μlのRNAsin

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(10mMトリスpH7.6/1mMのEDTA pH8.0)を添加し、混合物をDE81紙にピペットした。残りの溶液をMicrocon-50TM限外濾過ユニットに負荷し、プログラム1.0を用いてスピinn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innさせた(3分間)。最終回収スピinn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6mlのBiofluor IITMで数えた。

プローブをTBE/尿素ゲル上で走らせた。1-3 μlのプローブ又は5 μlのRNAMrk III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。ゲルをプラスチックラップ(SARANTMブランド)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。

【0177】

³³P-ハイブリッド形成

A. 凍結切片の前処理

スライドを冷凍機から取り出し、アルミニウムトレイに配置して室温で5分間解凍した。トレイを55℃のインキュベータに5分間配置して凝結を減らした。スライドを蒸気フード内において4%パラホルムアルデヒド中で5分間固定し、0.5×SSCで5分間室温で洗浄し

10

20

30

40

50

た（25ml 20×SSC + 975ml SQ H₂O）。0.5μg/mlのプロテイナーゼK中、37℃で10分間の脱タンパクの後（250mlの予備加熱RNase無しRNaseバッファー中の10mg/mlストック12.5μl）、切片を0.5×SSCで10分間室温で洗浄した。切片を、70%、95%、10%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、SQ H₂O中に配置し、2×SSCで室温において各々5分間2回リーンスした。切片を20μg/mlのプロテイナーゼK（250mlのRNase無しRNaseバッファー中10mg/mlを500μl；37℃、15分間）-ヒト胚又は8×プロテイナーゼK（250mlのRNaseバッファー中100μl、37℃、30分間）-ホルマリン組織で脱タンパクした。続く0.5×SSCでのリーンス及び脱水は上記のように実施した。

10

C. プレハイブリッド化

スライドをBo×バッファー（4×SSC、50%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50μlのハイブリッド形成バッファー（3.75gデキストラン硫酸+6mlSQ H₂O）で被覆し、ボルテックスし、キャップを外して2分間マイクロ波で加熱した。氷上で冷却した後、18.75mlのホルムアミド、3.75mlの20×SSC及び9mlのSQ H₂Oを添加し、組織を良くボルテックスし、42℃で1-4時間インキュベートした。

【0178】

D. ハイブリッド形成

スライド当たり1.0×10⁶ cpmのプローブ及び1.0μlのtRNA（50mg/mlストック）を95℃で3分間加熱した。スライドを氷上で冷却し、スライド当たり48μlのハイブリッド形成バッファーを添加した。ボルテックスの後、50μlの³³P混合物をスライド上のプレハイブリッド50μlに添加した。スライドを55℃で終夜インキュベートした。

20

E. 洗浄：

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

【0179】

30

F. オリゴヌクレオチド

ここに開示したDNA配列の二つについてインサイツ分析を実施した。これらの分析に対して用いたオリゴヌクレオチドは次の通りである：

(1) DNA 30879 - 1152 (PRO207)

p 1 :

5'-GGATTCTAACGACTCACTATAGGGCTCCTGCGCCTTCCTGAACC-3' (配列番号：70)

p 2 :

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

)

2) DNA 33089 - 1132 (PRO221)

40

p 1 :

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

)

p 2 :

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

)

(3) DNA 33221 - 1133 (PRO224)

p 1 :

5'-GGATTCTAACGACTCACTATAGGGCGAGCGATGGCAGCGATGAGG-3' (配列番号：74)

)

50

p 2 :

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

(4) D N A 4 0 6 2 8 - 1 2 1 6 (P R O 3 0 1)

p 1 :

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

p 2 :

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

(5) D N A 4 5 4 1 6 - 1 2 5 1 (P R O 3 6 2)

p 1 :

5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAAGGCCTCCAAGCCCACAGTGACAA-3' (配列番号 : 78) 10

p 2 :

5'-CTATGAAATTAAACCCCTCACTAAAGGGACCTCCACATTCTGCCAGTA-3' (配列番号 : 79)

【 0 1 8 0 】

G . 結果

ここに開示した上記の 5 の D N A 配列についてインサイト分析を実施した。これらの分析からの結果は次の通りである :

(1) D N A 3 0 8 7 9 - 1 1 5 2 (P R O 2 0 7) (Apo2L Homolog)

軟骨芽細胞腫、及び他の一つの軟部組織の肉腫では、低レベルの発現が観察された。その他のすべての組織では、ネガティブであった。

試験したヒト胎児組織 (E12-E16) 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、臍臓、脳、眼、脊髄、体壁、骨盤及び下肢。 20

試験したヒト成体組織は以下を含む：腎臓（正常及び末期）、副腎、心筋、大動脈、脾臓、リンパ節、胆嚢、臍臓、肺、皮膚、眼（網膜を含む）、胎盤、膀胱、及び肝臓（正常、慢性、急性障害）。

試験した非ヒト靈長類は以下を含む：

チンパンジー組織：唾液腺、胃、甲状腺、副甲状腺、皮膚、胸腺、卵巣、リンパ節
アカゲザル組織：大脳皮質、海馬、小脳、陰茎。

(2) D N A 3 3 0 8 9 - 1 1 3 2 (P R O 2 2 1) (1 T M receptor)

胎児脳白質及び灰白質、並びに脊髄のニューロンにわたって、特異的発現が観察された。 30 プローブはラットと交差反応するように思われる。成体アカゲザルの脳の小脳ニューロンに低レベルの発現。全ての他の組織は陰性。

調べたヒト胎児組織 (E 1 2 - E 1 6 週) は次のものを含む：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、臍臓、脳、眼、脊髄、体壁、骨盤及び下肢。

調べた成体組織：肝臓、腎臓、副腎、心筋層、大動脈、脾臓、リンパ節、臍臓、肺、皮膚、大脳皮質（アカゲザル）、海馬（アカゲザル）、小脳（アカゲザル）、ペニス、眼、膀胱、胃、胃ガン、大腸、大腸ガン及び軟骨肉腫。アセトミノフェン誘導肝臓傷害及び肝硬変。

【 0 1 8 1 】

(3) D N A 3 3 2 2 1 - 1 1 3 3 (P R O 2 2 4) (LDLR homolog - 1 TM) 40

発現は、胎児の脾臓、成体の脾臓、胎児の肝臓、成体の甲状腺及び成体のリンパ節（チンパンジー）の血管内皮に限られていた。発現の付加的部位は発育中の脊髄神経節に見られた。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 (E12-E16) 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、臍臓、脳、眼、脊髄、体壁、骨盤及び下肢。

試験したヒト成体組織は以下を含む：腎臓（正常及び末期）、副腎、心筋、大動脈、脾臓、リンパ節、胆嚢、臍臓、肺、皮膚、眼（網膜を含む）、膀胱、肝臓（正常、慢性、急性障害）。 50

試験した非ヒト靈長類は以下を含む：

チンパンジー組織：唾液腺、胃、甲状腺、副甲状腺、皮膚、胸腺、卵巢、リンパ節

アカゲザル組織：大脳皮質、海馬、小脳、陰茎。

(4) DNA 40628-1216 (PRO301) (CD22 homolog (JAM homolog,

A33 Ag homolog)

炎症性ヒト組織（乾癬、IBD、炎症性腎臓、炎症性肺、肝炎、正常扁桃腺、成人及びチンパンジー多プロック）での発現：

発現は、主に炎症性ヒト組織で、少数の正常ヒト及び非ヒト靈長類組織で評価した。発現は、結腸の粘膜上皮、気管大気道上皮、口腔粘膜（舌）、扁桃陰窩粘膜、胎盤粘膜、前立腺粘膜、腺性胃粘膜、上皮細胞、胸腺ハッサル小体、肝細胞、胆管上皮、及び胎盤上皮を含む評価した各上皮構造で見られた。上皮構造の外側での発現の唯一の証拠は、反応性肥厚を持つ扁桃での濾胞の胚中心における弱くて低い、不整合発現であった。

非ヒト靈長類組織において：

チンパンジー組織：扁桃上皮の表皮に弱い拡散性発現が見られた；ハッサル小体の胸腺上皮に弱い発現が見られた；胃においては、腺性粘膜の上皮において温存な拡散性発現が観察された。

ヒト組織において：肝臓（慢性胆管炎、小葉過形成、アセトアミノフェン毒性を含む多プロック）において、拡散性で低から中程度の発現が肝細胞及び胆管上皮に存在した。発現は小葉周辺／門脈周辺肝細胞において最も優勢であった。慢性硬化性胆管炎を持つ肝臓断片における胆管上皮で最も優勢であった。

表皮の乾癬試料において弱い発現が観察された。

慢性間質性肺炎又は慢性気管支炎を持つ肺において、大気道の粘膜上皮に低い拡散性発現が見られた；肺胞上皮にも弱い拡散性発現が見られた。気管支／細気管支の粘膜下腺の上皮には発現は無かった。

胎盤上皮及び胆嚢の粘膜上皮とともに中程度の拡散性発現が観察された。

前立腺上皮では、低い拡散性発現が見られた。

扁桃粘膜及び陰窩の上皮に高い拡散性発現が観察された；シグナルは扁桃陰窩に並ぶ粘膜細胞で最も高かった。皮質濾胞の胚中心（Bリンパ球領域）において弱い不整合な拡散性発現があった；しかしながら、リンパ構造又はリンパ球性炎症を持つ評価した他の組織では、Bリンパ球での発現のあるものは無かった。

炎症性腸疾患及びポリープ／腺腫性変化を持つ結腸では、粘膜上皮における低い発現が見られ、発現は絨毛先端で最も高かった。ポリープを持つ一検体では、隣接する粘膜に比較した場合、ポリープの形成異常上皮における発現の増加の証拠は無かった。多くの断片に存在する反応性粘膜リンパ組織における明らかな発現は無かった。発現の無い組織は以下を含む：心臓、末梢神経、及び筋肉（心臓、平滑）。

【0182】

(5) DNA 45416-1251 (PRO362) (Ig domain homolog)

炎症性ヒト組織（乾癬、IBD、炎症性腎臓、炎症性肺、肝炎、正常扁桃腺、成人及びチンパンジー多プロック）での発現：

この新規なタンパク質の発現は、種々のヒト及び非ヒト靈長類組織で評価し、高度に制限されていることが見出された。発現は、肺の肺胞マクロファージ及び肝臓洞様毛細血管のクップラー細胞にのみ存在した。これらの細胞での発現は、これら識別可能な細胞集団が活性化されたときに有意に増加した。組織マクロファージのこれら2つの亜集団は異なる器官に局在化し、それらは類似の生物学的機能を有する。これら両方の型の食細胞は、病原、老化細胞及びタンパク質を含む血流又は気道からの物質を除去するフィルターとして作用し、ともに広範で重要なプロ炎症サイトカインを分泌することができる。

炎症性肺（7患者サンプル）では、発現は反応性肺胞マクロファージ細胞集団において顕著であり、肺胞内に1個又は凝集体で存在する大きくて青白く、しばしば空胞を持つ細胞によって定まり、正常で非反応性マクロファージ（正常サイズの単一の散乱細胞）においては弱からネガティブであった。肺胞マクロファージでの発現は、これらの細胞が数及び

10

20

30

40

50

サイズともに増大（活性化）したとき、炎症の間に増加した。これらの組織の間質炎症及び気管支周辺リンパ細胞過形成の領域に組織球が存在するにも関わらず、発現は肺胞マクロファージに制限されていた。多くの炎症性肺も幾分の炎症抑制を有し；発現は神経向性の顆粒球に存在しなかった。

肝臓においては、急性中心小葉性壊死（アセトアミノフェン毒性）又はかなり顕著な門脈周囲の炎症を持つ肝臓において反応性／活性化カップファー細胞に強い発現があった。しかしながら、正常肝臓又は穏和から中程度の小葉過形成／肥大のみを持つ肝臓におけるカップファー細胞では発現が無かった。即ち、肺と同様に、活性化／反応性細胞において発現の増加があった。

炎症性腸疾患、過形成／反応性扁桃又は正常リンパ節に存在する組織球／マクロファージにおいて、この分子の発現は無かった。全てが組織球炎症又は常在性マクロファージ集団を含むこれらの組織で発現が無いことは、肺胞マクロファージ及び肝臓カップファー細胞として定義される独特のマクロファージサブセット集団に制限された発現を強く支持する。脾臓又は骨髄は、評価できなかった。

検出可能な発現を示さなかった評価したヒト組織は以下を含む：炎症性腸疾患（中程度から重症の7患者サンプル）、反応性過形成を持つ扁桃、末梢リンパ節、乾癬皮膚（穏和から中程度の疾患を持つ2患者サンプル）、心臓、末梢神経。

検出可能な発現を示さなかった評価したチンパンジー組織は以下を含む：舌、胃、胸腺。

【0183】

実施例16：ハイブリダイゼーションプローブとしてのPRO179、PRO207、P 20 PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866の使用
以下の方法は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866をコードする核酸配列のハイブリダイゼーションプローブとしての使用を記載する。

PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO356、PRO509、又はPRO866のコード配列（各々Fig 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、及び25、各々配列番号：1、6、9、14、19、24、29、34、42、47、54、59、及び61に示す）を含むDNA，又はその断片は、ヒト組織cDNAライブラリー又はヒト組織ゲノムライブラリーにおける同種DNA（PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866の自然発生変異体など）のスクリーニングのためのプローブとして用いられる。

いずれかのライブラリーDNAを含むフィルターのハイブリダイゼーション及び洗浄は、以下の高い緊縮条件で実施した。PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドをコードする遺伝子由来の放射標識プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションは、50%ホルムアルデヒド、5×SSC、0.1%SDS、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリシン酸ナトリウム、pH 6.8、2×デンhardt溶液、及び10%デキストラン硫酸の溶液中で、42°Cにおいて20時間行った。フィルターの洗浄は、0.1×SSC及び0.1%SDSの水溶液中、42°Cで行った。

次いで、全長天然配列をコードするDNAと所望の配列同一性を有するDNAは、この分野で知られた標準的な方法を用いて同定できる。

【0184】

実施例17：大腸菌におけるPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO3 50

62、PRO356、PRO509、又はPRO866 PROの発現

この実施例は、大腸菌における組み換え発現による所望のPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866の非グリコシル化形態の調製を例示する。

PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866をコードするDNA配列は、選択されたPCRプライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位を持たなければならない。種々の発現ベクターが用いられる。好適なベクターの例は、pBR322(大腸菌由来のもの; Bolivar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、poly-Hisリーダー(最初の6つのSTIICodon、poly-His配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む)、特定のPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866コードする領域、ラムダ転写ターミネーター、及びargU遺伝子を含む。

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

選択されたクローンは、抗生物質を添加したLBプロスなどの液体培地で終夜成長させることができる。終夜培地は、続いて大規模培地の播種に用いられる。次に細胞を最適光学密度まで成長させ、その間に発現プロモーターが作動する。

更に数時間の培養の後、遠心分離による集菌が可能である。遠心分離で得られた細胞ペレットは、この分野で知られた種々の試薬を用いて可溶化され、次いで可溶化PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866タンパク質を、タンパク質が堅く結合する条件下で金属キレートカラムを用いて精製した。

【0185】

以下の手法を用いて、poly-His(ポリ-ヒスチジン)タグ形態でPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866を大腸菌で発現させてよい。PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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、poly-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 rpoHts(htpRts) clpP(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CRAAP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

10

20

30

40

50

取り出して SDS-PAGE により発現を確認し、バルク培地を遠心分離して細胞のペレットとした。細胞ペレットを精製及び再折りたたみまで凍結させた。

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ニ酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々0.1M及び0.02Mとし、溶液を4で終夜攪拌した。この工程により、すべてのシステイン残基が亜硫酸によりブロックされた変性タンパク質がもたらされた。溶液をBeckman Ultracentrifuge中で40,000rpmで30分間濃縮した。上清を金属キレートカラムバッファー(6Mのグアニジン、20mMのトリス、pH7.4)の3-5容量で希釈し、0.22ミクロンフィルターを通して濾過して透明化した。透明化抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた5mlのQiagen Ni²⁺-NTA金属キレートカラムに負荷した。カラムを50mMのイミダゾール(Calbiochem, Utrol grade)を含む添加バッファー、pH7.4で洗浄した。タンパク質を250mMのイミダゾールを含有するバッファーで溶離した。所望のタンパク質を含有する画分をプールし、4で保存した。タンパク質濃度は、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて280nmにおけるその吸収により見積もった。

試料を、20mMのトリス、pH8.6、0.3MのNaCl、2.5Mの尿素、5mMのシステイン、20mMのグリシン及び1mMのEDTAからなる新たに調製した再生バッファー中に徐々に希釈することによりタンパク質を再生させた。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が50~100マイクログラム/mlとなるように選択した。リフォールディング溶液を4で12-36時間ゆっくり攪拌した。リフォールディング反応はTFAを採取濃度0.4%(約3のpH)で添加することにより停止させた。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を0.22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。再生したタンパク質を、Poros R1/H逆相カラムで、0.1%TFAの移動バッファーと10~80%のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかけた。A₂₈₀吸収を持つ画分のアリコートをSDSポリアクリラミドゲルで分析し、相同な再生タンパク質を含有する画分をプールした。一般的に、殆どの正しく再生したタンパク質種は、これらの種が最もコンパクトであり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。誤って再生したタンパク質を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。

所望の再生したPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドを含有する画分をプールし、溶液に向かた窒素の弱い気流を用いてアセトニトリルを除去した。タンパク質を、透析又は調製バッファーで平衡化したG25 Superfine(Pharmacia)樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、0.14Mの塩化ナトリウム及び4%のマンニトールを含む20mMのHepes、pH6.8に調製した。

PRO207、PRO224、及びPRO301ポリペプチドが、上記の方法によってpoly-Hisタグ型で大腸菌で成功裏に発現された。

【0186】

実施例18：哺乳動物細胞におけるPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの発現
この実施例は、哺乳動物細胞における組み換え発現によるPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドのグリコシル化形態の調製を例示する。

発現ベクターとしてpRK5(1989年3月15日発行のEP 307,247参照)を用いた。場合によつては、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド

10

20

30

40

50

6、PRO509、又はPRO866DNAを、これらのDNAをpRK5へ挿入させることのできる選択した制限酵素とSambrook等、上掲に記載されたようなライゲーション方法を用いて、pRK5へ挿入させる。得られたベクターは、各々pRK5-PRO179、pKR5-PRO207、pKR5-PRO320、pKR5-PRO219、pKR5-PRO221、pKR5-PRO224、pKR5-PRO328、pKR5-PRO301、pKR5-PRO526、pKR5-PRO362、pKR5-PRO356、pKR5-PRO509、又はpKR5-PRO866ポリペプチドと呼ばれる。

一実施態様では、選択された宿主細胞は293細胞とすることができます。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)は、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び/又は抗生物質を添加したD MEM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10¹⁰ μgのpRK5-PRO179、pRK5-PRO207、pRK5-PRO320、pRK5-PRO219、pRK5-PRO221、pRK5-PRO224、pRK5-PRO328、pRK5-PRO301、pRK5-PRO526、pRK5-PRO362、pRK5-PRO356、pRK5-PRO509、又はpRK5-PRO866DNAを約1μgのV A RNA遺伝子コード化DNA[Thimmappaya等、Cell, 31:543 (1982)]と混合し、500μlの1mMトリス-HCl、0.1mMEDTA、0.227mMCaCl₂に溶解させた。この混合物に、滴状の、500μlの50mMHEPES(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200μCi/ml³⁵S-システイン及び200μCi/ml³⁵S-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、スピンドル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、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの存在を現すとして選択された時間にわたってフィルムにさらした。形質転換した細胞を含む培地は、更なるインキュベーションを施し(無血清培地で)、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

これに換わる技術において、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866は、Sompanyrac等、Proc. Natl. Acad. Sci., 78:7575 (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、700μgのpRK5-PRO179、pKR5-PRO207、pKR5-PRO320、pKR5-PRO219、pKR5-221、pKR5-PRO224、pKR5-PRO328、pKR5-PRO301、pKR5-PRO526、pKR5-PRO362、pKR5-PRO356、pKR5-PRO509、又はpKR5-PRO866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、5μg/mlウシインシュリン及び0.1μg/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866を含む試料を濃縮し、透析及び/又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製した。

他の実施態様では、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO509、又はPRO866を含む試料を濃縮し、透析及び/又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製した。

10

20

30

40

50

R O 3 5 6、P R O 5 0 9、又はP R O 8 6 6をC H O細胞で発現させることができる。p R K 5 - P R O 1 7 9、p R K 5 - P R O 2 0 7、p R K 5 - P R O 3 2 0、p R K 5 - P R O 2 1 9、p R K 5 - P R O 2 2 1、p R K 5 - P R O 2 2 4、p R K 5 - P R O 3 2 8、p R K 5 - P R O 3 0 1、p R K 5 - P R O 5 2 6、p R K 5 - P R O 3 6 2、p R K 5 - P R O 3 5 6、p R K 5 - P R O 5 0 9、又はp R K 5 - P R O 8 6 6は、C a P O₄又はD E A E - デキストランなどの公知の試薬を用いてC H O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。P R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、又はP R O 8 6 6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P R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、又はP R O 8 6 6ペプチドを含む培地を濃縮して、選択した方法にとって精製することができる。

また、エピトープタグP R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、又はP R O 8 6 6は、宿主C H O細胞において発現させてもよい。P R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、又はP R O 8 6 6は、p R K 5ベクターからサブクローニングした。サブクローニング挿入物は、次いで、P C Rを施してバキュロウイルス発現ベクター中のpoly-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。poly-HisタグP R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、又はP R O 8 6 6挿入物は、次いで、安定なクローニングの選択のためのD H F R等の選択マークを含むS V 4 0誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、C H O細胞をS V 4 0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poly-HisタグP R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、又はP R O 8 6 6を含む培養培地は、次いで濃縮し、N i²⁺-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により精製できる。

またP R O 1 7 9、P R O 2 0 7、P R O 3 2 0、P R O 2 1 9、P R O 2 2 1、P R O 2 2 4、P R O 3 2 8、P R O 3 0 1、P R O 5 2 6、P R O 3 6 2、P R O 3 5 6、P R O 5 0 9、又はP R O 8 6 6は、一過性発現法によりC H O及び/又はC O S細胞で、他の安定な発現方法によりC H O細胞で発現させてもよい。

【 0 1 8 7 】

C H O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poly-Hisタグ形態のコード化配列（例えば、細胞外ドメイン）がI g G 1のヒンジ、C H 2及びC H 2ドメインを含む定常領域配列に融合したI g G作成物（イムノアドヘシン）、又はpoly-Hisタグ形態として発現された。P C R增幅に続いて、対応するD N Aを、Ausubel等、Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.1, John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いてC H O発現ベクターにサブクローニングした。C H O発現ベクターは、対象とするD N Aの5'及び3'に適合する制限部位を有し、c D N Aの便利なシャトル化ができるよう作成される。ベクターは、Lucas等、Nucl. Acids Res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようにC H O細胞での発現を用い、対象とするc D N A及びジヒドロフォレートレダクターゼ(D H F R)の発現の制御にS V 4 0初期プロモーター/エンハンサーを用

10

20

30

40

50

いる。D H F R 発現は、形質移入に続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

所望のプラスミドDNAの12マイクログラムを、市販の形質移入試薬Superfect(登録商標)(Quiagen), Dsper(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。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(0.2μm濾過PS20、5%の0.2μm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
10-2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日に発行された米国特許第5,122,469号に記載された生産培地を使用した。3Lの生産スピナーを 1.2×10^6 細胞/mlで播種した。0
日目に、細胞数とpHを測定した。1日目に、スピナーをサンプルし、濾過空気での散布を実施した。2日目に、スピナーをサンプルし、温度を33℃に変え、500g/lのグルコース及び0.6mlの10%消泡剤(例えば35%ポリジメチルシリコサンエマルション、Dow Corning 3
65 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0.22μm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。
20

【0188】

poly-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%のマン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℃
30で貯蔵した。

イムノアドヘシン(Fc含有)作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、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のケエン酸、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poly-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。

ここに開示したPRO179、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO356、PRO509、及びPRO866ポリペプチドは、上記の方法によってCHO細胞で安定して発現された。さらには、PRO224、PRO328、PRO301、そしてPRO356は、CHO細胞で一時的な発現方法によって発現された。
40

【0189】

実施例19：酵母菌でのPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866の発現
以下の方法は、酵母菌中のPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO3
50

62、PRO356、PRO509、又はPRO866の組換え発現を記載する。

第1に、ADH2/GAPDHプロモーターからのPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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。PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866の細胞内発現を指示する。分泌のために、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866をコードするDNAを選択したプラスミドに、ADH2/GAPDHプロモーターをコードするDNA、天然PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866シグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌アルファ因子分泌シグナル／リーダー配列、及び（必要ならば）PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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。
10
20
20

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。

組み換えPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドは、実質上、遠心分離による酵母細胞の発酵液からの分離、そして選択されたカートリッジフィルターによる培養液の濃縮によって単離及び精製される。PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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使用することによってさらに精製される。
30

【0190】

実施例20：バキュロウイルス感染昆虫細胞でのPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中におけるPROの組換え発現を示す。

PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866コードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。このようなエピトープタグは、poly-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、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866コード化配列の所定部分、例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列などが、5'及び3'領域に相補的なプライマーでのP C
40
50

Rにより増幅される。5'プライマーは、隣接する(選択された)制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、次いで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

【0191】

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold(商品名)ウイルスDNA(Pharmingen)を、*Spodoptera frugiperda*(「Sf9」)細胞(ATCC CRL 1711)中にリポフェクチン(GIBCO-BRLから市販)を用いて同時形質移入することにより作成される。
28
で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いた。
ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilly等, *Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように
10
実施した。

次に、発現されたpoly-HisタグPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866は、例えばNi²⁺-キレートアフィニティクロマトグラフィーにより次のように精製される。抽出は、Rupert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(25mIのHepes、pH7.9; 12.5mMのMgCl₂; 0.1mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1%のNP-40; 0.4MのKCl)中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を負荷バッファー(50mMリン酸塩、300mMのNaCl、10%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5mIの総容積で調製し、25mIの水で洗浄し、25mI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0.5mI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リン酸塩; 300mMのNaCl、10%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500mIイミダゾール勾配で展開した。1mI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でのウェスタンプロットで分析した。溶離したHis₁₀-タグPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866を含む画分をプールして負荷バッファーで透析した。
20
30

あるいは、IgGタグ(又はFcタグ)PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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。

【0192】

PCR増幅に続いて、各コード化配列をバキュロウイルス発現ベクター(IgG融合のためのpb.PH.IgG及びpoly-Hisタグタンパク質のためのpb.PH.His.c)中にサブクローニングし、ベクターとBaculogold(商品名)バキュロウイルスDNA(Pharmingen)を105の*Spodoptera frugiperda*(「Sf9」)細胞(ATCC CRL 1711)中にリポフェクチン(Gibco-BRL)を用いて同時形質移入した。pb.PH.IgG及びpb.PH.Hisは商業的に利用できるバキュロウイルス発現ベクターpVL1393(Pharmingen)の変異体で、His又はFcタグ配列を含む修飾ポリリンカーネオヌクリオチド領域を持つ。10%FBSを補填したHinkのTNM-FH培地(Hyclone)で細胞を増殖させた。細胞を28度5日間インキュベートした。上清を収集し、続いて10%FBSを補填したHinkのTNM-FH培地中のSf9細胞を10のおよその感染効率(MOI)で感染させることにより最初のウイルス増幅に使用した。細胞を28度3日間インキュベートした。上清を収集し、バキュロウイルス発現ベクター中における作成物の発現を、ヒスチジンタ
40
50

グタンパク質に対して25mIのNi²⁺-NTAビード (QIAGEN) へ、又はIgGタグタンパク質に対してプロテイン-AセファロースCL-4Bビード (Pharmacia) へ1mIの上清をバッチ結合させ、続いてSDS-PAGE分析を行って、クーマシープルーカー染色により既知の濃度のタンパク質標準と比較することにより決定した。

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

【0193】

形質移入細胞からの条件培地 (0.5から3L) を遠心分離により収集して細胞を除去し、0.2 10
2ミクロンフィルターで濾過した。poly-Hisタグ作成物に対しては、Ni²⁺-NTAカラム (Qiagen) を使用してタンパク質作成物を精製した。精製前に、5mMの濃度まで条件培地にイミダゾールを添加した。条件培地を、4度4-5mI/minの流量で20mM Hepes、pH7.4、0.3MのNaClと5mMのイミダゾールを含むバッファーで平衡化した6mIのNi²⁺-NTAカラムに汲み上げた。充填後、カラムを更なる平衡化バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mのイミダゾールを含む平衡化バッファーで溶出させた。高度に精製されたタンパク質は続いて25mIのG25 Superfine (Pharmacia) カラムで10mM Hepes、0.14MのNaCl及び4%のマンニトール、pH6.8を含む貯蔵バッファー中に脱塩し、-80度貯蔵した。

タンパク質のイムノアドヘシン (Fc含有) 作成物を次のようにして条件培地から精製した。20mMのリン酸ナトリウムバッファー、pH6.8で平衡化された5mIのプロテインAカラム (Pharmacia) に条件培地を汲み上げた。充填後、100mMのクエン酸、pH3.5での溶出前にカラムを平衡化バッファーで十分に平衡化した。溶出したタンパク質を、275mLの1M Trisバッファー、pH9を含むチューブ中に1mIのフラクションを収集することにより即座に中和させた。高度に精製したタンパク質を上述のようにpoly-Hisタグタンパク質の貯蔵バッファー中に脱塩した。タンパク質の一様性はSDSポリアクリルアミドゲル (PEG) 電気泳動法とエドマン分解によるN末端アミノ酸配列決定により証明した。

PRO301、PRO362、PRO356、PRO509、及びPRO866がバキュウロウイルス感染Sf9昆虫細胞で発現した。

【0194】

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、poly-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、pIE1-1 (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。pIE1-1及びpIE1-2ベクターは、安定に形質転換された昆虫細胞 (1) におけるバキュロウイルスie1プロモーターからの組換えタンパク質の構成的発現のために設計される。このプラスミドは複数のクローニング部位の方向においてのみ相違し、未感染昆虫細胞におけるie1媒介遺伝子発現に重要であることが知られた全てのプロモーター配列並びにhr5エンハンサー成分を含む。pIE1-1及びpIE1-2は翻訳開始部位を含み、融合タンパク質の製造に使用できる。簡単には、PROポリペプチドの所望の部分 (膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列など) を、5'及び3'領域に相補的なプライマーでのPCRにより増幅する。5'プライマーは隣接する (選択された) 制限酵素部位を導入してもよい。生成物は、次いで、選択された制限酵素で消化して発現ベクターにサブクローニングされる。例えば、pIE1-1の誘導体はヒトIgG (p b . PH . IgG) のFc領域又はの8ヒスチジン (p b . PH . His) タグ下流 (3'-) を含むことができる。好ましくは、確認のために、構築ベクターの配列の確認する。

【0195】

High-5細胞は、27°C、CO₂無し、ペン/ストレプト無しの条件下で50%の集密度まで成長させた。150mmプレート各々について、30μgのPROポリペプチドを含むpIEベ

10

20

30

40

50

スペクターを1mlのE_x-細胞培地（媒質：Ex-細胞401+1/100のL-G 1 u JRH Bioscience s #14401-78P（注：この媒質は軽感受性））と混合し、別の管において、100μlのセルフェクチン（CellFECTIN(Gibco BRL #10362-010)（ボルテックスで混合））を1mlのE_x-細胞培地と混合した。2つの溶液を混合し、室温で15分間インキュベーションした。8mlのE_x-細胞培地を2mlのDNA / セルフェクチン混合物に添加し、E_x-細胞培地で1回洗浄したhigh-5細胞上に層形成させた。次いでプレートを暗中室温でインキュベートした。次いでDNA / セルフェクチン混合物を吸引し、細胞をE_x-細胞で1回戦乗して過剰のセルフェクチンを除去した。30mlの新鮮なE_x-細胞培地を添加し、細胞を28で3日間インキュベートした。上清を回収して、バキュロウイルス感染ベクターでのPROポリペプチドの発現を、1mlの上清の25mLのヒスチジン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。

形質移入細胞からの条件培地（0.5~3L）を、遠心分離により細胞を除去し0.22ミクロンフィルターを通して濾過することにより回収した。ポリ-Hisタグ作成物については、タンパク質作成物をNi²⁺-NTAカラム（Qiagen）を用いて精製した。精製前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのNaCl及び5mMイミダゾールを含む20mMのHepes、pH7.4バッファーで平衡化した6mlのNi²⁺-NTAカラムに4-5ml/分の流速で48においてポンプ供給した。負荷後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのHepes、0.14MのNaCl及び4%のマン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。

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poly-Hisタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。PROポリペプチドの均一性はSDSポリアクリルアミドゲル及びエドマン（Edman）分解によるN-末端アミノ酸配列決定及び所望又は必要に応じて他の分析手法により評価できる。PRO179, PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866は、上記のhigh-5細胞を用いたバキュロウイルスの方法によって発現された。

【0196】

実施例21：PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866に結合する抗体の調製

この実施例は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866に特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

モノクローナル抗体の生産のための技術は、この分野で知られており、例えば、上掲のGoldingに記載されている。用いられ得る免疫原は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866を含有する精製PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866融合タンパク質、及び細胞表面に組換えPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、

PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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成すことが可能である。

【0197】

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PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866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-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866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。

適当な抗体力値が検出された後、抗体に「ポジティブ(陽性)」な動物はPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866の最終静脈内注射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、脾臓細胞を取り出した。次いで脾臓細胞を(35%ポリエチレンギリコールを用いて)、ATCCから番号CRL1597で入手可能なP3X63AgU.1等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、HAT(ヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチミジン)培地を含む96ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

ハイブリドーマ細胞は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866に対する反応性についてのELISAでスクリーニングされる。PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ(陽性)」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

陽性ハイブリドーマ細胞を同系のBalb/cマウスに腹腔内注入し、抗-PRO179、抗-PRO207、抗-PRO320、抗-PRO219、抗-PRO221、抗-PRO224、抗-PRO328、抗-PRO301、抗-PRO526、抗-PRO362、抗-PRO356、抗-PRO509、又は抗-PRO866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。

【0198】

実施例22：特異的抗体を用いたPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866のポリペプチドの精製
天然又は組換えPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドは、この分野の種々の標準的なタ

10

20

30

40

50

ンパク質精製方法によって精製できる。例えば、pro - PRO179、pro - PRO207、pro - PRO320、pro - PRO219、pro - PRO221、pro - PRO224、pro - PRO328、pro - PRO301、pro - PRO526、pro - PRO362、pro - PRO356、pro - PRO509、又はpro - PRO866ポリペプチド、成熟PRO179、成熟PRO207、成熟PRO320、成熟PRO219、成熟PRO221、成熟PRO224、成熟PRO328、成熟PRO301、成熟PRO526、成熟PRO362、成熟PRO356、成熟PRO509、又是pro - PRO866ポリペプチド、或いはpre - PRO179、pre - PRO207、pre - PRO320、pre - PRO219、pre - PRO221、pre - PRO224、pre - PRO328、pre - PRO301、pre - PRO526、pre - PRO362、pre - PRO356、pre - PRO509、又是pre - PRO866ポリペプチドは、対象とするPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又是PRO866ポリペプチドに特異的な抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一般に、免疫親和性カラムは抗 - PRO179、抗 - PRO207、抗 - PRO320、抗 - PRO219、抗 - PRO221、抗 - PRO224、抗 - PRO328、抗 - PRO301、抗 - PRO526、抗 - PRO362、抗 - PRO356、抗 - PRO509、又是抗 - PRO866ポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合させて作成される。

【0199】

20

ポリクローナル免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムでの沈殿又は固定化プロテインA (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.) での精製のいずれかにより免疫血清から調製される。同様に、モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿又は固定化プロテインAでのクロマトグラフィーによりマウス腹水液から調製される。部分的に精製された免疫グロブリンは、CnBr-活性化セファロース^{T M} (Pharmacia LKB Biotechnology) 等のクロマトグラフィー樹脂に共有結合される。抗体が樹脂に結合され、樹脂がブロッケされ、誘導体樹脂は製造者の指示に従って洗浄される。

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態のPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドを含有する細胞からの画分を調製することによるPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの精製において利用される。この調製物は、洗浄剤の添加又はこの分野で公知の方法により微分遠心分離を介して得られる全細胞又は細胞成分画分の可溶化により誘導される。あるいは、シグナル配列を含む可溶性PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドは、細胞が成長する培地中に有効な量で分泌される。

【0200】

40

可溶化PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド含有調製物は、免疫親和性カラムを通して、カラムはPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドの好ましい吸着をさせる条件下(例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー)で洗浄される。次いで、カラムは、抗体 / PRO179、抗体 / PRO207、抗体 / PRO320、抗体 / PRO219、抗体 / PRO221、抗体 / PRO224、抗体 / PRO328、抗体 / PRO301、抗体 / PRO526、抗体 / PRO362、抗体 / PRO356、抗体 / PRO509、又は抗

50

体 / PRO 866 ポリペプチド結合を分解する条件下（例えば、約2-3といった低pH、高濃度の尿素又はチオシアノ酸イオン等のカオトロープ）で溶離され、PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチドが回収される。

【0201】

実施例23：薬剤スクリーニング

本発明は、PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 又はその結合断片を種々の薬剤スクリーニング技術において使用することによる化合物のスクリーニングに特に有用である。そのような刺威力いられるPRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド又は断片は、溶液中の自由状態でも、固体支持体に固定されても、細胞表面に位置しても、細胞内に局在化していてもよい。薬剤スクリーニングの1つの方法は、PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド又は断片を発現する組換え核酸で安定に形質移入される真核生物又は原核生物宿主細胞を利用する。薬剤は、そのような形質移入細胞に対して、競合的結合アッセイにおいてスクリーニングされる。そのような細胞は、生存可能又は固定化形態のいずれかにおいて、標準的な結合アッセイに使用できる。例えば、PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド又は断片と試験される試薬の間での複合体形成を測定してよい。あるいは、試験する試薬によって生ずるPRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチドとその標的細胞との間の複合体形成における減少を試験する事もできる。

即ち本発明は、PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド関連疾患又は障害に影響を与える薬剤又は任意の他の試薬のスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、その試薬をPRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド又は断片に接触させ、(i)試薬とPRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド又は断片との間の複合体の存在について、又は(ii)PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド又は断片と細胞との間の複合体の存在について検定することを含む。これらの競合結合アッセイでは、PRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチド又は断片が典型的には標識される。適切なインキュベーションの後、フリーのPRO ポリペプチド又は断片を結合形態のものから分離し、フリー又は未複合の標識の量が、特定の試薬がPRO 179、PRO 207、PRO 320、PRO 219、PRO 221、PRO 224、PRO 328、PRO 301、PRO 526、PRO 362、PRO 356、PRO 509、又はPRO 866 ポリペプチドに結合する、又はPRO 179、PRO 207、

20

20

30

40

50

PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド/細胞複合体を阻害する能力の尺度となる。

【0202】

薬剤スクリーニングのための他の技術は、ポリペプチドに対して適当な結合親和性を持つ化合物についての高スループットスクリーニングを提供し、1984年9月13日に発行されたW084/03564に詳細に記載されている。簡単に述べれば、多数の異なる小型ペプチド試験化合物が、プラスチックピン等の固体支持体又は幾つかの他の表面上で合成される。PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドに適用すると、ペプチド試験化合物はPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドと反応して洗浄される。結合したPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドはこの分野で良く知られた方法により検出される。精製したPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドは、上記の薬剤スクリーニング技術に使用するためにプレート上に直接被覆することもできる。さらに、非中和抗体は、ペプチドを捕捉し、それを固体支持体上に固定化するのに使用できる。
20

また、本発明は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドに結合可能な中和抗体が、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド又はその断片について試験化合物と特異的に競合する競合薬剤スクリーニングアッセイも考慮する。この方法において、抗体は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドで、一又は複数の抗原決定基を持つ任意のペプチドの存在を検出するのに使用できる。
30

【0203】

実施例24：合理的薬剤設計

合理的薬剤設計の目的は、対象とする生物学的活性ポリペプチド（例えば、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド）又はそれらが相互作用する小分子、例えばアゴニスト、アンタゴニスト、又はインヒビターの構造的類似物を製造することである。これらの例は、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドのより活性で安定な形態又はインビボでPRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチドに機能を促進又は阻害する薬剤の創作に使用できる（参考、Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991)）。

1つの方法において、PRO179、PRO207、PRO320、PRO219、PRO221、PRO224、PRO328、PRO301、PRO526、PRO362、PRO356、PRO509、又はPRO866ポリペプチド、又はPRO179、PRO50

O 2 0 7、 P R O 3 2 0、 P R O 2 1 9、 P R O 2 2 1、 P R O 2 2 4、 P R O 3 2 8、 P R O 3 0 1、 P R O 5 2 6、 P R O 3 6 2、 P R O 3 5 6、 P R O 5 0 9、 又は P R O 8 6 6 -インヒビター複合体の三次元構造が、 X線結晶学により、 コンピュータモデル化により、 最も典型的には 2 つの方法の組み合わせにより決定する。分子の構造を解明し活性部位を決定するためには、 P R O 1 7 9、 P R O 2 0 7、 P R O 3 2 0、 P R O 2 1 9、 P R O 2 2 1、 P R O 2 2 4、 P R O 3 2 8、 P R O 3 0 1、 P R O 5 2 6、 P R O 3 6 2、 P R O 3 5 6、 P R O 5 0 9、 又は P R O 8 6 6 ポリペプチドの形状及び電荷の両方が確認されなければならない。数は少ないが、 P R O 1 7 9、 P R O 2 0 7、 P R O 3 2 0、 P R O 2 1 9、 P R O 2 2 1、 P R O 2 2 4、 P R O 3 2 8、 P R O 3 0 1、 P R O 5 2 6、 P R O 3 6 2、 P R O 3 5 6、 P R O 5 0 9、 又は P R O 8 6 6 ポリペプチドの構造に関する有用な情報が相同タンパク質の構造に基づいたモデル化によって得られることがある。両方の場合において、 関連する構造情報は、 類似 P R O ポリペプチド様分子の設計又は行こうなインヒビターの同定に使用される。合理的な薬剤設計の有用な例は、 Braxton及びWells, Biochemistry, 31: 7796-7801 (1992)に示されているような向上した活性又は安定性を持つ分子、 又は Athauda等, J. Biochem., 113: 742-746 (1993)に示されているような天然ペプチドのインヒビター、 アゴニスト、 又はアンタゴニストとして作用する分子を含む。
10

【 0 2 0 4 】

また、 上記のような機能アッセイによって選択された標的特異的な抗体を単離しその決せよう構造を解明することもできる。この方法は、 原理的には、 それに続く薬剤設計が基礎をおくことのできるファーマコア(pharmacore)を生成する。機能的な薬理学的に活性な抗体に対する抗-イディオタイプ抗体(抗-ids)を生成することにより、 タンパク質結晶学をバイパスすることができる。鏡像の鏡像として、 抗-idsの結合部位は最初のレセプターの類似物であると予測できる。抗-idsは、 次いで、 化学的又は生物学的に製造したペプチドのバンクからペプチドを同定及び単離するのに使用できる。単離されたペプチドは、 ファーマコアとして機能するであろう。
20

本発明により、 十分な量の P R O 1 7 9、 P R O 2 0 7、 P R O 3 2 0、 P R O 2 1 9、 P R O 2 2 1、 P R O 2 2 4、 P R O 3 2 8、 P R O 3 0 1、 P R O 5 2 6、 P R O 3 6 2、 P R O 3 5 6、 P R O 5 0 9、 又は P R O 8 6 6 ポリペプチドが X線結晶学などの分析実験を実施するために入手可能である。さらに、 ここに提供した P R O ポリペプチドアミノ酸配列の知識は、 X線結晶学に換える、 又はそれに加えるコンピュータモデル化技術で用いられる知識を提供する。
30

【 0 2 0 5 】

実施例 2 5 : インビトロ抗増殖アッセイ

種々の P R O 1 7 9、 P R O 2 0 7、 P R O 3 2 0、 P R O 2 1 9、 P R O 2 2 1、 P R O 2 2 4、 P R O 3 2 8、 P R O 3 0 1、 P R O 5 2 6、 P R O 3 6 2、 P R O 3 5 6、 P R O 5 0 9、 又は P R O 8 6 6 ポリペプチドの抗増殖活性を、 本質的に Skehan 等, J. Natl. Cancer Inst. 82: 1107-1112 (1990)に記載されたスルホローダミン B (S R B) 線量結合アッセイを用いる国立癌研究所(N C I)の実験的、 疾患指向的インビトロ抗癌薬発見アッセイにおいて測定した。このアッセイで用いた 6 0 の腫瘍細胞系(「 N C I パネル」)、 並びにそれらの維持およびインビトロ培養の条件は、 Monks 等, J. Natl. Cancer Inst. 83: 757-766 (1991)に記載されている。このスクリーニングの目的は、 異なる型の腫瘍に対する試験化合物の細胞毒性及び / 又は細胞分裂停止活性を最初に評価することである(Monks 等, 上掲; Boyd, Cancer: Princ. Pract. Oncol. Update 3(10): 1-12 [1989])。
40

約 6 0 のヒト腫瘍細胞系からの細胞をトリプシン / E D T A (Gibco) で回収し、 1 回洗浄し、 I M E M 中に再懸濁し、 それらの生存を測定した。細胞懸濁物をピペット(100 μ L 容量)で別の 9 6 -ウェルプレートに添加した。6 日インキュベーションの細胞密度は 2 日インキュベーションより小さく過剰発現は防止された。播種後、 安定化のために 3 7 で 2 4 時間プレインキュベーションした。目的とする濃度の 2 倍希釈をゼロ時に 100 μ l の
50

アリコートにミクロタイタープレートウェルに添加した(1:2希釈)。試験化合物を2分の5log希釈(1000~100,000倍)で評価した。インキュベーションは5%CO₂ガスおよび100%加湿で2日および6日実施した。

インキュベーション後、培地を除去し、細胞を10%トリクロロ酢酸の0.1mlで40において固定した。プレートを脱塩水で5回洗浄し、乾燥させ、1%酢酸に溶解した0.4%スルホローダミンB(Sigma)の0.1mlで30分間染色し、1%酢酸で4回洗浄して非結合染料を除去し、乾燥させ、染色物を10mMトリス塩基[トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン]、pH10.5の0.1mlで5分間抽出した。スルホローダミンBの492nmにおける吸収(OD)を、コンピュータ接続96-ウェルプレートリーダーで測定した。

試験試料は一回又は複数の濃度で少なくとも40%の成長阻害効果を示すとポジティブと考えられる。結果を次の表4に示すが、そこでは腫瘍細胞型の省略記号は次の通りである:

N S C L = 非小細胞肺ガン; C N S = 中枢神経系

【0206】

表4

化合物	腫瘍細胞型	名称	
PRO179	白血病	CCRF-CEM	10
PRO179	乳	HS 578T	
PRO179	NSCL	SR	
PRO179	乳	NCI/ADR-RES	
PRO179	白血病	HL-60 (TB); SR	
PRO179	NSCL	HOP-62; NCI-H460	
PRO179	乳	MDA-N	
PRO179	NSCL	NCI-H522	
PRO179	結腸	COLO 205; HCC-2998	
PRO179	CNS	SF-295	
PRO179	乳	MDA-MB-435	
PRO179	前立腺	PC-3	
PRO179	白血病	MOLT-4	
PRO179	黑色腫	SK-MEL-5; SK-MEL-2	
PRO179	乳	MDA-MD-435; T-47D	
PRO179	黑色腫	MALME-3M	
PRO179	NSCL	NCI-H322	
PRO179	結腸	HCT-15	
PRO179	卵巢	OVCAR-3	
PRO179	NSCL	NCI-H226	
PRO179	腎臟	RXF-393	
PRO207	腎臟	CAKI-1; RXF-393	20
PRO207	白血病	MOLT-4; SR	
PRO207	NSCL	NCI-H322M; NCI-H522	
PRO207	NSCL	HOP-62	
PRO207	結腸	COLO 205	
PRO207	黑色腫	LOX IMVI	
PRO207	卵巢	IGROV1	
PRO207	腎臟	ACHN	
PRO207	前立腺	PC-3	
PRO207	乳	MDA-MB-231/ATCC	
PRO320	白血病	CCRF-CEM; RPMI-8226	30
PRO320	NSCL	HOP62; NCI H322M	
PRO320	結腸	HCT-116	
PRO320	腎臟	SN12C	
PRO320	乳	MDA-N	
PRO320	卵巢	OVCAR-3	
PRO320	黑色腫	MALME-3M	
PRO219	白血病	SR	40
PRO219	NSCL	NCI-H5222	
PRO219	乳	MCF7	
PRO219	白血病	K-562; RPMI-8226	
PRO219	NSCL	HOP-62; NCI-H322M	
PRO219	NSCL	NCI -H460	
PRO219	結腸	HT29; KM12; HCT-116	
PRO219	CNS	SF-539; U251	
PRO219	前立腺	DU-145	
PRO219	乳	MDA-N	

表4の続き

化合物	腫瘍細胞型	名称
PRO219	卵巣	IGROV1
PRO219	NSCL	NCI-H226
PRO219	白血病	MOLT-4
PRO219	NSCL	A549/ATCC; EKVVX; NCI-H23
PRO219	結腸	HCC-2998
PRO219	CNS	SF-295; SNB-19
PRO219	黒色腫	SK-MEL-2; SK-MEL-5
PRO219	黒色腫	UACC-257; UACC-62
PRO219	卵巣	OCAR-4; SK-OV-3
PRO219	腎臓	786-0; ACHN; CAKI-1; SN12C
PRO219	腎臓	TK-10; UO-31
PRO219	乳	NCI/ADR-RES; BT-549; T-47D
PRO219	乳	MDA-MB-435
PRO221	白血病	CCRF-CEM
	白血病	MOLT-4
	NSCL	HOP-62
	乳	MDA-N
	白血病	RPMI-8226; SR
	NSCL	NCI-H460
	結腸	HCC-2998
	卵巣	IGROV1
	腎臓	TK-10
	乳	MCF7
	白血病	K-562
	乳	MDA-MB-435
	卵巣	OVCAR-4
	腎臓	RXF 393
PRO224	前立腺	DU-145
	NSCL	HOP-62; NCI-H322M
	黒色腫	LOX IMVI
	卵巣	OVCAR-8
	白血病	SR
	NSCL	NCI-H460
	CNS	SF-295
	白血病	RPMI-8226
	乳	BT-549
	白血病	CCRF-CEM; LH-60 (TB)
	結腸	HCT-116
	乳	MDA-MB-435
	白血病	HL-60 (TB)
	結腸	HCC-2998
PRO224	前立腺	PC-3
	CNS	U251
	結腸	HCT-15
	CNS	SF-539
	腎臓	ACHN
	白血病	RPMI-8226
	NSCL	A549/ATCC; EKVVX; HOP-62
PRO328	白血病	40
PRO328	NSCL	

表4の続き

<u>化合物</u>	<u>腫瘍細胞型</u>	<u>名称</u>
PRO328	NSCL	NCI-H23; NCI-H322M
PRO328	結腸	HCT-15; KM12
PRO328	CNS	SF-295; SF-539; SNB-19; U251
PRO328	黒色腫	M14; UACC-257; UCAA-62
PRO328	腎臓	786-0; ACHN
PRO328	乳	MCF7
PRO328	白血病	SR
PRO328	結腸	NCI-H23
PRO328	黒色腫	SK-MEL-5
PRO328	前立腺	DU-145
PRO328	黒色腫	LOX IMVI
PRO328	乳	MDA-MB-435
PRO328	卵巣	OVCAR-3
PRO328	乳	T-47D
PRO301	NSCL	NCI-H322M
PRO301	白血病	MOLT-4; SR
PRO301	NSCL	A549/ATCC; EKVV;
PRO301	NSCL	NCI-H23; NCI-460; NCI-H226
PRO301	結腸	COLO 205; HCC-2998;
PRO301	結腸	HCT-15; KM12; HT29;
PRO301	結腸	HCT-116
PRO301	CNS	SF-268; SF-295; SNB-19
PRO301	黒色腫	MALME-3M; SK-MEL-2;
PRO301	黒色腫	SK-MEL-5; UACC-257
PRO301	黒色腫	UACC-62
PRO301	卵巣	IGROV1; OVCAR-4
PRO301	卵巣	OVCAR-5
PRO301	卵巣	OVCAR-8; SK0OV-3
PRO301	腎臓	ACHN; CAKI-1; TK-10; UO-31
PRO301	前立腺	PC-3; DU-145
PRO301	乳	NCI/ADR-RES; HS 578T
PRO301	乳	MDA-MB-435; MDA-N; T-47D
PRO301	黒色腫	M14
PRO301	白血病	CCRF-CEM; HL-60(TB); K-562
PRO301	白血病	RPMI-8226
PRO301	黒色腫	LOX IMVI
PRO301	腎臓	786-0; SN12C
PRO301	乳	MCF7; MDA-MB-231/ATCC
PRO301	乳	BT-549
PRO301	NSCL	HOP-62
PRO301	CNS	SF-539
PRO301	卵巣	OVCAR-3
PRO526	NSCL	HOP-62; NCI-H322M
PRO526	結腸	HCT-116
PRO526	黒色腫	LOX IMVI; SK-MEL-2

10

20

30

表4の続き

化合物	腫瘍細胞型	名称	
PRO526	卵巣	OVCAR-3	
PRO526	前立腺	PC-3	
PRO526	NSCL	NCI-H226	
PRO526	CNS	SF-539	
PRO526	腎臓	CAKI-1; RXF 393	
PRO362	NSCL	NCI-H322M	
PRO362	結腸	HCT-116	
PRO362	CNS	SF-295	10
PRO362	黒色腫	LOX IMVI	
PRO362	白血病	MOLT-4; RPMI-8226; SR	
PRO362	結腸	COLO 205	
PRO362	乳	HS 578T; MDA-N	
PRO362	前立腺	PC-3	
PRO362	白血病	HL-60 (TB); K-562	
PRO362	NSCL	EKVX; NCI-H23	
PRO362	結腸	HCC-2998	
PRO362	CNS	U251	
PRO362	黒色腫	UACC-257; UACC-62	
PRO362	卵巣	OVCAR-8	
PRO362	乳	T-47D	
PRO362	NSCL	NCI-H522	
PRO362	腎臓	RXF 393; UO-31	20
PRO362	乳	MDA-MB-435	
PRO362	NSCL	HOP-62; NCI-H522	
PRO362	結腸	KM12	
PRO362	黒色腫	MALME-3M; SK-MEL-2	
PRO362	黒色腫	SK-MEL-28; SK-MEL-5	
PRO362	卵巣	OVCAR-3; OVCAR-4	
PRO362	乳	MCF7	
PRO356	白血病	CCRF-CEM; MOLT-4; SR	
PRO356	NSCL	NCI-H23; NCI-H322M	
PRO356	NSCL	NCI-H460	
PRO356	NSCL	A549/ATCC	
PRO356	結腸	HCT-116; HCT-15; H29; KM12	30
PRO356	CNS	SF-268; SF-295; SF-539	
PRO356	CNS	SNB-19	
PRO356	黒色腫	LOX IMVI; SK-MEL-5	
PRO356	黒色腫	UACC-257	
PRO356	黒色腫	UACC-62	
PRO356	卵巣	OVCAR-8; OVCAR-5	
PRO356	腎臓	SN12C	
PRO356	前立腺	DU-145	
PRO356	白血病	K-562	
PRO356	白血病	HL-60 (TB)	
PRO356	乳	MDA-N	
PRO356	NSCL	EKVX; HOP-92	
PRO356	結腸	COLO 205; SW-620	
PRO356	CNS	SNB-75; U251	40

表4の続き

化合物	腫瘍細胞型	名称	
PRO356	黒色腫	M14	10
PRO356	卵巣	IGROV1; OVCAR-4;	
PRO356	腎臓	RXF 393	
PRO356	乳	BT-549	
PRO356	NSCL	NCI-H226	
PRO356	乳	MDA-MB-435	
PRO356	NSCL	HOP-62	
PRO356	腎臓	UO-31	
PRO356	白血病	RPMI-8226	
PRO509	白血病	K-562; MOLT-4	
PRO509	NSCL	HOP-92	20
PRO509	結腸	SW-620	
PRO509	CNS	U251	
PRO509	黒色腫	SK-MEL-28	
PRO509	腎臓	A498	
PRO509	乳	MDA-MB-435	
PRO509	白血病	RPMI-8226	
PRO509	黒色腫	SK-MEL-2	
PRO509	卵巣	OVCAR-3	
PRO509	腎臓	CAKI-1	
PRO866	白血病	HL-60 (TB); MOLT-4; SR	30
PRO866	NSCL	HOP-62	
PRO866	NSCL	HOP-92	
PRO866	結腸	KM12	
PRO866	CNS	SF-295	
PRO866	卵巣	IGROV1	
PRO866	乳	MDA-MB-435	
PRO866	黒色腫	LOX IMVI	

【0207】

材料の寄託

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

材料	ATCC寄託番号	寄託日
DNA16451-1078	209281	1997年9月18日
DNA30879-1152	209358	1997年10月10日
DNA32284-1307	209670	1998年3月 11日
DNA32290-1164	209384	1997年 10月17日
DNA33089-1132	209262	1997年 9月16日
DNA33221-1133	209263	1997年9月16日
DNA40587-1231	209438	1997年11月 7日
DNA40628-1216	209432	1997年11月 7日
DNA44184-1319	209704	1998年3月26日
DNA45416-1251	209620	1998年2月 5日
DNA47470-11130-P1	209422	1997年10月28日
DNA53971-1359	209750	1998年4月 7日

【0208】

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

とができ、これは、何れが最初に来ようとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号886OG638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

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

【図面の簡単な説明】

【Fig 1】 天然配列PRO179をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列(配列番号:1)を示す図であり、ヌクレオチド配列(配列番号:1)は、ここでDNA16451-1078と命名されるクローンである。さらに、太字及び下線部は、各々の開始及び終止コドンの位置である。

【Fig 2】 Fig 1に示した配列番号:1のコード化配列から誘導された天然配列PRO179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。

【Fig 3】 天然配列PRO207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:6)を示す図であり、ヌクレオチド配列(配列番号:6)は、ここでDNA30879-1152と命名されるクローンである。さらに、太字及び下線部は、各々の開始及び終止コドンの位置である。

【Fig 4】 Fig 3に示した配列番号:6のコード化配列から誘導された天然配列PRO207ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:7)を示す図である。

【Fig 5】 天然配列PRO320をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列(配列番号:9)を示す図であり、ヌクレオチド配列(配列番号:9)は、ここでDNA32284-13407と命名されるクローンである。さらに、太字及び下線部は、各々の開始及び終止コドンの位置である。

【Fig 6】 Fig 5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PRO320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。

【Fig 7】 天然配列PRO219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:14)を示す図であり、ヌクレオチド配列(配列番号:14)は、ここでDNA32290-1164と命名されるクローンである。さらに、太字及び下線部は、各々の開始及び終止コドンの位置である。

【Fig 8】 Fig 7に示した配列番号:14のコード化配列から誘導された天然配列PRO219ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:15)を示す図である。

【Fig 9】 天然配列PRO221をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列(配列番号:19)を示す図であり、ヌクレオチド配列(配列番号:19)は、ここでDNA330892-1132と命名されるクローンである。さらに、太字及び下線部は、各々の開始及び終止コドンの位置である。

【Fig 10】 Fig 9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PRO221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。

【Fig 11】 天然配列PRO224をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAの

10

20

40

50

ヌクレオチド配列（配列番号：24）を示す図であり、ヌクレオチド配列（配列番号：24）は、ここでDNA33221-11133と命名されるクローンである。さらに、太字及び下線部は、各々の開始及び終止コドンの位置である。

【Fig 12】 Fig 11に示した配列番号：24のコード化配列から誘導された天然配列PRO224ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：25）を示す図である。

【Fig 13】 天然配列PRO328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：29）を示す図であり、ヌクレオチド配列（配列番号：29）は、ここでDNA40587-1231と命名されるクローンである。さらに、太字及び下線部は、各々の開始及び終止コドンの位置である。

【Fig 14】 Fig 13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PRO328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。 10

【Fig 15】 天然配列PRO301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：34）を示す図であり、ヌクレオチド配列（配列番号：34）は、ここでDNA40628-1216と命名されるクローンである。さらに、太字及び下線部は、各々の開始及び終止コドンの位置である。

【Fig 16】 Fig 15に示した配列番号：34のコード化配列から誘導された天然配列PRO301ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：35）を示す図である。

【Fig 17】 天然配列PRO526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：42）を示す図であり、ヌクレオチド配列（配列番号：42）は、ここでDNA44184-1319と命名されるクローンである。さらに、太字及び下線部は、各々の開始及び終止コドンの位置である。 20

【Fig 18】 Fig 17に示した配列番号：42のコード化配列から誘導された天然配列PRO526ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：43）を示す図である。

【Fig 19】 天然配列PRO362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、ヌクレオチド配列（配列番号：47）は、ここでDNA45416-1251と命名されるクローンである。さらに、太字及び下線部は、各々の開始及び終止コドンの位置である。

【Fig 20】 Fig 19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PRO362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 21】 天然配列PRO356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：54）を示す図であり、ヌクレオチド配列（配列番号：54）は、ここでDNA47470-1130-P1と命名されるクローンである。さらに、太字及び下線部は、各々の開始及び終止コドンの位置である。 30

【Fig 22】 Fig 21に示した配列番号：54のコード化配列から誘導された天然配列PRO356ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：55）を示す図である。

【Fig 23】 天然配列PRO509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、ヌクレオチド配列（配列番号：59）は、ここでDNA50148-1068と命名されるクローンである。さらに、太字及び下線部は、各々の開始及び終止コドンの位置である。

【Fig 24】 Fig 23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PRO509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。 40

【Fig 25】 天然配列PRO866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、ヌクレオチド配列（配列番号：61）は、ここでDNA53971-1359と命名されるクローンである。さらに、太字及び下線部は、各々の開始及び終止コドンの位置である。

【Fig 26】 Fig 25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PRO866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。

【 図 1 】

【 図 2 】

シグナル配列	アミノ酸	1-16
チロシンキナーゼリン酸化部位	アミノ酸	342-351
N-ミリストイル化部位	アミノ酸	279-285; 352-358; 367-373
ロイシンジップバターン	アミノ酸	120-142; 127-149
N-グリコシル化部位	アミノ酸	23-27; 115-119; 296-300; 357-361
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	100-104; 204-208

MFTIPIHLLFIVPLWISRRQDGSNFSSEPLSPKGRMFLDVKWLLANGLQLGKLDKFVQHONIDQIFOL
NFIQDSYDFSLTSQTSKEEKEKLPTTQLXKVNKEKVRMSELELSNEKSLEESLKEEILLLQKVKVQELOLTNLQ
NQEPETBHEWTSLSKTFVQKDNQSKDULLQYEDQVOKLNOHQSHSIEEINQRLRSTIQEPTTISLSKPRAPHT
TPFLQLNQERIRNKWQKAPECTTINYRGHNTGMSYAIRPNSQHFVVCJGWSPTPLIHQDGSNFNTEW
NYXNGFGRDGEWPLGLEKXISYVSKQNSVNRILEEWDKCNKHBYIESPYLGNHETNTYLHLVTAJOMVNAIPE
NLDDFLVSTWCKAAGKHCNCPEGYSGGWWHDCEGENNGLKINKPKRAKSPPERRRLGSLWSKQSNGRLYSIXSTMW
IHPDTSESFPE

【 図 5 】

【 図 6 】

シグナル配列	アミノ酸	1-21
アミド化部位	アミノ酸	330-334
アスパラギン酸及びアスパラギン水酸化部位	アミノ酸	109-121; 191-203;236-248
EGF様ドメインステインバーチングシグネチャー	アミノ酸	80-91
カルシウム結合EGF様ドメイン	アミノ酸	103-125;230-252; 185-207

MPLPWSLALPLLLSWVAGGFGNAASARHHGLLASARQPGVCHYGTKLACCGYWRNSKGVCEATCPEGCKFGEVC
EBCPFRCGPFYGTCKTSNEDNCMOPRCPFCRCHVNTHGKYFCFLSGHMLPACTCVNSRPTCAMINCOVSCEDT
EEGPQCLCPSSSLRLAPLNGRDCLIDECASGCKV1PYCNRNCVCHGKCHICPGEYRDCIDINCTM
DSHTCSHSHANCFNTQGSFSKCKQKGKGNLRCSA1PENSVKEVLRASPCTKDRIKKLAAHNSMKKKAK1KNTV

【 図 3 】

〔 4 〕

シグナル配列	アミノ酸	1-40
N-ミリストイル化部位	アミノ酸	139-143
N-グリコシル化部位	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
原核生物膜リポタンパク質賛接着部位	アミノ酸	24-35

MAARRSQRQRGRRGEFPLVPLALCLGLALACOLLLNLAVSLGSRASLQAEPQBELVAAEDOPPSELNPOT
EESQDPAPFLNRLVRPRSSAPGKRTRARRIAAHYEVHPRPQGDQAGVUDGTVGHEEARINSSPLRYNRQI
GFFIVTRGTLAQLYLYCQVHFDEGAKVLKLDLVDGVILARCLCEEFSSATAASSLGPQLRLCQVSGGLALRPGSSLR
IRTPWLAHLKAAPFLTYFGLFQVH

【 図 7 】

〔 四 8 〕

シグナル配列	アミノ酸	1-23
N-グリコシル化部位	アミノ酸	221-225
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	115-119; 606-610;892-896
N-ミリストイル化部位	アミノ酸	133-139;258-264; 299-305;340-346;453-459; 454-500;639-645;690-694; 752-758;792-798
アミド化部位	アミノ酸	314-318; 560-564;601-605
アスパラギン酸及びアスパラギン水酸化部位	アミノ酸	253-265;294-306; 335-347;376-386;417-429; 458-470;540-552;581-593

【 図 9 】

【 図 1 2 】

シグナル配列	アミノ酸	1-30
膜貫通ドメイン	アミノ酸	231-248
N-グリコシル化部位	アミノ酸	126-130;195-199; 213-217
N-ミリストイル化部位	アミノ酸	3-9;10-16;26-32; 30-36;112-118;166-172;212-218 224-230;230-236,263-269
原核生物膜リボタンパク質脂質接着部位	アミノ酸	44-55
ロイシンジッパー・パターン	アミノ酸	17-39

MSCGGNMAQVGAWPRTGALGLALLLGLGLEAAAASPLSTPTSAQAAGPGSSCSCPPTFKFCRTSGLCVPLTRCDL
RDLCSGSDEEBCRIPCTQKGQCPPPGLCPCTGVSDCGSGTDKLLRNCSRSLACLAGELRCLTSDDCIPFLTW
RDCGHPDCFDSSDELGCCTGPEFADTTGMPVTLSEVSLTRNATTMGPVTLTESVPVSGNATSSQADQSGS
PTAYGVIAAVALSALSALVTATLLLSLRAOERIPLRIGLJUWJMKESSILSPEKOTSLR

〔 四 13 〕

【 図 10 】

シグナル配列	アミノ酸	1-33
段質遺伝子	アミノ酸	204-219
N-グリコシル化部位	アミノ酸	47-51; 94-98
cAMP- 及び cGMP 依存性プロテインキナーゼゼリン酸化部位	アミノ酸	199-203
N-ミリストイル化部位	アミノ酸	37-43; 45-51; 110-116

MNLVLDWLTRLRSMSMCLLQSFLMILCPHSASMPCKGCLCSSGGLNITCSNANLKEIPIRDLPPETVLLYLDNSQ
TIS I PNE I DFLDQIQLVRLNLSKQGIFIEFDBHVAEVLQTLQDLSDRNQI5QSVHKNAFFNNLKRARIANNPWHCD
CTLQVLQVRSMASMSNHETAHNVICKSVLDEHAGRPFLNAANDADLCNLPKKTTDYAMLVTMFGWFTMVISYVVYTV
RQNODDARRHLLEYLKSLPSRQKKADEPDISTVV

【 図 1 1 】

【 図 1 4 】

シグナル配列	アミノ酸	1-22
N-グリコル化部位	アミノ酸	114-118;403-407; 409-413
グリコサアミノグリカン接着部位	アミノ酸	439-443
N-ミリストイル化部位	アミノ酸	123-129;142-149; 152-158;169-175;180-186;231-237; 250-256
アミド化部位	アミノ酸	82-88;172-176
バーオキシダーゼヒミガンドングチチャー	アミノ酸	287-298
細胞外タンパク質SCP/Tpx-1/Ag5/PR-1/S67シグネチャー-1	アミノ酸	127-138
細胞外タンパク質SCP/Tpx-1/Ag5/PR-1/S67シグネチャー-2	アミノ酸	139-150

MHGCSFLMLLPLLLWATTPGVALTDEEKRMLVHLHNLYRAQVSPTA5DMLHNRWDDEELAPAKAYAROCV
WGHNKRGRGGRNLFATDEGMDVPLMAPEWHEHRRYHNLSATASCGSPCQMGHTYVWAXTER14TGCHSFCEKL
QGVETNEILUVCNPYEPGNVKRGPYKPEPCTGSPCSCPGYHCKNSLCP1EPISEPADQLYPLVTEATPSFRATEAS
DSRKRTMPGTLSSATLPIKAFALVTEUTGSVLDLPAKALVEPTAQSTLAKTDPSPMATEPPCTVTEPEVPSIILAHSLSPL
DRSEMTGGFKTHVPI1PKAFALVTEUTGSVLDLPAKALVEPTAQSTLAKTDPSPMATEPPCTVTEPEVPSIILAHSLSPL
DRSEMTGGFKTHVPI1PKAFALVTEUTGSVLDLPAKALVEPTAQSTLAKTDPSPMATEPPCTVTEPEVPSIILAHSLSPL

【 1 】

【 四 1 6 】

シグナル配列	アミノ酸	1-27
膜貫通ドメイン	アミノ酸	235-256
N-グリコシル化部位	アミノ酸	185-189
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	270-274
N-ミリストイル化部位	アミノ酸	105-111, 116-122, 158-164, 219-225, 232-243, 256-262

MGTQKAQVERKLLCLFLILAIICLSALAGSVTVHSSEPEVRIPEPNPVKLSCASGFSSPRVENVKFQDGDTTRLVCYNNKITAISVEDRPTFLPTGIFKWSVRDGTCTYCMWSEECGSNSYGEVKVKLIVLVPSPSKPTVNIPSSATIGNRAVTCLESDQGDSPESYTWKFDGIVMPNTPKRSFRASNSVYLNPNTGELVDFPLASDTSGYECSREKTFMPTMSNAVRMCEWRNENGVVIAVAVLTLTLLLGVLFGVFIYFAVSRRGHDFRTKTKSSTKKVYIQCSPSRSEGEFKQTGSTPML

〔 17 〕

(二〇)

シグナル配列	アミノ酸	1-19
膜貫通ドメイン	アミノ酸	281-300
グリコサミン糖鎖接着部位	アミノ酸	149-153
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	308-312
N-メリストイル化部位	アミノ酸	2-8; 148-154; 158-164;

〔 図 21 〕

【 図 1 8 】

シグナル配列	アミノ酸	1-26
ロイシンジッパー/バターン	アミノ酸	135-157
グリコサミノグリカン接着部位	アミノ酸	436-440
N-グリコシル化部位	アミノ酸	82-86;179-183,237-241; 372-376;423-427
VWFC ドメイン	アミノ酸	411-427

S#ACKRQHLSNVAJLRAAARFQJGALQEELQDUDSQAQJUSPFTAFHGLGJHLLDRLQRGQLEQHGF
RFLAQALQYLFQDNALQALPDFTFDLQNLLTHFLHNGRN1SSPERAFQLSDFLDRLLNRHVNRAVHFPA
GRMLTYFLFANNSALTEPALAFLRQLYRLNDNNPWCDRCRPLWLNQKFRGSSESVPSLQRLQADRLKR
LANDLQAVCATGQVYPIWTGRADTEEPFLGPCKCPDAADAKSLEPVRPASAGNQLRCPVPPDGSPGNNG
FNSRTSPGTGLQFSLPAPLTAVRPEGSEPPGFPFTSGPRRRPGCSRKNTRSHCRQLQAGSGGGGTDSESGSA
PLSTSCLTSPGLAHLWTVLPGC

(19)

(图 22)

シグナル配列	アミノ酸	1-26
N-グリコシル化部位	アミノ酸	58-62;253-257;267-271
グリコサミノグリカン接着部位	アミノ酸	167-171
cAMP-及びcGMP依存性プロテイキンナーゼリン酸化部位	アミノ酸	176-180
N-ミリストイル化部位	アミノ酸	168-174;196-202; 241-247;252-256;262-327-333
細胞接着配列	アミノ酸	199-202

MLKKLPSAVTLCLIFIVAFVFSHPAWLQLSKSCHKTPAQPCQLKAAACCEEVKEILKAQOVANLSSLSELNKKQERDWD
SVVMQWVQHNSKMRMSELSLTDAESYKSEMNNQD1MLQQAOTVTSOSADATYCCSSLWQHNYRISGVYKLPPD
DFPLGSEPELVFCMDTMSGGWVIIYQRKSGLFSVYDFRDWKQYKPGCSIGFDGWLNLEHHLRSOPTRLRVEMED
WEGLNRLYAEYSHFLGNELNLSYRLFNGNTGNVGDNALYHNTTAPFKSTDKDNDNLCKCAQLRKGGYWNCCTD
SENICGUWVYIPEHNPWVYIWTGTTWYGMGTCVSLKJHMEWVMBPDRBZ

【图23】

【圖 3-4】

シグナル配列	アミノ酸	1-36
膜貫通ドメイン	アミノ酸	205-221
N-グリコシリ化部位	アミノ酸	110-114,173-177
N-ミリストイル化部位	アミノ酸	81-87;89-95;104-110; 120-126;153-159;193-199;195-201; 220-226

MEPPGDWGPWWRSTPRTDVLRLVLYTLFLGAPCYAPALPSCKEDEYVGSECCPKCSPGYRVKEACGELTGTVC
EPPCGTCAIHLNGKLLQCMQCPAMGLRSRNCRSRTEVANAGCGSPGHCFIVDGDHCAA CRATSSPQC
OKGTESODTLCNCPGPCTGMPNTLLEFCOHOIKCSWLVPAKLSGSVIVUVCSTGLJLQCV

【 図 25 】

【 26 】

アミノ酸	1-26
アミノ酸	131-135
アミノ酸	144-148
アミノ酸	26-32; 74-80; 132-138; 134-140; 190-196; 287-293; 290-296

MENPSPAAJGLKACALLLATLGAAGQPLGESICSARAPAKYSITFTGKWSQTAFPKQYPLFRPPAQWSSLGAAHSSDWMRKVNGVNSNLGRGEWAALMKEIEAEGALQSUVHEVFSAPAVPSGTQSCTEALVRHRSLVSFVVIPVSDPFWVGDSLDLCGDRRQEKAQALDLIVPYTAGTSQFFTSFSNPNTIPODVTETTISSESHSPHSANVYPRFLKAPDNPPIARTVLLRLRSQPRAFIAVPPAVLPVSRDNEIVDASVSPETPLDCEVSLWSSWGLCGHGCRLGKSSRTYRVEVCPALPDNPPIERAEFAVWPDNV"

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1/91 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C C 1 2 R 1:91

- (31)優先権主張番号 60/130,232
 (32)優先日 平成11年4月21日(1999.4.21)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/131,445
 (32)優先日 平成11年4月28日(1999.4.28)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/134,287
 (32)優先日 平成11年5月14日(1999.5.14)
 (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 US9921090
 (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 US9921547
 (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)

前置審査

- (72)発明者 アシュケナジ , アヴィ , ジェイ .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 2 , サン マテオ , テリータウン ストリート 1 4
 5 6
- (72)発明者 ゴダード , オードリー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 3 1 , サン フランシスコ , コンゴー ストリート 1
 1 0
- (72)発明者 ゴドスキー , ポール ジェイ .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0 , ブーリングゲーム , イーストン ドライブ 2 6 2
 7
- (72)発明者 ガーニー , オースティン , エル .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 2 , ベルモント , デビー レーン 1
- (72)発明者 マースタース , スコット , エー .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 7 0 , サン カルロス , チェリー ストリート 9 9 0

(72)発明者 ネイピエール, メアリー, エー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, ヒルズボロー, ハイン ロード 1015

(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 セリット, リバティー ストリート 11
10

(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, ヒルズボロー, サウスダウン コート 35

審査官 田村 明照

(56)参考文献 特表2002-504308 (JP, A)

特開平02-072869 (JP, A)

特開平05-506659 (JP, A)

特開平09-505560 (JP, A)

特表2002-533058 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

BIOSIS/WPI(DIALOG)

SwissProt/PIR/Geneseq

PubMed