

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-201654

(P2004-201654A)

(43) 公開日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 4
A 6 1 K 45/06	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 5
審査請求 未請求 請求項の数 70 O L (全 234 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-379711 (P2002-379711)	(71) 出願人	596168317
(22) 出願日	平成14年12月27日 (2002.12.27)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願2001-553947 (P2001-553947)		GENENTECH, INC.
原出願日	平成12年2月11日 (2000.2.11)		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
(31) 優先権主張番号	PCT/US99/05028		0-4990・サウス・サン・フランシス
(32) 優先日	平成11年3月8日 (1999.3.8)	(74) 代理人	100109726
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 園田 吉隆
(31) 優先権主張番号	60/123, 972	(74) 代理人	100101199
(32) 優先日	平成11年3月11日 (1999.3.11)		弁理士 小林 義敦
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	アシュケナジ, アヴィ, ジェー.
(31) 優先権主張番号	60/133, 459		アメリカ合衆国 カリフォルニア 944
(32) 優先日	平成11年5月11日 (1999.5.11)		02, サン マテオ, テリータウン スト
(33) 優先権主張国	米国 (US)		リート 1456
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 腫瘍治療のための組成物及び方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ヒトを含む哺乳動物における腫瘍細胞成長及び増殖の診断及び治療のための組成物及び方法の提供。

【解決手段】 腫瘍細胞に由来する PRO4980 ポリペプチドをコードする特定の塩基配列、この種の分子の増殖方法、および PRO4980 ポリペプチドの生産法、該ポリペプチドのモノクローナル抗体、及び該抗体の生産方法について開示する。さらに、該ポリペプチドをコードする遺伝子、及び該ポリペプチドを用いる、或る種の癌の診断及び治療（予防を含む）方法についても開示する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

P R O 4 9 8 0 ポリペプチドに結合する単離された抗体。

【請求項 2】

前記ポリペプチドに特異的に結合する請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記ポリペプチドを発現する細胞の死を誘発する請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

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

10

【請求項 5】

モノクローナル抗体である請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

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

【請求項 7】

標識された請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 8】

抗体断片又は一本鎖抗体である請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 9】

20

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

【請求項 10】

前記抗体の治療的有効量を含有する請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

細胞毒性又は化学治療薬をさらに含有する請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の抗体をコードする単離された核酸分子。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 14】

30

請求項 13 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 15】

P R O 4 9 8 0 ポリペプチドに結合する抗体の製造方法において、請求項 14 に記載の宿主細胞を前記抗体を発現させるのに十分な条件下で培養し、細胞培地から前記抗体を回収することを含んでなる方法。

【請求項 16】

P R O 4 9 8 0 ポリペプチドのアンタゴニスト。

【請求項 17】

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

【請求項 18】

40

P R O 4 9 8 0 ポリペプチド、又はその補体をコードする核酸配列にハイブリッド形成する単離された核酸分子。

【請求項 19】

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

【請求項 20】

P R O 4 9 8 0 ポリペプチドを含有すると推測される試料中で前記ポリペプチドの存在を測定する方法において、当該試料を抗-P R O 4 9 8 0 抗体に暴露し、前記抗体の前記試料中の前記ポリペプチドへの結合を測定することを含んでなる方法。

【請求項 21】

50

前記試料が、PRO4980ポリペプチドを含むと推測される細胞を含有する請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記細胞が癌細胞である請求項21に記載の方法。

【請求項23】

哺乳動物において腫瘍を診断する方法において、(a)哺乳動物から得た組織細胞の試験試料中、及び(b)同じ細胞型の知られた正常組織細胞の対照試料中におけるPRO4980ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含んでなり、対照試料に比較した試験試料における高いレベルが、当該試験組織細胞を得た哺乳動物における腫瘍の存在を示す方法。

10

【請求項24】

哺乳動物において腫瘍を診断する方法において、(a)抗PRO4980抗体を哺乳動物から得た組織細胞の試験試料と接触させ、そして(b)前記抗体と試験試料中のPRO4980ポリペプチドとの間の複合体の形成を検出することを含んでなり、複合体の形成が前記哺乳動物における腫瘍の存在を示す方法。

【請求項25】

前記抗体が検出可能に標識された請求項24に記載の方法。

【請求項26】

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

20

【請求項27】

抗PRO4980抗体及び担体を適切な包装内に含んでなる癌診断用キット。

【請求項28】

前記抗体が、PRO4980ポリペプチドを含有することが推測される試料中のそれらの存在を検出するために用いられるという説明書をさらに具備する請求項27に記載のキット。

【請求項29】

腫瘍細胞の成長の阻害剤であって、PRO4980ポリペプチドの生物学的活性を阻害する薬剤の有効量を含んでなり、それによりPRO4980ポリペプチドを発現すると考えられる腫瘍細胞の成長を阻害する阻害剤。

30

【請求項30】

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

【請求項31】

前記薬剤が、抗PRO4980抗体である請求項29又は30に記載の阻害剤。

【請求項32】

前記抗PRO4980抗体が細胞死を誘発する請求項31に記載の阻害剤。

【請求項33】

放射線処理、あるいは細胞毒性薬又は化学治療薬を用いた処理と組み合わせて使用される請求項29ないし32に記載の阻害剤。

40

【請求項34】

腫瘍細胞の成長の阻害剤であって、PRO4980ポリペプチドの発現を阻害する薬剤の有効量を含んでなり、それによりPRO4980ポリペプチドを発現すると考えられる腫瘍細胞の成長を阻害する阻害剤。

【請求項35】

前記腫瘍細胞が、同じ組織型の正常細胞に比較して前記ポリペプチドを過剰発現する請求項33又は34に記載の阻害剤。

【請求項36】

前記薬剤が、PRO4980ポリペプチドをコードする核酸にハイブリッド形成するアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はその補体である請求項34に記載の阻害剤。

50

【請求項 37】

放射線処理、あるいは細胞毒性薬又は化学治療薬を用いた処理と組み合わせて使用される請求項 34 ないし 36 に記載の阻害剤。

【請求項 38】

容器；

当該容器上のラベル；及び

当該容器内に収容された活性剤を含有する組成物とを具備し、当該組成物が腫瘍細胞の成長を阻害するのに有効であり、容器上のラベルが当該組成物は前記腫瘍細胞中で同じ組織型の正常細胞に比較して P R O 4 9 8 0 ポリペプチドの過剰発現を特徴とする状態の治療に有効であることを表示する製造品。

10

【請求項 39】

前記活性剤が、前記 P R O 4 9 8 0 ポリペプチドの生物学的活性及び／又は発現を阻害する請求項 38 に記載の製造品。

【請求項 40】

前記活性剤が抗－P R O 4 9 8 0 抗体である請求項 39 に記載の製造品。

【請求項 41】

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

【請求項 42】

P R O 4 9 8 0 ポリペプチドの生物学的又は免疫学的活性を阻害する化合物を同定する方法において、候補化合物を前記ポリペプチドと、2つの成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間に接触させ、前記ポリペプチドの生物学的又は免疫学的活性が阻害されるか否かを測定することを含んでなる方法。

20

【請求項 43】

前記候補化合物が、抗－P R O 4 9 8 0 抗体である請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記候補化合物又は前記 P R O 4 9 8 0 ポリペプチドが固体支持体に固定化される請求項 42 に記載の方法。

【請求項 45】

非固定化成分が検出可能に標識される請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

P R O 4 9 8 0 ポリペプチドの活性を阻害する化合物を同定する方法において、(a) 細胞とスクリーニングすべき候補化合物とを、P R O 4 9 8 0 ポリペプチドの存在下で、前記ポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ、そして (b) 前記細胞性反応の誘発を測定して試験化合物が有効なアンタゴニストか否かを決定することを含んでなり、前記細胞性反応の誘発を欠くことが前記化合物が有効なアンタゴニストであることを示す方法。

30

【請求項 47】

P R O 4 9 8 0 ポリペプチドを発現する細胞で前記ポリペプチドの発現を阻害する化合物を同定する方法において、前記細胞を化合物と接触させ、前記ポリペプチドの発現が阻害されるか否かを測定することを含んでなる方法。

40

【請求項 48】

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

【請求項 49】

F i g 7 0 (配列番号：70) に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と少なくとも 80% の核酸配列同一性を持つ単離された核酸。

【請求項 50】

F i g 6 9 (配列番号：69) に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 80% の核酸配列同一性を持つ単離された核酸。

【請求項 51】

50

Fig 69 (配列番号: 69) に示すヌクレオチド配列の全長コード化配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも80%の核酸配列同一性を持つ単離された核酸。

【請求項52】

ATCC登録番号PTA-43の下で寄託されたDNAの全長コード化配列と少なくとも80%の核酸配列同一性を持つ単離された核酸。

【請求項53】

請求項49から52のいずれか一項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項54】

当該ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識されるコントロール配列に作用可能に結合した請求項53に記載のベクター。 10

【請求項55】

請求項53に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項56】

前記細胞がCHO細胞である請求項55に記載の宿主細胞。

【請求項57】

前記細胞が大腸菌である請求項55に記載の宿主細胞。

【請求項58】

前記細胞が酵母菌細胞である請求項55に記載の宿主細胞。

【請求項59】

前記細胞がバキュロウイルス感染昆虫細胞である請求項55に記載の宿主細胞。 20

【請求項60】

PRO4980ポリペプチドの製造方法において、請求項55に記載の宿主細胞を前記ポリペプチドを発現させるのに十分な条件下で培養し、細胞培地から前記ポリペプチドを回収することを含んでなる方法。

【請求項61】

Fig 70 (配列番号: 70) に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を持つ単離されたポリペプチド。

【請求項62】

Fig 70 (配列番号: 70) に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較した場合、少なくとも80%ポジティブのスコアをつけられる単離されたポリペプチド。 30

【請求項63】

ATCC登録番号PTA-43の下で寄託されたDNAの全長コード化配列によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を持つ単離されたポリペプチド。

【請求項64】

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

【請求項65】

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

【請求項66】

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

【請求項67】

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

【請求項68】

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

【請求項69】

(a) Fig 70 (配列番号: 70) に示すポリペプチドであって付随するシグナルペプ 50

チドを欠くものをコードするヌクレオチド配列；

(b) Fig 70 (配列番号：70) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであってそれに付随するシグナルペプチドを持つものをコードするヌクレオチド配列；又は

(c) Fig 70 (配列番号：70) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであってそれに付随するシグナルペプチドを欠くものをコードするヌクレオチド配列

と少なくとも80%の核酸配列同一性を持つ単離された核酸。

【請求項70】

(a) Fig 70 (配列番号：70) に示すポリペプチドであって付随するシグナルペプチドを欠くもの；

(b) Fig 70 (配列番号：70) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであってそれに付随するシグナルペプチドを持つもの；又は 10

(c) Fig 70 (配列番号：70) に示すポリペプチドの細胞外ドメインであってそれに付随するシグナルペプチドを欠くもの

と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を持つ単離されたポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、腫瘍の診断及び治療のための組成物及び方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

悪性腫瘍（癌）は、米国において心臓疾患に続き第2の主要な死亡原因である（Boring等, CA Cancel J. Clin., 43: 7 [1993]）。 20

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

遺伝子発現の交互変化は制御不能な細胞成長及び脱分化に強く関連しており、全ての癌に共通する特徴である。或る種の良く研究されたゲノムが、通常は腫瘍抑制遺伝子と呼ばれ、正常には悪性細胞成長又は或る種の優性遺伝子、例えば悪性成長を促進する用に作用する 30
オンコジーンの過剰発現を防止するように作用する劣性遺伝子発現の現象を示すことが見出された。これらの遺伝子変化は、凝集して十分な腫瘍形成性フェノタイプを示す形質の幾つかが移入される原因であることが明らかとなった（Hunter, Cell 64: 1129 [1991]； Bishop, Cell 64: 235-248 [1991]）。

【0003】

癌細胞における遺伝子（例えばオンコジーン）過剰発現の良く知られたメカニズムは遺伝子増幅である。これは、祖先細胞の染色体において特定遺伝子の多重コピーが生成されるプロセスである。このプロセスは、遺伝子を含む染色体の領域の計画性のない複製、次いで複製されたセグメントが染色体へ戻る再組換えを含む（Alitalo等, Adv. 40
Cancer Res. 47: 235-281 [1986]）。遺伝子増幅に平行する遺伝子の過剰発現は、即ち作成されるコピーの数に比例すると考えられている。

成長因子及び成長因子レセプターをコードするプロトオンコジーンは、乳癌を含む、様々なヒトの悪性腫瘍の原因に重要な役割を担っていることが確認されている。例えば、表皮成長因子レセプター（EGFR）に関連した185-kdの膜貫通糖タンパク質レセプター（p185^{HER2}、HER2）をコードするヒトErbB2遺伝子（erbB2、her2としても知られている、又はc-erbB-2）は、ヒトの乳癌の約25%~30%で過剰発現されていることが見出されている（Slamon等, Science 235: 177-182 [1987]； Slamon等, Science 244: 707-712 [1989]）。 50

【0004】

プロトオンコジーンの遺伝子増幅は、典型的には癌のより悪性の形態に含まれる事象であり、臨床的結果の予言者として作用しうることが報告されている（Schwab等, *Genes Chromosome Cancer* 1, 181-193 [1990] ; Alitalo等, 上掲）。即ち、erbB2の過剰発現は、特に腋窩のリンパ節を含む一次疾患を持つ患者において、不完全な予後の前兆と共通して見なされており（Slamon等, [1987] 及び [1989], 上掲; Ravdin及びChamness, *Gene* 159: 19-27 [1995] ; 及びHynes及びStern, *Biochem Biophys Acta* 1198: 165-184 [1994]）、ホルモン療法及びCMF（シクロホスファミド、メトトレキセート、及びフルオロウラシル）を含む化学治療薬に対する感受性又は耐性と関連付けられていた（Baselga等, *Oncology* 11 (3 Suppl 1): 43-48 [1997]）。しかしながら、erbB2過剰発現と不完全な予後との関連にも関わらず、HER2-ポジティブな患者のタキサンでの処理に臨床的に反応する可能性は、HER2-ネガティブ患者の3倍も大きかった（上掲）。組換えヒト化抗-ErbB2（抗-HER2）モノクローナル抗体（マウス抗-ErbB2抗体4D5のヒト化型、rhumaB HER2又はHerceptin（商品名）と呼ばれる）は、広範な従来の抗癌治療を受けたErbB2を過剰発現する転移性乳癌を持つ患者で臨床的に活性である。（Baselga等, *J. Clin. Oncol.* 14: 737-744 [1996]）。 10

上記に照らして遺伝子増幅に関連する腫瘍の診断及び治療に有用な新規な方法及び組成物を同定することに明らかな興味がある。 20

【0005】

（発明の概要）

1. 実施態様

本発明は、ヒトを含む哺乳動物における腫瘍細胞成長及び増殖の診断及び治療のための組成物及び方法に関する。本発明は、腫瘍細胞のゲノムにおいて増幅される遺伝子の同定に基づく。このような遺伝子増幅は、遺伝子産物の同じ組織型の正常細胞と比較して過剰な発現に関連し、腫瘍形成に寄与すると予測される。従って、増幅された遺伝子にコードされるタンパク質は、或る種の癌の診断及び治療（予防を含む）に有用であると考えられ、腫瘍治療の予後の予言者として作用する。 30

一実施態様では、本発明は、ここでPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドと命名されるポリペプチドに結合する単離された抗体に関する。一態様では、単離された抗体は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243 40、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに特異的に結合する。他の態様では、これらの抗体は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PR 50

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

10

20

30

40

50

【0006】

他の実施態様では、本発明は、製薬的に許容される担体と混合された、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合する抗体を含む物質の組成物に関する。一態様では、この物質の組成物は治療的有効量の抗体を含有する。他の態様では、この組成物は、更なる活性成分を含有し、それらは、例えば更なる抗体又は細胞毒性又は化学治療薬であってよい。好ましくは、この組成物は無菌である。

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

またさらなる実施態様では、本発明は抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342

、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体の製造方法に関し、当該方法は、その抗体をコードする核酸分子で形質転換した宿主細胞を当該抗体を発現させるのに十分な条件下で培養し、細胞培地から抗体を回収することを含んでなる。

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

10

20

【0007】

さらなる実施態様では、本発明は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド、又はその補体をコードする核酸配列にハイブリッド形成する単離された核酸分子に関する。単離された核酸分子は、好ましくはDNAであり、ハイブリッド形成は好ましくは緊縮性ハイブリッド形成及び洗浄条件下で起こる。このような核酸分子は、ここで同定される増幅された遺伝子のアンチセンス分子として作用でき、また翻って各増幅遺伝子の転写及び／又は翻訳の変調において、又は増幅反応におけるアンチセンスプライマーとしての用途が見出される。さらに、このような配列は、リボザイム (ribozyme) 及び／又は三重螺旋配列の一部として使用することができ、それは翻って増幅遺伝子の調節において使用してもよい。

30

他の実施態様では、本発明は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを含有すると推測される試料中でPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチ

40

50

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

【0008】

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

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

【0009】

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

さらに他の実施態様では、本発明は腫瘍細胞の成長を阻害する方法に関し、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO3

13、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを発現する腫瘍細胞を、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの生物学的及び／又は免疫学的活性及び／又は発現を阻害する薬剤の有効量に暴露することを含んでなり、それにより当該腫瘍細胞の成長が阻害される。この薬剤は、好ましくは抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体、小さな有機及び無機分子、ペプチド、リンペプチド、アンチセンス又はリボザイム分子、又は三重螺旋分子である。特別な態様では、薬剤、例えば抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体は細胞死を誘発する。さらなる態様では、腫瘍細胞には、放射線処理、細胞毒性薬又は化学治療薬がさらに施される。

【0010】

さらなる実施態様では、本発明は、
容器；

当該容器上のラベル；及び

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

性及び／又は発現を阻害する薬剤である。好ましい態様では、活性剤は抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体又はアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0011】

また本発明は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの生物学的又は免疫学的活性を阻害する化合物を同定する方法を提供し、候補化合物をPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドと、2つの成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間で接触させ、前記PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの生物学的及び／又は免疫学的活性が阻害されるか否かを測定することを含んでなる。特別な態様では、候補化合物又はPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドのいずれかが固体支持体上に固定化される。他の態様では、非固定化成分が検出可能な標識を担持している。好ましい態様では、この方法は、(a)細胞とスクリーニングすべき候補化合物とを、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの存在下で、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、

10

20

30

40

50

PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ、そして(b)前記細胞性反応の誘発を測定して試験化合物が有効なアンタゴニストか否かを決定することを含んでなる。

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

【0012】

B. さらなる実施態様

本発明の他の実施態様では、当該発明は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離された核酸分子を提供する。

一態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示する全長アミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に同定された他の断片を持つPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PR

PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の補体に対して、少なくとも約80%の配列同一性、好ましくは少なくとも約81%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約82%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約83%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約84%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約85%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約86%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約87%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約88%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約89%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約91%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約92%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約93%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約94%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約95%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約96%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約97%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約98%の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

10

【0013】

他の態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示する全長PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドcDNAコード化配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの細胞外ドメインのコード化配列、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に同定された他の断片のコード化配列を持つDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の補体に対して、少なくとも約80%の配列同一性、好ましくは少なくとも約81%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約82%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約83%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約84%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約85%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約86%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約87%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約88%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約89%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約91%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約92%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約93%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約94%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約95%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約96%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約97%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約98%の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

20

30

40

50

９５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約９９％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【００１４】

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

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインが欠失しているか又は膜貫通ドメインが不活性化されているPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、又はそのようなコード化ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供し、そのようなポリペプチドの膜貫通ドメインはここに開示される。従って、ここに記載されるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考慮される。

【００１５】

他の実施態様はPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドコード化配列の断片、又はその補体に向けられ、それらは、例えば、場合によっては抗PRO197、抗PRO207、抗PRO226、抗PRO232、抗PRO243、抗PRO256、抗PRO269、抗PRO274、抗PRO304、抗PRO339、抗PRO1558、抗PRO779、抗PRO1185、抗PRO1245、

抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、
抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-P
RO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO86
1、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO356
2、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO498
0抗体に対する結合部位を含むポリペプチドをコードしてもよいPRO197、PRO2
07、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PR
O274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO118
5、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO716
8、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PR 10
O342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO168
6、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316
又はPRO4980ポリペプチドのコード化断片のハイブリッド形成プローブとして、又
はアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとしての用途が見いだされる。このような核
酸断片は、通常は少なくとも約20ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも約30ヌクレ
オチド長、より好ましくは少なくとも約40ヌクレオチド長、より好ましくは少なく
とも約50ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約60ヌクレオチド長、より好ま
しくは少なくとも約70ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約80ヌクレオチド長、
より好ましくは少なくとも約90ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約100ヌ
クレオチド長、より好ましくは少なくとも約110ヌクレオチド長、より好ましくは少な
くとも約120ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約130ヌクレオチド長、よ
り好ましくは少なくとも約140ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約150ヌ
クレオチド長、より好ましくは少なくとも約160ヌクレオチド長、より好ましくは少な
くとも約170ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約180ヌクレオチド長、よ
り好ましくは少なくとも約190ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約200ヌ
クレオチド長、より好ましくは少なくとも約250ヌクレオチド長、より好ましくは少な
くとも約300ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約350ヌクレオチド長、よ
り好ましくは少なくとも約400ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約450ヌ
クレオチド長、より好ましくは少なくとも約500ヌクレオチド長、より好ましくは少な
くとも約600ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約700ヌクレオチド長、よ
り好ましくは少なくとも約800ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約900ヌ
クレオチド長、より好ましくは少なくとも約1000ヌクレオチド長であり、ここで「約
」という語の内容は参照する長さのプラス又はマイナス10%のヌクレオチド配列長を指
すことを意味する。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO
243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、P
RO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PR
O5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO
206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、P
RO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PR
O9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドコード化ヌ 40
クレオチド配列の新規な断片は、多くの良く知られた配列アラインメントプログラムの任
意のものを用いてPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO2
43、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PR
O1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO
5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO2
06、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PR
O861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO
9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドコード化ヌク
レオチド配列と他の公知のヌクレオチド配列とを整列させ、いずれのPRO197、PR
O207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、 50

PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することにより、日常的な手法で同定してもよい。このようなPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド断片によってコードされるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド断片、好ましくは抗-PRO655、抗-PRO364又は抗-PRO344抗体に対する結合部位を含むPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド断片、好ましくは抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体に対する結合部位を含むPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド断片も考慮される。

【0016】

他の実施態様では、本発明は、上記で特定された単離された核酸配列の任意のものにコードされる単離されたPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PR

PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを提供する。

或る態様では、本発明は、ここに開示する全長アミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に同定された他の断片を持つPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに対して少なくとも約80%の配列同一性、好ましくは少なくとも約81%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約82%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約83%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約84%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約85%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約86%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約87%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約88%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約89%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約91%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約92%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約93%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約94%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約95%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約96%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約97%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約98%の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに関する。

【0017】

さらなる態様では、本発明は、ここに開示するATCCに寄託されたヒトタンパク質cDNAの任意のものにコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも約80%の配列同一性、好ましくは少なくとも約81%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約82%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約83%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約84%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約85%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約86%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約87%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約88%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約89%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約91%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約92%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約93%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約94%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約95%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約96%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約97%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約98%の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、

PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに関する。

【0018】

さらなる態様では、本発明は、ここに開示する全長アミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に同定された他の断片を持つPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドと比較したときに、少なくとも約80%ポジティブ、好ましくは少なくとも約81%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約82%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約83%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約84%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約85%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約86%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約87%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約88%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約89%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約90%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約91%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約92%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約93%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約94%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約95%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約96%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約97%ポジティブ、より好ましくは少なくとも約98%ポジティブ、そして、より好ましくは少なくとも約99%ポジティブのスコアとされるアミノ酸配列を含む単離されたPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに関する。

【0019】

特別な実施態様では、本発明は、N-末端シグナル配列及び／又は開始メチオニンを持たず、上記したようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされる単離されたPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを提供する。それらを製造する方法もここに記載され、それらの方法は、適当なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞をPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PR

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

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインの欠失した又は膜貫通ドメインが不活性化された、単離されたPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを提供する。それらを製造する方法もここに記載され、それらの方法は、適当なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞をPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、培養培地からPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを回収することを含む。

【0020】

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

RO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体又は小分子である。

さらなる実施態様では、本発明は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドのアゴニストを同定する方法に関し、それは、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを候補分子と接触させ、前記PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドによって媒介される生物学的活性を監視することを含む。好ましくは、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドは天然PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドである。

10

20

30

40

【0021】

さらに他の実施態様では、本発明は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド、又はここに記載するPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO3

50

39、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドのアンタゴニスト、又は抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体を、担体と組み合わせて含有する物質の組成物に関する。場合によっては、担体は製薬的に許容される担体である。

本発明の他の実施態様は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド、又は上記したようなそのアンタゴニスト、又は抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体の、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド、そのアンタゴニスト又は抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体に起因する状態の治療において有用な医薬の調製のための使用に向けられる。

【0022】

本発明の他の実施態様では、本発明は、ここに記載するポリペプチドの任意のものをコードするDNAを含むベクターを提供する。そのようなベクターの任意のものを含む宿主細

10

20

30

40

50

胞も提供される。例として、宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又はバキュロウイルス感染昆虫細胞であってよい。ここに記載する任意のポリペプチドの製造方法がさらに提供され、それは、宿主細胞を所望のポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培地から所望のポリペプチドを回収することを含む。

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

他の実施態様では、本発明は、上記又は下記のポリペプチドの任意のものに特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片又は一本鎖抗体である。 10

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

【0023】

(好適な実施態様の詳細な説明)

I. 定義

「遺伝子増幅」及び「遺伝子複製」なる語句は交換可能に用いられ、遺伝子又は遺伝子断片の複数のコピーが特定の細胞又は細胞系で生成されるプロセスを意味する。複製された領域（増幅されたDNAの伸展）は、しばしば「単位複製配列」と呼ばれる。通常は、生成されるメッセンジャーRNA（mRNA）の量、即ち遺伝子発現レベルも、発現された特定遺伝子の作成されたコピー数に比例して増加する。 20

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

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、腺癌、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより特定の例には、乳癌、前立腺癌、大腸癌、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸管癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、結腸直腸癌、子宮体癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝癌及び様々な種類の頭部及び頸部の癌が含まれる。 30

「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。 40

【0024】

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

ここで用いられる「担体」は製薬的に許容される担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、それらは、用いられる用量及び濃度でそれに暴露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容される担体は、pH緩衝水溶液であることが多い。生理学的に許容される担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸バッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリ 50

マー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノース又はデキストラン等の単糖類、二糖類及び他の炭水化物；EDTA等のキレート化剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の自己形成対イオン；及び／又はTWEEN（商品名）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（商品名）等の非イオン性界面活性剤を含む。

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

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

10

【0025】

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

20

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

30

40

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

【0026】

「サイトカイン」なる用語は、1つの細胞集団から放出され、他の細胞に細胞間メディエーター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

50

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

この出願で用いられる用語「プロドラッグ」は、親薬剤に比較して腫瘍細胞に対する細胞毒性が低く、酵素的に活性化又はより活性な親形態に変換される製薬的活性物質の前駆体又は誘導体形態を意味する。例えば、Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」, Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting, Belfast (1986), 及びStella等, 「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」, Directed Drug delivery, Borchardt等（編）, pp. 147-267, Human Press (1985) 参照。本発明のプロドラッグは、これらに限られないが、ホスファート含有プロドラッグ、チオホスファート含有プロドラッグ、スルファート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸変性プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、 β -ラクタム含有プロドラッグ、任意に置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ又は任意に置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、より活性のある細胞毒のない薬剤に転換可能な5-フルオロシトシン及び他の5-フルオロウリジンプロドラッグを含む。限定するものではないが、本発明で使用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。

【0027】

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

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

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

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

【0028】

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

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

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

【0029】

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

レオチドは、本発明で考慮される。

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

【0030】

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

さらに、表2A-2Dは、ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを使用して%アミノ酸同一性（表2A-2B）及び%核酸配列同一性（表2C-2D）を決定する後述の方法を使用するための仮説的例示を示し、「PRO」とは対象とする仮のPROポリペプチドのアミノ酸配列を意味し、「比較タンパク質」とは対象とする「PRO」ポリペプチドと比較されるポリペプチドのアミノ酸配列を意味し、「PRO-DNA」とは、対象とする仮のPRO-コード化核酸配列を意味し、「比較DNA」とは対象とする「PRO-DNA」核酸分子と比較される核酸分子のヌクレオチド配列を意味し、「X」、「Y」、及び「Z」は各々異なる仮のアミノ酸配列、そして「N」、「L」及び「V」は各々異なる仮のヌクレオチド配列を意味する。

【0031】

表1

```

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

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

```

10

20

表1(続き)

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

10

20

30

表1(続き)

```

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

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

static _pbval[26] = {
    1, 2 | (1 < (<('D'-'A')) | (1 < (<('N'-'A'))), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 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 */

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

```

10

20

main

30

40

表1(続き)

```

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

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

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

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

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

```

nw

10

20

30

40

表1(続き)

...nw

```

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

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

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

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

```

10

20

30

表1(続き)

...nw

```

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

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

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

#include "nw.h"

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

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

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

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

```

10

print

20

30

表 1(続き)

```

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

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

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

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

```

getmat

10

20

30

40

表1(続き)

```

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

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

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

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

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

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

```

...getmat

10

20

30

pr_align

40

表1(続き)

```

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

        more++;

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

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

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

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

```

...pr_align

10

20

30

dumpblock

40

...dumpblock

40

nums

putline

表1(続き)

```

int          i;
register char *px;

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

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

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

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

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

```

...putline

stars

表1(続き)

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

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

stripname

表1(続き)

```

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

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

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

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

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

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

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

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

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

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

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

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

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

```

...getseq

10

g_alloc

20

readjmps

30

40

表1(続き)

...readjumps

```

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

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

```

表1(続き)

```

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

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

```

writejumps

10

【 0 0 3 2 】

表2A

20

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

% アミノ酸配列同一性 =

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

30

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

表2B

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

% アミノ酸配列同一性 =

40

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

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

表 2C

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

% 核酸配列同一性 =

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

10

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

表 2D

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

% 核酸配列同一性 =

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

20

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

【0033】

ここに定義されるPROポリペプチドに対してここで同定されている「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、PRO配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNA STAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが以下の表1に与えられている配列比較プログラムALIGN-2を用いても得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、以下の表1に示したソースコードは米国著作権庁、Washington D. C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、South San Francisco, Californiaから好適に入手可能であり、また以下の表1に与えたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標)V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

30

40

50

ここでの目的のためには、与えられたアミノ酸配列 A の、与えられたアミノ酸配列 B との、又はそれに対する % アミノ酸配列同一性（あるいは、与えられたアミノ酸配列 B と、又はそれに対して或る程度の % アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列 A と言うこともできる）は次のように計算される：分率 X/Y の 100 倍

ここで、 X は配列アラインメントプログラム `ALIGN-2` の A 及び B のアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、 Y は B の全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さとは異なる場合、A の B に対する % アミノ酸配列同一性は、B の A に対する % アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた % アミノ酸配列同一性の計算の例として、表 2 A と 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。

10

【0034】

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

20

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

分率 X/Y の 100 倍

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

30

さらに、% アミノ酸配列同一性値は、`WU-BLAST-2` コンピュータプログラム (`Altschul` 等, `Methods in Enzymology` 266: 460-480 (1996)) を用いて決定してもよい。殆どの `WU-BLAST-2` 検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：`オーバーラップスパン=1`、`オーバーラップフラクション=0.125`、`ワード閾値(T)=11`、及びスコアリングマトリクス=`BLOSUM62`。ここでの目的のためには、% アミノ酸配列同一性値は、(a) 天然 PRO ポリペプチドから誘導された配列を有する対象とする PRO ポリペプチドのアミノ酸配列と、対象とする比較アミノ酸配列（即ち、対象とする PRO ポリペプチドが比較される PRO ポリペプチド変異体であってもよい配列）との間の、`WU-BLAST-2` によって決定した一致する同一アミノ酸残基の数を、(b) 対象とする PRO ポリペプチドの残基の総数で除した商によって決定される。例えば、「アミノ酸配列 B に対して少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を持つ又は持っているアミノ酸配列 A を含んでなるポリペプチド」という表現では、アミノ酸配列 A が対象とする比較アミノ酸配列であり、アミノ酸配列 B が対象とする PRO ポリペプチドのアミノ酸配列である。

40

【0035】

50

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

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

【0036】

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

好ましくはデジタルUNIX（登録商標） V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0037】

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

分率W/Zの100倍

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

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

【0038】

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

分率W/Zの100倍

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

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

酸配列 A を含んでなる単離された核酸分子」という表現では、核酸配列 A が対象とする比較核酸配列であり、核酸配列 B が対象とする P R O ポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

【0039】

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

【0040】

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

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

分率 X/Y の 100 倍

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

【0041】

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために使用するときには、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたポリペプチドを意味する。好ましくは、単離されたポリペプチドは、それに天然に付随する全ての成分を伴わない。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、(1) スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも 15 残基の N 末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(2) クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下での S D S - P A G E 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、P R O ポリペプチドの自然環境の少なくとも 1 つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのタンパク質が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも 1 つの精製工程により調製される。

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

10

【0042】

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

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

20

【0043】

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

30

40

50

58、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体、及び抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体の断片を包含している（下記参照）。ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団、すなわち、構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である集団から得られる抗体を称する。

【0044】

ハイブリッド形成反応の「緊縮性」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度は低くなる。ハイブリッド形成は、一般的に、相補的鎖がその融点に近いがそれより低い環境に存在する場合における変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリッド形成可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をより緊縮性にするが、低い温度は緊縮性を低下させる。さらに、緊縮性は塩濃度に逆比例する。ハイブリッド形成反応の緊縮性の更なる詳細及び説明は、Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。ここで定義される「緊縮性条件」又は「高度の緊縮性条件」は、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温度、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デンハート液、超音波処理サケ精子DNA (50µg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストラン硫酸と、42℃における0.2xSSC (塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム) 中の洗浄及び55℃での50%ホルムアミド、次いで55℃におけるEDTAを含む0.1xSSCからなる高緊縮性洗浄を用いるものによって同定される。

「中程度の緊縮性条件」は、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989に記載されているように同定され、上記の緊縮性より低い洗浄溶液及びハイブリッド形成条件（例えば、温度、イオン強度及び%SDS）の使用を含む。中程度の緊縮性条件は、20%ホルムアミド、5xSSC (150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム (pH7.6)、5xデンハート液、10%デキストラン硫酸、

及び20mg/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。

【0045】

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

【0046】

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

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

【0047】

10

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

20

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

30

【0048】

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

40

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

50

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

【0049】

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

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

「小分子」は、ここで約500ダルトン未満の分子量を有すると定義される。

【0050】

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

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

【0051】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域又は相補性決定領域(CDRs)と呼ばれる3つ又は4つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク(FR)領域と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、 β -シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、CDRにより連結された β -シート配置を主にとる4つ又5つのFR領域をそれぞれ含んでいる。各鎖のCDRは、FRにより近接して結合せしめられ、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, 647-669頁[1991]を参照のこと)。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞毒性活性への抗体の関与を示す。

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

【0052】

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

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

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

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

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、免疫グロブリンは異なるクラスに分けられる。免疫グロブリンの5つの主要なクラス：I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g Mがあり、これらの幾つかは、更にサブクラス（アイソタイプ）、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A及びI g A 2に分けられる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、各々α、δ、ε、γ、及びμと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元配置は良く知られている。

【0053】

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

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

10

20

30

40

50

一部が特定の種から誘導された又は特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同であるが、鎖の残りの部分は他の種から誘導された又は特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同である抗体、並びにそれらが所望のお生物学的活性を示す限りにおいてそれらの抗体の断片である（米国特許第4, 816, 567号；Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 [1984]）。

【0054】

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小配列を含有する特定のキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はそれらの断片（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ あるいは抗体の他の抗原結合性配列）である。大部分において、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であって、そのレシピエントの相補性決定領域（CDR）が、マウス、ラット、ヤギなどのヒト以外の種のCDR（ドナー抗体）に由来する所望の特異性、親和性及び容量を持つ残基で置換されている。ある場合は、ヒト免疫グロブリンのFvFR枠残基が対応する非ヒト残基で置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、輸入されるCDR又は枠配列にも見られない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに精密かつ最適化するために施される。一般にヒト化抗体は、CDR領域の全て又は実質上全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全て又は実質上全てがヒト免疫グロブリン共通配列のものである少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含有するであろう。また、最適なヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部も含有するであろう。さらなる詳細については、Jones等, Nature 321: 522-525 (1986)；Reichmann等, Nature 332: 323-329 (1988)；Presta, Curr. Op. struct. Biol. 2: 593-596 (1992)を参照のこと。ヒト化抗体は、抗体の抗原結合領域が、関心のある抗原でマカクザルを免疫化することにより生産された抗体から由来するプリマタイズしたPRIMATIZED（商品名）抗体を含む。

【0055】

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

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

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

10

20

30

40

50

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

【0056】

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

10

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

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

20

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

30

【0057】

II. 本発明の組成物と方法

40

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

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

50

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

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

【0058】

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

ここに記載した全長天然配列PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドポリペプチドに加えて、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980変異体も調製できると考えられる。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980変異体は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを合成することにより調製できる。当業者は、グリコシル化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などのアミノ酸変化がPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の翻訳後プロセスを

変えうることを理解するであろう。

【0059】

天然全長配列PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980又はここに記載したPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第5,364,934号に記載されている保存的及び非保存的変異についての技術及び指針の任意のものをを用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980と比較してPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980のアミノ酸配列が変化する、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも1つのアミノ酸のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換による。いずれのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO12

45、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸の類似した構造及び／又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては1から5のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、得られた変異体を全長又は成熟天然タンパク質によって提示された活性について試験することにより決定される。

10

【0060】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド断片がここに提供される。このような断片は、例えば、全長天然タンパク質と比較した際に、N-末端又はC-末端で切断されてもよく、又は内部残基を欠いていてもよい。或る種の断片は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの所望の生物学的活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980断片は、多くの従来技術の任意のものによって調製してよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法是、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基によって決定される部位のタンパク質を切断することが知られた酵素でタンパク質を処理することにより、あるいは適当な制限酵素でDNAを消化して所望の断片を単離することによるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980断片の生成を含む。さらに他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、所望のポリペプチド断片をコードするDNA断片を単離し増幅することを含む。DNA断片の所望の末端を決定するオリゴヌクレオチドは、PCRの5'及び3'プライマーで用いられる。好ましくは、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PR

20

30

40

50

0339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド断片は、天然のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドと少なくとも1つの生物学的及び／又は免疫学的活性を共有する。

【0061】

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

表3

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

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

10

20

30

40

50

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

【0062】

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

変異は、オリゴヌクレオチド媒介（部位特異的）突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びPCR突然変異誘発 [Carter等, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [Wells等, Gene, 34: 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発 [Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317: 415 (1986)] 等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができ、又は他の知られた技術をクローニングしたDNAに実施してPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980変異体DNAを作成することもできる。

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

【0063】

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

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO

1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一例は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの選択された側鎖又はN-又はC-末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることである。二官能性試薬での誘導体化が、例えばPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を水不溶性支持体マトリクスあるいは抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO206、抗-PRO264、抗-PRO313、抗-PRO342、抗-PRO542、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体の精製方法又はその逆で用いるための表面に架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、1, 1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸、3, 3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬を含む。

【0064】

他の修飾は、グルタミル及びアスパラギン残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチルへの脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖のα-アミノ基のメチル化[T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)]、N-末端アミンのアセチル化、及び任意のC-末端カルボキシル基のアミド化を含む。本発明の範囲内に含まれるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO33

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

【0065】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴ってもよい。この変更は、例えば、1又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980（O-結合グリコシル化部位）への付加、又は置換によってなされてもよい。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980アミノ酸配列は、場合によっては、DNAレベルでの変化、特に、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO

269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることを通して変更されてもよい。

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

【0066】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987)により、及びEdge等, Anal. Biochem., 118: 131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, Meth. Enzymol. 138: 350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の共有結合的修飾の他の型は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つ

への、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。

また、本発明のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドは、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。

【0067】

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PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980との融合を含む。エピトープタグは、一般的にはPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980のアミノー又はカルボキシル末端に位置する。このようなPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980のエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の

16又はPRO4980を容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリーヒスチジン (poly-His) 又はポリーヒスチジン-グリシン (poly-His-gly) タグ; flu-HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Field等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; 及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD) タグ及びその抗体 [Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)] を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; KT3エピトープペプチド [Martin等, Science, 255:192-194 (1992)]; α -チューブリンエピトープペプチド [Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; 及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)] を含む。

【0068】

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

【0069】

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

、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することによりPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を調製することができると考えられる。例えば、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい〔例えば、Stewart等，Solid-Phase Peptide Synthesis，W. H. Freeman Co.，San Francisco，CA（1969）；Merrifield，J. Am. Chem. Soc.，85：2149-2154（1963）参照〕。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機（Foster City，CA）を用いて、製造者の指示により実施してもよい。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて全長PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を生産してもよい。

【0070】

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

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

【0071】

ライブラリは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ（PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに対する抗体又は少なくとも約20-80塩基のオリゴヌクレオチド等）によってス

クリーニングできる。選択されたプローブによるcDNA又はゲノムライブラリのスクリーニングは、例えばSambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードする遺伝子を単離する他の方法はPCR法を使用するものである[Sambrook等, 上掲; Dieffenbach等, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

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

このようなライブラリ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。分子の決定された領域内又は全長に渡っての(アミノ酸又は核酸レベルのいずれかでの)配列同一性は、この分野で知られた、そしてここに記載した方法を用いて決定することができる。

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

【0072】

b. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980生産のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコル、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler編 (IRL Press, 1991)及びSambrook等, 上掲に見出すことができる。

原核生物細胞形質移入及び真核生物細胞形質移入の方法、例えば、 CaCl_2 、 CaPO_4 、リボソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲の Sambrook 等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shaw 等, Gene, 23:315 (1983) 及び 1989 年 6 月 29 日公開の WO 89/05859 に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham 及び van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978) のリン酸カルシウム沈降法が好ましい。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第 4,399,216 号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van solingen 等, J. Bact., 130:946 (1977) 及び Hsiao 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979) の方法に従って実施される。しかしながら、DNA を細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown 等, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) 及び Mansour 等, Nature, 336:348-352 (1988) を参照のこと。

10

20

【0073】

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

30

40

【0074】

50

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、PRO197-、PRO207-、PRO226-、PRO232-、PRO243-、PRO256-、PRO269-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO206-、PRO264-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO773-、PRO861-、PRO1216-、PRO1686-、PRO1800-、PRO3562-、PRO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO4980-コード化バクターのための適切なクロニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレビシアは、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プ (*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 (*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4, 943, 529号; Fleer等, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991))、例えばケーラクチス (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt等, J. Bacteriol. 737 [1983])、ケーフラギリス (*K. fragilis*) (ATCC 12, 424)、ケーブルガリクス (*K. bulgaricus*) (ATCC 16, 045)、ケーウィケラミイ (*K. wickerhamii*) (ATCC 24, 178)、ケーワルチイ (*K. waltii*) (ATCC 56, 500)、ケードロソフィラルム (*K. drosophil arum*) (ATCC 36, 906; Van den Berg等, Bio/Technology, 8: 135 (1990))、ケーテモトレランス (*K. the motolerans*) 及びケーマルキシアナス (*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、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム (*Tolypocladium*) (1991年1月10日発行のWO 91/00357); 及びコウジ菌、例えば偽巢性コウジ菌 (Ballance等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilburn等, Gene, 26: 205-221 [1983]; Yelton等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) 及びクロカビ (Kelly及びHynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985]) が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック (methylootropic) 酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ (*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 Methylo trophs, 269 (1982) に記載されている。グリコシル化PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、

PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエS2及びスポドスペラSf9等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)及びCOS細胞を含む。より詳細な例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen. Virol., 36:59 (1977)); チャイニーズハムスター卵巣細胞/DHFR(CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)) ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065); 及びマウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATTC CCL 51)を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

【0075】

c. 複製可能なベクターの選択及び使用

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

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980は直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるPRO197-、PRO207-、PRO226-、PRO232-、PRO243-、PRO256-、PRO269-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO206-、PRO264-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO773-、PRO861-、PRO1216-、PRO168

6-、PRO1800-、PRO3562-、PRO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO4980-コード化DNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インペルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（酵母菌属（*Saccharomyces*）及びクルイベロマイシス（*Kluyveromyces*） α 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている）、又は酸ホスファターゼリーダー、白体（*C. albicans*）グルコアミラーゼリーダー（1990年4月4日発行のEP362179）、又は1990年11月15日に公開されたWO 90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【0076】

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

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、（a）アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、（b）栄養要求性欠陥を補い、又は（c）例えばバシリに対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。哺乳動物細胞に適切な選べるマーカーの例は、DHFRあるいはチミジンキナーゼのように、PRO197-、PRO207-、PRO226-、PRO232-、PRO243-、PRO256-、PRO269-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO206-、PRO264-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO773-、PRO861-、PRO1216-、PRO1686-、PRO1800-、PRO3562-、PRO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO4980-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub等により、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216（1980）に記載されているようにして調製され増殖されたDHFR活性に欠陥のあるCHO株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である[Stinchcomb等, Nature, 282:39（1979）；Kingman等, Gene, 7:141（1979）；Tschemper等, Gene, 10:157（1980）]。trp1遺伝子は、例えば、ATCC番号44076あるいはPEP4-1のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する[Jones, Genetics, 85:12（1977）]。

【0077】

発現及びクローニングベクターは、通常、PRO197-、PRO207-、PRO226-、PRO232-、PRO243-、PRO256-、PRO269-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO206-、PRO26

4-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO773-、PRO861-、PRO1216-、PRO1686-、PRO1800-、PRO3562-、PRO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO4980-コード化核酸配列に作用可能に結合し、mRNA合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識される好適なプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは β -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 [Cahng等, Nature, 275:615 (1978); Goeddel等, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36, 776]、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーター [deBoer等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]を含む。細菌系で使用するプロモーターもまたPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードするDNAと作用可能に結合したシャイン-ダルガーノ (S. D.) 配列を有する。

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

【0078】

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

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス (1989年7月5日公開のUK 2, 211, 504)、アデノウィルス (例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びサルウィルス40 (SV40) のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

【0079】

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

また真核生物宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞）に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養でのPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei等, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060; 及びEP 117,058に記載されている。

【0080】

d. 遺伝子増幅／発現の検出

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

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

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び／又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980DNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

10

20

30

40

50

【0081】

e. ポリペプチドの精製

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液 (例えばトリトン-X100) 又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

【0082】

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO25

6、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAEによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過；IgGのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラム；及びPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980のエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutcher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990)；Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の性質に依存する。

【0083】

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

本発明はある種の癌細胞で増幅される遺伝子の同定及び特徴付けに基づいている。

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

遺伝子増幅の現象及びそこに存在するメカニズムは、幾つかの原核及び真核生物細胞培養系でインビトロ実験されている。遺伝子増幅の最も特徴づけられた例は、種々の濃度の細

胞毒性薬メトトレキセート (MTX) を含有する培地での真核生物細胞の培養を含む。MTX は葉酸類似物であり酵素デヒドロフォレートレダクターゼ (DHFR) のブロックにより DNA 合成を妨害する。低濃度の MTX に最初に曝露すると殆どの細胞 (99.9%) が死亡する。少量の細胞は生き残り、多量の DHFR-RNA 及びタンパク質を生産することにより MTX 濃度を増加させても成長できる。この過剰生産の基礎は単一の DHFR 遺伝子の増幅である。遺伝子のさらなるコピーは、小さく過剰な染色体 (二重微小) の形態で染色体外コピーとして、又は一体化染色体コピーとして見られる。

【0084】

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

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

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

【0085】

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

遺伝子増幅の検出に最も感度の良い方法はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) ベースのアッセイである。これらのアッセイは極めて少量の腫瘍 DNA を出発材料として用い、精巧で

感度が良く、配列決定などの更なる分析に利用できるDNAを提供し、高容量スループット分析に適している。

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

【0086】

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

ヒト肺癌細胞系は、A549 (SRCC768)、Calu-1 (SRCC769)、Calu-6 (SRCC770)、H157 (SRCC771)、H441 (SRCC772)、H460 (SRCC773)、SKMES-1 (SRCC774)、SW900 (SRCC775)、H522 (SRCC832)、及びH810 (SRCC833)、を含み、全てATCCから入手可能である。原発ヒト肺腫瘍細胞は通常は腺癌、扁平上皮細胞癌、大細胞癌、非一小細胞癌、小細胞癌、及び気管支肺胞癌から誘導され、例えば、SRCC724 (「AdenoCa」と略記される腺癌) (LT1)、SRCC725 (「SqCCa」と略記される扁平上皮細胞癌) (LT1a)、SRCC726 (腺癌) (LT2)、SRCC727 (腺癌) (LT3)、SRCC728 (腺癌) (LT4)、SRCC729 (扁平上皮細胞癌) (LT6)、SRCC730 (腺／扁平上皮細胞癌) (LT7)、SRCC731 (腺癌) (LT9)、SRCC732 (扁平上皮細胞癌) (LT10)、SRCC733 (扁平上皮細胞癌) (LT11)、SRCC734 (腺癌) (LT12)、SRCC735 (腺／扁平上皮細胞癌) (LT13)、SRCC736 (扁平上皮細胞癌) (LT15)、SRCC737 (扁平上皮細胞癌) (LT16)、SRCC738 (扁平上皮細胞癌) (LT17)、SRCC739 (扁平上皮細胞癌) (LT18)、SRCC740 (扁平上皮細胞癌) (LT19)、SRCC741 (肺細胞癌、「LCCa」と略記) (LT21)、SRCC811 (腺癌) (LT22)、SRCC285 (腺癌) (LT8)、SRCC886 (腺癌) (LT25)、SRCC887 (扁平上皮細胞癌) (LT26)、SRCC888 (腺-BAC癌) (LT27)、SRCC889 (扁平上皮細胞癌) (LT28)、SRCC890 (扁平上皮細胞癌) (LT29)、SRCC891 (腺癌) (LT30)、SRCC892 (扁平上皮細胞癌) (LT31)、SRCC894 (腺癌) (LT33) を含む。また、SRCC1125 [HF-000631]、SRCC1127 [HF-000641]、SRCC1129 [HF-000643]、SRCC1133 [HF-000840]、SRCC1135 [HF-000842]、SRCC1227 [HF-001291]、SRCC1229 [HF-001293]、SRCC1230 [HF-001294]、SRCC1231 [HF-001295]、SRCC1232 [HF-001296]、SRCC1233 [HF-001297]、SRCC1235 [HF-001299]、及びSRCC1236 [HF-001300] と称されるヒト肺腫瘍も含まれる。

【0087】

大腸癌細胞系は、例えば、ATCC細胞系SW480 (腺癌、SRCC776)、SW620 (結腸腺癌のリンパ節転移、SRCC777)、Colo320 (癌、SRCC778)、HT29 (腺癌、SRCC779)、HM7 (ATCC大腸腺癌細胞系LS174Tの高ムチン産生変異体、SRCC780、Robert Warren博士、UCSFから得た)、CaWiDr (腺癌、SRCC781)、HCT116 (癌、SRCC782)、SKCO1 (腺癌、SRCC783)、SW403 (腺癌、SRCC784)、LS174T (癌、SRCC785)、Colo205 (癌、SRCC828)、HCT1

5 (癌、SRCC829)、HCC2998 (癌、SRCC830)、及びKM12 (癌、SRCC831)を含む。原発大腸腫瘍は、CT2 (SRCC742)、CT3 (SRCC743)、CT8 (SRCC744)、CT10 (SRCC745)、CT12 (SRCC746)、CT14 (SRCC747)、CT15 (SRCC748)、CT16 (SRCC749)、CT17 (SRCC750)、CT1 (SRCC751)、CT4 (SRCC752)、CT5 (SRCC753)、CT6 (SRCC754)、CT7 (SRCC755)、CT9 (SRCC756)、CT11 (SRCC757)、CT18 (SRCC758)、CT19 (腺癌、SRCC906)、CT20 (腺癌、SRCC907)、CT21 (腺癌、SRCC908)、CT22 (腺癌、SRCC909)、CT23 (腺癌、SRCC910)、CT24 (腺癌、SRCC911)、CT25 (腺癌、SRCC912)、CT26 (腺癌、SRCC913)、CT27 (腺癌、SRCC914)、CT28 (腺癌、SRCC915)、CT29 (腺癌、SRCC916)、CT30 (腺癌、SRCC917)、CT31 (腺癌、SRCC918)、CT32 (腺癌、SRCC919)、CT33 (腺癌、SRCC920)、CT35 (腺癌、SRCC921)、及びCT36 (腺癌、SRCC922)と称される大腸腺癌を含む。また、SRCC1051 [HF-000499]、SRCC1052 [HF-000539]、SRCC1053 [HF-000575]、SRCC1054 [HF-000698]、SRCC1059 [HF-000755]、SRCC1060 [HF-000756]、SRCC1142 [HF-000762]、SRCC1144 [HF-000789]、SRCC1146 [HF-000795] 及びSRCC1148 [HF-000811] と称されるヒト大腸腫瘍中心も含まれる。

【0088】

ヒト乳癌細胞系は、例えば、HBL100 (SRCC759)、MB435s (SRCC760)、T47D (SRCC761)、MB468 (SRCC762)、MB175 (SRCC763)、MB361 (SRCC764)、BT20 (SRCC765)、MCF7 (SRCC766) 及びSKBR3 (SRCC767)、及びSRCC1057 [HF-000545] と称されるヒト乳房腫瘍中心を含む。また、SRCC1094、SRCC1095、SRCC1096、SRCC1097、SRCC1098、SRCC1099、SRCC1100 及びSRCC1101 と称されるヒト乳房腫瘍、及びSRCC893 [LT32] と称されるヒト乳房-me t-肺-NS腫瘍も含まれる。

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

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

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

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

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

【0089】

F. 組織分布

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

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

二重鎖を含む特定の二重鎖を認識する抗体を用いてもよい。

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

【0090】

G. 染色体マッピング

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

【0091】

H. 抗体結合実験

遺伝子増幅実験の結果は、腫瘍（癌）細胞上でのPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの発現を阻害する抗PRO197、抗PRO207、抗PRO226、抗PRO232、抗PRO243、抗PRO256、抗PRO269、抗PRO274、抗PRO304、抗PRO339、抗PRO1558、抗PRO779、抗PRO1185、抗PRO1245、抗PRO1759、抗PRO5775、抗PRO7133、抗PRO7168、抗PRO5725、抗PRO202、抗PRO773、抗PRO861、抗PRO1216、抗PRO1686、抗PRO1800、抗PRO3562、抗PRO9850、抗PRO539、抗PRO4316又は抗PRO4980抗体の能力が試験される抗体結合実験によ

って更に確認できる。例示的な抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性、及びヘテロ抱合体抗体を含み、その調製は以下に記載する。

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

【0092】

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

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

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

【0093】

I. 細胞ベースの腫瘍アッセイ

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

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

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

【0094】

J. 動物モデル

腫瘍の進行及び原因におけるここに同定される遺伝子の役割を更に理解するために、そして抗体、及び小分子アゴニストを含む天然ポリペプチドの他のアゴニストを含む候補治療薬の有効性を試験するために、種々の良く知られた動物モデルが使用できる。これらのモ

10

20

30

40

50

デルのインビボ性質により、特にヒト患者における反応を予測できる。腫瘍及び癌（例えば、乳癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌など）の動物モデルは、非組換え及び組換え（トランスジェニック）動物の両方を含む。非組換え動物モデルは、例えば、齧歯類、例えばマウスモデルを含む。このようなモデルは、標準的な技術、例えば、皮下注射、尾部静脈注射、脾臓移植、腹膜内移植、腎被膜下移植、又はオルトピン（orthopin）移植、例えば大腸組織に移植された大腸癌細胞により、腫瘍細胞を同系マウスに導入することにより作成される。（1997年9月18日に発行されたPCT公報WO 97/33551参照。）

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

10

【0095】

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

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。

20

30

【0096】

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

40

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

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

50

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。

例えば、Met h A、CMS 4、CMS 5、CMS 21、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 10×10^6 から 10×10^7 細胞/mlの細胞密度で懸濁する。次いで動物を10から100 μ lの細胞懸濁物で皮下感染し、腫瘍が現れるまで1から3週間放置する。

【0097】

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

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、二次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、注意深く監視する必要がある。

【0098】

組換え(トランスジェニック)動物モデルは、ここに同定された遺伝子のコード部分を、トランスジェニック動物作成のための標準的技術を用いて、対象とする動物のゲノムに導入することにより加工できる。トランスジェニック動物は、「導入遺伝子」又は動物自体又は動物の祖先に出生前段階(例えば胚段階)でゲノムに導入された遺伝物質を有するものである。トランスジェニック操作の標的として提供できる動物は、限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、及び非ヒト霊長類、例えばヒヒ、チンパンジー及びサルを含む。これらの動物に導入遺伝子を導入するのにこの分野で知られた技術は、全核マイクロインジェクション(Hoppe及びWanger, 米国特許第4, 873, 191号); 胚系列へのレトロウイルス媒介遺伝子転移(例えば、Van der Putten等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]); 胚性肝細胞での遺伝子標的化(Thompson等, Cell 56, 313-321 [1989]); 胚のエレクトロポレーション(Lo, Mol. Cell. Biol. 3, 1803-181

4 [1983]) ; 精子媒介遺伝子転移 (L a v i t r a n o 等, C e l l 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。

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、L a s k o 等, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 89, 6232-636 (1992) の技術に従って可能である。トランスジェニック動物における導入遺伝子の発現は、標準的技術によって監視できる。例えば、導入遺伝子の組み込みの確認にサザンブロット分析又はPCR増幅が用いられる。次いで、mRNA発現のレベルは、インサイツハイブリッド形成、ノーザンブロット分析、PCR、又は免疫組織化学などの技術を用いて分析できる。動物は、腫瘍又は癌発生の徴候についてさらに試験される。 10

【0099】

あるいは、動物の胚性細胞に導入されたPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードする変更ゲノムDNAと、そのポリペプチドをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、ここに同定するPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードする欠陥又は変更遺伝子を有する「ノックアウト」動物を作成 20
することができる。例えば、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードするcDNAは、確立された技術に従い、当該ポリペプチドをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。特にPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部を欠失したり、組み込みを監視するために使用する選択可能なマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングDNA(5'と3'末端の両方)を数キロベース含む[例えば、相同的組換えベクターについてはThomas and Capecci, C e l l , 51: 503 (1987) を参照のこと]。ベクターは胚性 40
50

幹細胞に（例えばエレクトロポレーションによって）導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する〔例えば、Li等, Cell, 69: 915 (1992) 参照〕。選択された細胞は次に動物（例えばマウス又はラット）の胚盤胞内に注入され、集合キメラを形成する〔例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152 参照〕。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、「ノックアウト」動物を作ると言われる。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドが不在であることによるある種の病理的状态及び病理的状态の進行に対して防御する能力によって特徴付けられる。

10

20

30

40

50

【0100】

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

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

【0101】

K. 候補薬についてのスクリーニングアッセイ

候補薬のスクリーニングアッセイは、ここで同定される遺伝子にコードされるポリペプチドと結合又は抱合する化合物、あるいはコード化ポリペプチドと他の細胞性タンパク質との相互作用を阻害する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、特に小分子候補薬の同定に適したものにする、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングに従うアッセイを含む。小分子とは、合成有機又は無機化合物を含むと考え、それらは、ペプチド、好ましくは可溶性ペプチド、（ポリ）ペプチド-免疫グロブリン融合体、特に、限定されないが、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一

本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びそれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。アッセイは、種々の形式で実施でき、この分野で良く特徴付けられたタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ及び細胞ベースのアッセイを含む。

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

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

10

20

30

40

50

【0102】

候補化合物がここで同定される遺伝子にコードされる特定のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドと相互作用するが結合しない場合、その相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Fields及び共同研究者等[Fields及びSong, Nature (London) 340, 245-246 (1989); Chien等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991)]に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより、Chevray及びNathans [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)]に開示されているように監視することができる。酵母菌GAL4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-lacZリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、 β -ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定のタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット(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。

【0103】

ここで同定されるPRO197-、PRO207-、PRO226-、PRO232-、PRO243-、PRO256-、PRO269-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO206-、PRO264-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO773-、PRO861-、PRO1216-、PRO1686-、PRO1800-、PRO3562-、PRO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO4980-コード化配列と他の細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験することができる：通常は、増幅された遺伝子の生成物及び細胞内又は外成分を含む反応混合物を、条件下で2つの生成物が相互作用及び結合する時間に渡って調製する。試験化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物有り又は無しで実施する。さらに、第3の反応混合物にプラーシーボを添加してポジティブ対照としてもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は外成分との結合（複合体形成）は上記のように監視する。対照反応において複合体が形成され、試験化合物を含む反応混合物ではしないことは、試験化合物が試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を妨害することを示す。

【0104】

アンタゴニストを検定するために、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドを、特定の活性についてスクリーニングする化合物とともに細胞に添加してもよく、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド存在下で対象とする活性を阻害する当該化合物の能力が、当該化合物がPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド及び潜在的アンタゴニストを、膜結合PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO7

79、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドレセプター又は組換えレセプターと、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドは、放射活性等で標識でき、レセプターに結合したPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド分子の数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパンニング及びFACSソーティングにより同定できる。Coligan等、Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991)。好ましくは発現クローニングが用いられ、そこではポリアデニル化RNAがPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このRNAから生成されたcDNAライブラリがプールに分配され、COS細胞又は他のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに反応性でない細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を標識したPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドに暴露する。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO577

5、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的プロテインキナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフ分析を施す。ポジティブプールを同定し、相互作用サブプール化及び再スクリーニング工程を用いてサブプールを調製して再形質移入し、結果的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

【0105】

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

アンタゴニストの他の検定では、レセプターを発現する哺乳動物細胞又は膜調製物を、候補化合物の存在下で標識PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドとともにインキュベートする。次いで、この相互作用を促進又は阻止する化合物の能力を測定する。

【0106】

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンとPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリペプチドー及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イデオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが効果を与えず、よってPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1

686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの作用を競合的に阻害するPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの変異形態であってもよい。

【0107】

他の潜在的なPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスRNA又はDNA作成物であり、例えば、アンチセンスRNA又はDNAは、標的mRNAにハイブリッド形成してタンパク質翻訳を妨害することによりmRNAの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、トリプルヘリックス形成又はアンチセンスDNA又はRNAを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法はともに、ポリペプチドヌクレオチドのDNA又はRNAへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード化部分は、約10から40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドの設計に使用される。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され（三重螺旋—Lee等，Nuc l，Acid Res.，6：3073（1979）；Cooney等，Science，241：456（1988）；Der van等，Science，251：1360（1991）参照）、それによりPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはインビボでmRNAにハイブリッド形成してmRNA分子のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドへの翻訳を阻止す

10

20

30

40

50

る（アンチセンス—Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (SRS Press: Boca Raton, FL, 1988)）。また上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に輸送され、アンチセンスRNA又はDNAをインビボで発現させて、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの産生を阻害することもできる。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

【0108】

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

潜在的アンタゴニストは、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの活性部位、レセプター結合部位、又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それによりPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの正常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。

【0109】

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

転写阻害に用いられる三重螺旋形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介するトリプルヘリックス形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。さらなる詳細は、例えば、PCT公報、番号WO 97/33551、上掲を参照。これらの小分子は、上記で議論したスクリーニングアッセイの一又は複数の任意のものにより及び／又は当業者に良く知ら

れた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

【0110】

L. 腫瘍治療のための組成物及び方法

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

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

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

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

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

【0111】

M. 抗体

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

1. ポリクローナル抗体

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

【0112】

2. モノクローナル抗体

あるいは、抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1

10

20

30

40

50

185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体は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。

10

【0113】

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

20

30

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

40

【0114】

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

50

1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980に対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(RIA)や酵素結合免疫測定法(ELISA)等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキッチャード分析法によって測定することができる。

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

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

【0115】

また、モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作成することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常套的な方法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に配することができ、これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成などしない骨髓腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより[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産生することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

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

【0116】

3. ヒト及びヒト化抗体

抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PR

O 3 5 6 2、抗-PRO 9 8 5 0、抗-PRO 5 3 9、抗-PRO 4 3 1 6 又は抗-PRO 4 9 8 0 抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト（例えばマウス）抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片（例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列）であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体は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)〕。

10

20

30

40

50

【0117】

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

また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリ〔Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1992); Marks等, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)〕を含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作成することもできる。また、Cole等及びBoerner等の技術も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる〔Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) 及びBoerner等, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)〕。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、及び次の科学文献：Marks等, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg等, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13

(1994); Fishwild等, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)に記載されている。

【0118】

4. 抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法 (ADEPT)

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

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

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

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

【0119】

5. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本発明の場合において、結合特異

性の一方はPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980に対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

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

【0120】

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、CH2及びCH3領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合体をコードするDNA、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作成するための更なる詳細については、例えばSuresh等, Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。国際公開WO 96/27011号に記載された他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体のパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置換される。大きな側鎖と同じ又はより小さいサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(アラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモ二量体のような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

【0121】

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

大腸菌からFab'フラグメントを直接回収でき、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, J. Exp. Med., 175

10

20

30

40

50

: 217-225 (1992) は完全にヒト化された二重特異性抗体 $F(ab')_2$ 分子の製造を記述している。各 Fab' フラグメントは大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒト T 細胞及び ErbB2 レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

【0122】

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

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

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

【0123】

6. ヘテロ抱合体抗体

ヘテロ抱合抗体もまた本発明の範囲に入る。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ー 4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第 4, 6767, 980 号に開示されているものが含まれる。

【0124】

7. エフェクター機能の設計

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えばガンの治療における抗体の効能を増強することが望ましい。例えば、システイン残基を Fc 領域に導入して、この領域に

おける鎖間ジスル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。 10

【0125】

8. 免疫複合体

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

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬は上記した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、コレラ毒素、ボツリヌス毒素、（緑膿菌からの）外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン (modeccin) A鎖、アルファーサルシン、アレウリテス・フォーディ (Aleurites fordii) タンパク質、ジアンチン (dianthin) タンパク質、フィトラカ・アメリカナ (Phytolacca americana) タンパク質 (PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア (momordica charantia) インヒビター、クルシン (curcin)、クロチン (crotonin)、サパオナリア・オフィシナリス (sapaonaria officinalis) インヒビター、ゲロニン (gelonin)、ミトゲリン (mitogellin)、レストリクトシン (restrictocin)、フェノマイシン (phenomycin)、エノマイシン (enomycin) 及びトリコテセン (tricothecene) を含む。様々な放射性ヌクレオチドが放射性抱合抗体の生成に利用可能である。例として、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y及び¹⁸⁶Reを含む。 20 30

抗体及び細胞毒性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール) プロピオネート (SPDP)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル (ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド (グルタルアルデヒド等)、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)、ジオソシアネート (トリエン2, 6-ジオソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物 (1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン等) を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098 (1987) に記載されたように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。WO 94/11026 参照。 40

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

【0126】

9. 免疫リポソーム

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

ームは、Epstein等, Proc. Natl. acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang等, Proc. natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第4, 485, 045号及び第4, 544, 545号に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5, 013, 556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及び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。

【0127】

N. 製薬組成物

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

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

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

【0128】

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

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

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系
(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]に開示されている。インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

【0129】

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例は、ポリエステルヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール))、ポリアクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸及びγ-エチル-L-グルタメート、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOSIT(商品名)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リユープロリドの注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは37℃の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオージスルフィド交換を通した分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

【0130】

O. 治療方法

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

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

【0131】

他の治療的養生法を抗癌剤、例えば本発明の抗体の投与と組み合わせてもよい。例えば、このような抗癌剤で治療される患者は放射線治療を受けてもよい。あるいは、又はそれに加えて、患者に化学治療薬を投与してもよい。このような化学治療薬の調製法及び用量ス

ケジュールは、製造者の指示に従って使用されるか、熟練した実務者により経験的に決定される。そのような化学治療に対する調製法及び用量スケジュールはまたChemotherapy Service M. C. Perry編, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。化学治療薬は、本発明の抗腫瘍剤、例えば抗体の投与に先立って、又は続いて投与してもよく、あるいはそれらと同時に投与してもよい。本発明の抗体は、タモキシフェン等の抗エストロゲン化合物又はオナプリストンなどの抗プロゲステロン (EP 616812 参照) の、それらの分子について知られた用量と組み合わせてもよい。

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

【0132】

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

例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $15 \text{mg}/\text{kg}$ (例えば、 $0.1 - 20 \text{mg}/\text{kg}$) の抗体が、例えば、1 又はそれ以上の別々の投与あるいは連続注入のいずれにしても、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な1日の用量は、上記の要因に応じて、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $100 \text{mg}/\text{kg}$ 又はそれ以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。この治療の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易に監視される。

【0133】

P. 製造品

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

【0134】

Q. 腫瘍の診断及び予知

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

例えば、抗体断片を含む抗体は、増幅された遺伝子にコードされるタンパク質 (「マーカ一遺伝子産物」) の発現の定性的又は定量的検出に用いることができる。抗体は、好まし

くは検出可能な、例えば蛍光標識を備え、結合は光学顕微鏡、フローサイトメトリー、フルオロメトリー、又はこの分野で知られた他の技術によって監視できる。これらの技術は、増幅された遺伝子が細胞表面タンパク質、例えば成長因子をコードする場合に特に好ましい。このような結合アッセイは、上記5節に実質的に記載されたように実施される。マーカー遺伝子産物に結合する抗体のインサイツ検出は、例えば、免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡によって実施できる。この目的のために、組織学的試料を患者から取り出し、好ましくは生物学的試料に抗体を被せることにより、標識抗体をそれに適用する。この手法はまた、試験される組織におけるマーカー遺伝子産物の分布も決定できるようにする。当業者には、インサイツ検出のために広範な組織学的方法が容易に利用できることは明らかであろう。

10

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

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

【0135】

(実施例)

実施例で言及されている全ての他の市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC登録番号により以下の実施例及び明細書全体を通して特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801ユニヴァーシティー・ビルディング、マナッサス、VA20110-2209である。本出願で言及される全ての元の寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則（ブダペスト条約）の規定の下でなされた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、どれが最初であろうとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則（特に参照番号886OG638の37CFR第1.14条を含む）に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

20

特に記さない限り、本発明は上記及び以下の教科書に記載されたもののそのような組換えDNA技術の標準的な手法を用いた：Sambrook等，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press N. Y., 1989; Ausubel等，Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y., 1989; Innis等，PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., N. Y., 1990; Harlow等，Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988; Gait, Oligonucleotide synthesis, IRL Press, Oxford, 1984; R. I. Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan等，Current Protocols in Immunology, 1991。

30

40

【0136】

実施例1

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

Swiss-Prot公的データベースからの約950の既知の分泌タンパク質からの細胞外ドメイン（ECD）配列（もしあれば、分泌シグナル配列を含む）を、ESTデータベースの検索に使用した。ESTデータベースは、公的データベース（例えば、Dayh

50

off、GenBank) 及び企業のデータベース (例えば、L I F E S E Q (商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA) を含む。検索は、コンピュータプログラム BLAST 又は BLAST-2 (Altschul 等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)) を用いて、ECD タンパク質配列の EST 配列の 6 フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLAST スコア 70 (90 の場合もある) 又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, WA) で集団化してコンセンサス DNA 配列を構築した。

この細胞外ドメイン相同性スクリーニングを用いて、phrap を用いて他の同定された EST 配列に対してコンセンサス DNA 配列を構築した。さらに、得られたコンセンサス DNA 配列を、しばしば (常にではない) BLAST 又は BLAST-2 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。 10

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 ライブ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するプローブとして用いるために使用した。正方向及び逆方向 PCR プライマーは一般的に 20 から 30 ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約 100-1000 bp 長の PCR 産物を与えるために設計される。プローブ配列は、典型的に 40-55 bp 長である。幾つかの場合には、コンセンサス配列が約 1-1.5 kbp より大きいときに付加的なオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからの 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。ポジティブライブラリを、次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて対象とする遺伝子をコードするクローンの単離するのに使用した。 20

cDNA クローンの単離に用いた cDNA ライブラリは、Invitrogen, San Diego, CA からのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNA は、Not I 部位を含むオリゴ dT でプライムし、平滑末端で Sal I ヘミキナーゼアダプターに結合させ、Not I で切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター (pRKB 又は pRKD 等; pRK5B は Sfi I 部位を含まない pRK5D の前駆体である; Holmes 等, Science, 253: 1278-1280 (1991) 参照) に、独特の Xho I 及び Not I 部位において、所定の方向でクローニングした。 30

【0137】

実施例 2

シグナルアルゴリズム分析を用いた cDNA クローンの単離

種々のポリペプチド-コード化核酸配列は、ジェネンテック、インク (South San Francisco, CA) によって開発された独自の配列発見アルゴリズムを、公的 (例えば、GenBank) 及び/又は私的 (L I F E S E Q (登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA) データベースからの ESTs 並びに集団化及び構築された EST 断片に適用することにより同定した。シグナル配列アルゴリズムは、考慮している配列又は配列断片の 5' 末端の第 1 の、場合によっては第 2 のメチオニンコドン (ATG) を取り囲む DNA ヌクレオチドの文字に基づく分泌シグナルスコアを計算する。第 1 の ATG に続くヌクレオチドは、停止コドンを持たない少なくとも 35 の不明瞭でないアミノ酸をコードしなければならない。第 1 の ATG が必要なアミノ酸を有する場合、第 2 のものは試験しない。何れも要件を満たさない場合、候補配列にスコアをつけなかった。EST 配列が真正のシグナル配列を含むか否かを決定するために、ATG コドンを取り囲む DNA 及び対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られた 7 つのセンサー (評価パラメータ) の組 40 50

を用いてスコアをつけた。このアルゴリズムの使用により、多くのポリペプチドコード化核酸配列の同定がなされた。

【0138】

ヒトPRO197をコードするcDNAクローンの単離

PRO197は、コンピュータプログラムBLAST (Altschul等, Methods in Enzymology, 266: 460-480 (1996))を用いてGenBankデータベースをスクリーニングすることにより同定した。PRO197は、公知のEST配列T08223、AA122061、及びM62290と相同性を持つことが示された。全長として同定された、あるいはTIEレセプターに関連するリガンドとして記載された公知のESTは無い。同定に続いて、Clontech, Inc., (Palo Alto, CA) から購入したmRNA、カタログ番号6528-1から製造者の指示に従って調製したヒト胎児肺ライブラリからPRO197をクローニングした。ライブラリを、合成オリゴヌクレオチドプローブでのハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。

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

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

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

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

【0139】

cDNAクローンは、全体を同定して配列決定した。DNA22780-1078の全長ヌクレオチド配列をFig1 (配列番号：1) に示す。クローンDNA22780-1078は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置23-25に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置1382-1384に停止コドンを持つ (Fig1; 配列番号：1)。予測されるポリペプチド前駆体は453アミノ酸長である。全長PRO197タンパク質をFig2 (配列番号：2) に示す。

Fig2 (配列番号：2) に示した全長PRO197配列の解析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。Fig2に示した全長PRO197配列の解析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸51～約アミノ酸70の膜貫通ドメイン；約アミノ酸224～約アミノ酸228のN-グリコシル化部位；約アミノ酸46～約アミノ酸50及び約アミノ酸118～約アミノ酸122のcAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸50～約アミノ酸56、約アミノ酸129～約アミノ酸135、約アミノ酸341～約アミノ酸347、及び約アミノ酸357～約アミノ酸363のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸396～約アミノ酸409のフィブリノーゲンベータ及びガンマ鎖C-末端ドメインシグネチャー。

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

Fig2 (配列番号：2) に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース (バージョン35.45 SwissProt 35) の解析により、PRO197アミノ酸配列とTIEレセプターに関連するリガンドとの間の相同性が明らかになった。略語「TIE」は、「Ig及びEGF相同ドメインを含むチロシンキナーゼ」を意味する頭文字であり、レセプターチロシンキナーゼの新たなファミリーを表すために作られたものである。

【0140】

実施例4

ヒトPRO207をコードするcDNAの単離

10

20

30

40

50

発現配列タグ (EST) DNA データベース (L I F E S E Q (商品名)、I n c y t e
P h a r m a c e u t i c a l s、P a l o A l t o, C A) を検索し、A p o -
2 リガンドと相同性を持つ EST を同定した。そして、ヒト胎児腎臓 cDNA ライブラリ
ーのスクリーニングがおこなわれた。ヒト胎児腎臓組織 (C l o n t e c h) から単離さ
れた mRNA が cDNA ライブラリーの調製のために使用された。この RNA は、L i f e
T e c h n o l o g i e s, G a i t h e r s b u r g, M D (S u p e r
S c r i p t P l a s m i d S y s t e m) からの試薬及びプロトコルを用いるベ
クター p R K 5 D におけるオリゴ d T プライムした cDNA のライブラリーの作製に使用
した。この方法において、二本鎖 cDNA は 1000 bp を越えるサイズに分類され、S
a l I / N o t I 結合 cDNA を X h o I / N o t I 切断ベクターにクローニングした。 10
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 cDNA クローニング部位を持つクローニングベクターである。ライブラリーは
EST に基づいて下記の合成オリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションに
よってスクリーニングされた：

5' - C C A G C C C T C T G C G C T A C A A C C G C C A G A T C G G G G A G T T
T A T A G T C A C C C G G - 3' (配列番号：74)

cDNA クローンの全体が配列決定された。DNA 30879-1152 全長クローンは
、F i g 3 (配列番号：3) に示されている。クローン DNA 30879-1152 は、
単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 58-60 (F i g 3 ;
配列番号：3) に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置 805-807 20
に見かけの停止シグナルを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は 249 アミノ酸長であ
る。

F i g 4 (配列番号：4) に示された全長 PRO207 配列の分析により様々な重要なポ
リペプチドドメインの存在が明らかにされたが、それらの重要なポリペプチドドメインに
対して与えられる位置は上記のように概略である。全長 PRO207 配列 (F i g 4 ; 配
列番号：4) の分析により次のことが明らかにされた：約アミノ酸 1~約アミノ酸 40 の
シグナルペプチド、約アミノ酸 139~約アミノ酸 143 の N-グリコシル化部位、約ア
ミノ酸 27~約アミノ酸 33、約アミノ酸 29~約アミノ酸 35、約アミノ酸 36~約ア
ミノ酸 42、約アミノ酸 45~約アミノ酸 51、約アミノ酸 118~約アミノ酸 124、
約アミノ酸 121~約アミノ酸 127、約アミノ酸 125~約アミノ酸 131、約アミノ 30
酸 128~約アミノ酸 134 の N-ミリスチル化部位、約アミノ酸 10~約アミノ酸 1
4、約アミノ酸 97~約アミノ酸 101 のアミド化部位、約アミノ酸 24~約アミノ酸 3
5 の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位。クローン DNA 30879-1152 は 19
97 年 10 月 10 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 209358 が付与された
。

F i g 4 (配列番号：4) に示した PRO207 の全長配列の (A L I G N - 2 コンピュ
ータプログラムを用いた) B L A S T 及び F a s t A 配列アラインメント分析に基づく
、PRO207 は TNF サイトカインファミリーの幾つかのメンバーとアミノ酸配列同一
性を示し、特にヒトリンホトキシナー β (23.4%) 及びヒト CD40-リガンド (1
9.8%) を示す。 40

【0141】

実施例 5

ヒト PRO226 をコードする cDNA クローンの単離

実施例 1 に記載したように、p h r a p を用いて他の EST 配列に対してコンセンサス D
NA 配列を構築した。EGF 様相同体をコードするこの構築されたコンセンサス配列を、
ここで DNA 28744 と命名する。DNA 28744 コンセンサス配列に基づいて、1
) PCR により対象とする配列を含む cDNA ライブラリを同定するため、及び 2) P R
O 2 2 6 の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリ
ゴヌクレオチドを合成した。

PCR プライマー (正方向及び逆方向) を合成した： 50

正方向PCRプライマー（28744. f）（OLI556）：

5' - A T T C T G C G T G A A C A C T G A G G G C - 3'（配列番号：75）

逆方向PCRプライマー（28744. r）（OLI557）：

5' - A T C T G C T T G T A G C C C T C G G C A C - 3'（配列番号：76）

さらに、DNA 28744 コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリッド形成プローブ（28744. p）（OLI556）：

5' - C C T G G C T A T C A G C A G G T G G G C T C C A A G T G T C T C G A T G T G G A T G A G T G T G A - 3'（配列番号：77）

【0142】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でPCR増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマー対の一方を用いてPRO226遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリの構築のためのRNAはヒト胎児肺組織から単離した。

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

DNA 33460-1166の全コード化配列がFig 5（配列番号：5）に含まれる。クローンDNA 33460-1166は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置62-64に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置1391-1393に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は443アミノ酸長である。Fig 6（配列番号：6）に示した全長PRO344配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。Fig 6に示した全長PRO344ポリペプチドの分析により以下の存在が明らかになった：約アミノ酸1～約アミノ酸25のシグナルペプチド；約アミノ酸198～アミノ酸202、約アミノ酸394～約アミノ酸398のN-グリコシル化部位；約アミノ酸76～約アミノ酸82、約アミノ酸145～約アミノ酸151、約アミノ酸182～約アミノ酸188、約アミノ酸222～約アミノ酸228、約アミノ酸290～約アミノ酸296、約アミノ酸305～約アミノ酸311、約アミノ酸371～約アミノ酸377、約アミノ酸381～約アミノ酸387のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸140～約アミノ酸152、約アミノ酸177～約アミノ酸189、約アミノ酸217～約アミノ酸229及び約アミノ酸258～約アミノ酸270のアスパラギン酸及びアスパラギンヒドロキシル化部位。クローンDNA 33460-1166は1997年10月16日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209376が付与された。

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

【0143】

実施例 6

ヒトPRO232をコードするcDNAクローンの単離

実施例1に記載したように、phrapを用いて他のEST配列に対してコンセンサスDNA配列を構築した。この構築されたコンセンサス配列を、ここでDNA 30935と命名し、ポリペプチドは1又は複数の幹細胞抗原と類似性を示した。DNA 30935コンセンサス配列に基づいて、1) PCRにより対象とする配列を含むcDNAライブラリを同定するため、及び2) PRO232の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

PCRプライマー（正方向及び逆方向）を合成した：

10

20

30

40

50

正方向PCRプライマー：

5' - T G C T G T G C T A C T C C T G C A A A G C C C - 3' (配列番号：78)

逆方向PCRプライマー：

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

さらに、DNA30935コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリッド形成プローブ：

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

【0144】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でPCR増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマー対の一方を用いてPRO232遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリの構築のためのRNAはヒト胎児腎臓組織から単離した。

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、DNA34435-1140 [Fig 7、配列番号：7] の全長DNA配列；及びPRO232の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA34435-1140の全コード化配列がFig 7 (配列番号：7) に含まれる。クローンDNA34435-1140は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置359-361に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は119アミノ酸長である。Fig 8 (配列番号：8) に示した全長PRO344配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。Fig 8に示した全長PRO344ポリペプチドの分析により以下の存在が明らかになった：約アミノ酸1～約アミノ酸16のシグナルペプチド；約アミノ酸36～アミノ酸40、約アミノ酸79～約アミノ酸83約、及びアミノ酸89～約アミノ酸93のN-グリコシル化部位；約アミノ酸61～約アミノ酸67のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸75～約アミノ酸79のアミド化部位。クローンDNA34435-1140は1997年9月16日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209250が付与された。

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

【0145】

実施例7

ゲノム歩行によるヒトPRO243をコードするcDNAクローンの単離

序：

ヒトトロンプオエチン (THPO) は、2つのドメインからなる352アミノ酸のグリコシル化ホルモンである。N末端ドメインはエリスロポエチンと50%類似性を持ち、生物学的活性を担っている。C末端領域は分泌に必要とされる。トロンプオエチン (THPO) についての遺伝子はヒト染色体3q27-q28にマップされ、そこでこの遺伝子の6つのエクソンがゲノムDNAの7キロベース塩基対の橋を架けている (Gurney等、

Blood 85: 981-988 (1995))。THPOの直近に位置するTHPO相同体をコードする遺伝子が存在するか否かを決定するため、この領域からのゲノムDNA断片を同定して配列決定した。THPO遺伝子座を包含する3つのP1クローン及び1つのPACクローン (Genome Systems Inc., St. Louis, MO; カタログ番号P1-2535及びPAC-6539) が単離され、140kb領域をPCRベースのギャップ充填法と組み合わせた規則的ショットガン法 (Chen等、Genomics 17: 651-656 (1993)) を用いて配列決定した。分析により該領域がTHPOに極めて近く位置する4つの更なる遺伝子：腫瘍壊死因子レセプター1型関連タンパク質2 (TRAP2) 及び伸長開始因子ガンマ (eIF

10

20

30

40

50

4 g)、塩化物チャンネル2 (CLCN2) 及びRNAポリメラーゼIIサブユニットhRPB17を伴って遺伝子リッチであることが明らかとなった。該領域にはTHPO相同体は見出されなかったが、4つの新規な遺伝子がコンピュータ補助遺伝子検出 (GRAIL) により予測された (Xu等, Gen. Engin. 16: 241-253 (1994), CpG島の存在 (Cross, S. 及びBird, A., Cur. Opin. Genet. & Devel. 5: 109-314 (1995), 及び公知の遺伝子との相同性 (WU-BLAST2.0により検出) (Altschul及びGish, Methods Enzymol. 266: 460-480 (1996))

【0146】

10

手法:

P1及びPACクローン:

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

規則的ショットガン法:

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

THPO遺伝子座をよりよく同定し、ヘマトポエチンファミリーに関連する他の遺伝子を検索するために、4つのゲノムクローンを、ヒトP1及びPACライブラリのPCRスクリーニングによりこの領域から単離した (Genome System. Inc., カタログ番号: P1-2535及びPAC-6539)。遺伝子断片のサイズは次の通りである: P1.tは40kb; P1.gは70kb; P1.uは70kb; 及びPAC.zは200kbである。200kbゲノムDNA領域の約80%を、規則的ショットガン法 (OSS) (Chen等, Genomics 17: 651-56 (1993)) を用いて配列決定し、AutoAssembler (商品名) (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Foster City, CA, カタログ番号903227) を用いてコンティグに構築した。これらのコンティグの予備的順序を手動分析で決定した。46のコンティグが存在し、ギャップへの充填を用いた。表4はギャップの数とサイズをまとめている。

40

【0147】

表 4

140kb領域のギャップのまとめ

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

10

【0148】

DNA配列決定：

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

20

PCR-ベースギャップ充填法：

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

30

【0149】

分析：

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

40

次に、ジェネンテックのタンパク質データベースに対してゲノム領域をWUBLAST2.0アルゴリズムを用いて比較することにより既知の遺伝子を明らかにし、各遺伝子につい

50

てゲノム及びcDNA配列を各々、さもないと大きく異なる配列間の局所的同一性の領域を見つけるためにNeedleman-Wunch (Needleman及びWunch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)) アルゴリズムを用いて整列させることにより注釈をつけた。該方法は、該領域の5つの既知の遺伝子、THPO、TRAP2、elf4g、CLCN2及びhRPB17の全てのエクソンの検出をもたらした(表5)。

【0150】

表 5

分析された140kb領域に位置している既知の遺伝子のまとめ

既知の遺伝子	マップ位置
真核生物翻訳開始因子4ガンマ	3q27-qter
トロンボポエチン	3q26-q27
塩化物チャンネル2	3q26-qter
TNF レセプター関連タンパク質2	過去にマップされていない
RNA ポリメラーゼ II サブユニットhRPB17	過去にマップされていない

10

【0151】

最後に、新規な転写単位を多数の方法を用いて予測した。CpG島(S. Cross及びBird, A., Curr. Opin. Gene. Dev. 5: 109-314 (1995)) 島をプロモーター領域を定めるために使用し、GC-リッチ、6-又は8-量体回文構造配列を認識する酵素によって切断された部位のクラスターとして同定した。CpG島には通常、遺伝子のプロモーター領域が付随している。短いゲノム領域(10-20kb)のGenBankに対するWUBLAST2.0分析は、ESTに一致する。個々のEST配列(あるいは可能な場合は、それらの配列クロマトグラムファイル)を検索し、Sequencerで構築して理論的cDNA配列を与えた(ここでDNA34415と命名)。新規のエクソンを予測するためにGRAIL2(Apoc Inc., Knoxville, TN, DECAのためのコマンドラインバージョン)を用いた。該領域の5つの既知の遺伝子は、GLAILアルゴリズムの成功のための内部参照となった。

20

30

【0152】

単離：

コルディン(Chordin)cDNAクローンを、オリゴdTプライムヒト胎児肺ライブラリから単離した。ヒト胎児肺ポリA(商品名)RNAはClontech(カタログ#6528-1,ロット#43777)から購入し、5mgを使用してpLR5B(ジェネンテック,LIB26)でcDNAライブラリを作成した。3'-プライマー：pGACTAGTTCTAGATCGCGAGCGGCGCGCCCTTTTCTTTT (配列番号：81)

及び5'-リンカー：

pCGGACGCGGTGGGGCCTGCGCACCCAGCT (配列番号：82)

を設計してSalI及びNotI制限部位を導入した。クローンは、遺伝子の提案されたゲノムエキソンを併せて手で「スプライシング」することにより推論した推定ヒトコルディンcDNA配列(DNA34415)から設計したオリゴヌクレオチドでスクリーニングした。プローブに隣接するPCRプライマーを用いて配列決定の前にcDNAクローンの同一性を確認した。

スクリーニングオリゴヌクレオチドプローブは次のものであり：

OL15640 34415. p1：

5'-GCCGCTCCCGGAACGGGCGAGCGGCTCCTTCTCAGAA-3' (配列番号：83)

40

50

OL I 5 6 4 2 3 4 4 1 5. p 2 :

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

使用されたフランキングプローブは次のものであった:

OL I 5 6 3 9 3 4 4 1 5. f 1 :

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

OL I 5 6 4 3 3 4 4 1 5. r :

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

【0153】

DNA 3 5 9 1 7 - 1 2 0 7 の全コード化配列が Fig 9 (配列番号: 9) に含まれる。
クローン DNA 3 5 9 1 7 - 1 2 0 7 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 3 7 - 1 3 9 に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置 2 9 9
9 - 3 0 0 1 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 9 5 4 アミ
ノ酸長である。Fig 10 (配列番号: 10) に示された全長 PRO 2 4 3 配列の分析に
より様々な重要なポリペプチドドメインの存在が明らかにされたが、それらの重要なポリ
ペプチドドメインに対して与えられる位置は上記のように概略である。Fig 10 に示し
た全長 PRO 2 4 3 配列の分析により次のことが明らかにされた: 約アミノ酸 1 ~ 約アミ
ノ酸 2 3 のシグナルペプチド; 約アミノ酸 2 1 7 ~ 約アミノ酸 2 2 1、約アミノ酸 3 5 1
~ 約アミノ酸 3 5 5、約アミノ酸 3 6 5 ~ 約アミノ酸 3 6 9、及び約アミノ酸 4 3 4 ~ 約
アミノ酸 4 3 8 の N-グリコシル化部位; 約アミノ酸 1 4 5 ~ 約アミノ酸 1 5 3 及び約ア
ミノ酸 7 7 8 ~ 約アミノ酸 7 8 6 のチロシンキナーゼリン酸化部位; 約アミノ酸 2 0 ~ 約
アミノ酸 2 6、約アミノ酸 4 7 ~ 約アミノ酸 5 3、約アミノ酸 5 0 ~ 約アミノ酸 5 6、約
アミノ酸 6 9 ~ 約アミノ酸 7 5、約アミノ酸 7 3 ~ 約アミノ酸 7 9、約アミノ酸 2 3 2 ~
約アミノ酸 2 3 8、約アミノ酸 2 3 6 ~ 約アミノ酸 2 4 2、約アミノ酸 3 9 0 ~ 約アミノ
酸 3 9 6、約アミノ酸 4 2 2 ~ 約アミノ酸 4 2 8、約アミノ酸 4 7 9 ~ 約アミノ酸 4 7 7
、約アミノ酸 4 8 3 ~ 約アミノ酸 4 8 9、約アミノ酸 4 8 9 ~ 約アミノ酸 4 9 5、約アミ
ノ酸 5 7 3 ~ 約アミノ酸 5 7 9、約アミノ酸 5 7 6 ~ 約アミノ酸 5 8 2、約アミノ酸 5 8
0 ~ 約アミノ酸 5 8 6、約アミノ酸 6 3 5 ~ 約アミノ酸 6 4 1、約アミノ酸 6 7 0 ~ 約ア
ミノ酸 6 7 6、約アミノ酸 7 7 3 ~ 約アミノ酸 7 7 9、約アミノ酸 8 0 7 ~ 約アミノ酸 8
1 3、約アミノ酸 8 7 1 ~ 約アミノ酸 8 7 7、及び約アミノ酸 9 0 5 ~ 約アミノ酸 9 1 1
の N-ミリスチル化部位; 約アミノ酸 8 7 ~ 約アミノ酸 9 1 のアミド化部位; 約アミノ
酸 1 6 5 ~ 約アミノ酸 1 6 8 の細胞接着配列; 約アミノ酸 3 1 5 ~ 約アミノ酸 3 3 7 のロ
イシンジッパーパターン。クローン DNA 3 5 9 1 7 - 1 2 0 7 は 1 9 9 7 年 9 月 3 日に
ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 2 0 9 5 0 8 が付与された。Fig 10 に示す P
RO 2 4 3 の全長タンパク質は、約 1 0 1、9 6 0 の見積もり分子量及び約 8. 2 1 の p
I を持つ。

【0154】

実施例 8

ヒト PRO 2 5 6 をコードする cDNA クローンの単離

実施例 1 に記載したように、phrap を用いて他の EST 配列に対してコンセンサス D
NA 配列を構築した。この構築されたコンセンサス配列を、ここで DNA 2 8 7 2 5 と命
名する。DNA 2 8 7 2 5 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) PRO 2 5 6 の全長コード化配列
のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。
PCR プライマー (正方向及び逆方向) の対を合成した:

正方向 PCR プライマー:

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

逆方向 PCR プライマー:

10

20

30

40

50

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

さらに、DNA 28725 コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた:

ハイブリッド形成プローブ:

5' - C T G A C A G T G A C T A G C T C A G A C C A C C C A G A G G A C A C G G C C A A C G T C A C A G T - 3' (配列番号: 89)

5' - G G G C T C T T T C C C A C G C T G G T A C T A T G A C C C C A C G G A G C A G A T C T G - 3' (配列番号: 90)

【0155】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でPCR増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマー対の一方を用いてPRO256遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

cDNAライブラリの構築のためのRNAはヒト胎盤組織から単離した。cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、Not I 部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSal I ヘミキナーゼアダプターに結合させ、Not I で切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター (pRKB又はpRKD等; pRK5BはSfi I 部位を含まないpRK5Dの前駆体である; Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991) 参照) に、独特のXho I 及びNot I 部位において、所定の方向でクローニングした。

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

【0156】

DNA 35880-1160の全コード化配列がFig 11 (配列番号: 11) に示される。クローンDNA 35880-1160は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置188-190に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置1775-1777に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は529アミノ酸長である (Fig 12)。Fig 12 (配列番号: 12) に示した全長PRO344配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。Fig 12に示した全長PRO344ポリペプチドの分析により以下の存在が明らかになった: 約アミノ酸1~約アミノ酸35のシグナルペプチド; 約アミノ酸466~アミノ酸483の膜貫通ドメイン; 約アミノ酸66~約アミノ酸70、約アミノ酸235~約アミノ酸239、及び約アミノ酸523~約アミノ酸527のN-グリコシル化部位; 約アミノ酸29~約アミノ酸35、約アミノ酸43~約アミノ酸49、約アミノ酸161~約アミノ酸167、約アミノ酸212~約アミノ酸218、約アミノ酸281~約アミノ酸287、約アミノ酸282~約アミノ酸288、約アミノ酸285~約アミノ酸291、約アミノ酸310~約アミノ酸316、約アミノ酸313~約アミノ酸319、約アミノ酸422~約アミノ酸428、約アミノ酸423~約アミノ酸429、及び約アミノ酸426~約アミノ酸432のN-ミリスチル化部位; 約アミノ酸193~約アミノ酸199の細胞接着配列; 及び約アミノ酸278~約アミノ酸298及び約アミノ酸419~約アミノ酸438の膵臓トリプシンインヒビター (Kunitz) ファミリーシグネチャー。クローンDNA 35880-1160は1997年10月16日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209379が付与された。

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

【0157】

実施例 9

ヒト PRO269 をコードする cDNA クローンの単離

実施例 1 に記載したように、phrap を用いて他の EST 配列に対してコンセンサス DNA 配列を構築した。EGF 様相同体をコードするこの構築されたコンセンサス配列を、ここで DNA35705 と命名する。DNA35705 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) PRO269 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 (3 つの正方向及び 2 つの逆方向) を合成した：

正方向 PCR プライマー 1：

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

正方向 PCR プライマー 2：

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

正方向 PCR プライマー 3：

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

逆方向 PCR プライマー 1：

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

逆方向 PCR プライマー 2：

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

さらに、DNA35705 コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリッド形成プローブ：

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

【0158】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからの DNA を上で同定した PCR プライマー対で PCR 増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及び PCR プライマー対の一方を用いて PRO269 遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNA ライブラリの構築のための RNA はヒト胎児腎臓組織から単離した。

上記のように単離したクローンの DNA 配列決定により、DNA38260-1180 [Fig 13、配列番号：13] の全長 DNA 配列；及び PRO269 の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA38260-1180 の全コード化配列が Fig 13 (配列番号：13) に含まれる。クローン DNA38260-1180 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 314-316 に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置 1784-1786 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 490 アミノ酸長であり、約 51,636 ダルトンの分子量及び約 9.29 の見積もり pI を有する。Fig 14 (配列番号：14) に示した全長 PRO344 配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。Fig 14 に示した全長 PRO344 ポリペプチドの分析により以下の存在が明らかになった：約アミノ酸 1-約アミノ酸 16 のシグナルペプチド；約アミノ酸 397-アミノ酸 418 の膜貫通ドメイン；約アミノ酸 189-約アミノ酸 193 及び約アミノ酸 381-約アミノ酸 385 の N-グリコシル化部位；約アミノ酸 289-約アミノ酸 293 のグリコサミノグリカン結合部位；約アミノ酸 98-約アミノ酸 102 及び約アミノ酸 434-約アミノ酸 438 の cAMP-及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸 30-約アミノ酸 36、約アミノ酸 35-約アミノ酸 41、約アミノ酸 58-約アミノ酸 64、約アミノ酸 59-約アミノ酸 65、約アミノ酸 121-約アミノ酸 127、約アミノ酸 151-約ア

10

20

30

40

50

ミノ酸 157、約アミノ酸 185～約アミノ酸 191、約アミノ酸 209～約アミノ酸 215、約アミノ酸 267～約アミノ酸 273、約アミノ酸 350～約アミノ酸 356、約アミノ酸 374～約アミノ酸 380、約アミノ酸 453～約アミノ酸 459、約アミノ酸 463～約アミノ酸 469、約アミノ酸 477～約アミノ酸 483 の N-ミリスチル化部位；約アミノ酸 262～約アミノ酸 274 の アスパラギン酸 アスパラギンヒドロキシル化部位。クローン DNA 38260-1180 は 1997 年 10 月 17 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 209397 が付与された。

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

10

【0159】

実施例 10

ヒト PRO274 をコードする cDNA クローンの単離

実施例 1 に記載したように、phrap を用いて他の EST 配列に対してコンセンサス DNA 配列を構築した。この構築されたコンセンサス配列を、ここで DNA36469 と命名する。次いでコンセンサス DNA 配列を、BLAST 及び phrap の繰り返しサイクルを用いて、上記の EST の供給源を用いてできる限り延長した。延長したアセンブリコンセンサス配列を、ここで (consen01) と命名する。また、ジェネンテックが独自に開発した EST を第 2 のコンセンサス構築に用い、DNA17873、DNA36157 及び DNA28929 と命名する。構築した DNA36469 及び (consen01) コンセンサス配列に基づいて、1) PCR により対象とする配列を含む cDNA ライブラリを同定するため、及び 2) PRO274 の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

20

PCR プライマー (正方向及び逆方向) を合成した：

正方向 PCR プライマー (36469. f1)：

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

正方向 PCR プライマー (36469. f2)：

5'-GCTCTGTCACTCACGCTC-3' (配列番号：98)

正方向 PCR プライマー (36469. f3)：

5'-TCATCTCTTCCCTCTCCC-3' (配列番号：99)

30

正方向 PCR プライマー (36469. f4)：

5'-CCTTCCGCCACGGAGTTTC-3' (配列番号：100)

逆方向 PCR プライマー (36469. r1)：

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

逆方向 PCR プライマー (36469. r2)：

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

さらに、DNA36469 及び (consen01) コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリッド形成プローブ (36469. p1)：

40

5'-TCGGGGAGCAGGCCCTTGAACCGGGGCATTGCTGCTGTCAAGGAGG-3' (配列番号：103)

【0160】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからの DNA を上で同定した PCR プライマー対で PCR 増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及び PCR プライマー対の一方を用いて PRO274 遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNA ライブラリの構築のための RNA はヒト胎児肝臓組織 (LIB229) から単離した。

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

50

列が得られた。

DNA39987-1184の全コード化配列がFig15（配列番号：15）に含まれる。クローンDNA39987-1184は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置83-85に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置1559-1561に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は492アミノ酸長であり、約54,241ダルトンの分子量及び約8.21の見積もりpIを持つ。Fig16（配列番号：16）に示した全長PRO344配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。Fig16に示した全長PRO344ポリペプチドの分析により以下の存在が明らかになった：約アミノ酸86～約アミノ酸105、約アミノ酸162～アミノ酸178、約アミノ酸327～約アミノ酸345、約アミノ酸359～約アミノ酸374、及び約アミノ酸43～約アミノ酸423の膜貫通ドメイン；約アミノ酸347～約アミノ酸351及び約アミノ酸461～約アミノ酸465のN-グリコシル化部位；約アミノ酸325～約アミノ酸329のcAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸53～約アミノ酸59、約アミノ酸94～約アミノ酸100、約アミノ酸229～約アミノ酸235、約アミノ酸267～約アミノ酸273、約アミノ酸268～約アミノ酸274、約アミノ酸358～約アミノ酸364、約アミノ酸422～約アミノ酸428、約アミノ酸425～約アミノ酸431、及び約アミノ酸431～約アミノ酸437のN-ミリスチル化部位。クローンDNA39987-1184は1998年4月21日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209786が付与された。

Fig16（配列番号：16）に示したPRO274の全長アミノ酸配列の分析により、その一部がFn54タンパク質と有意な相同性を有していることが示唆された。より詳細には、Dayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、PRO274アミノ酸配列と以下に示すDayhoff配列との間に配列相同性が見いだされた：MMFN54S2__1, MMFN54S1__1, CELF48C1__8, CEF38B7__6, PRP3__RAT, INL3__PIG, MTCY07A7__13, YNAX__KLEAE, A47234, 及びHME2__MOUSE。

【0161】

実施例11

ヒトPRO304をコードするcDNAクローンの単離

実施例1に記載したように、phrapを用いて他のEST配列に対してコンセンサスDNA配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでDNA35958と命名する。DNA35958コンセンサス配列に基づいて、1)PCRにより対象とする配列を含むcDNAライブラリを同定するため、及び2)PRO304の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

PCRプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向PCRプライマー1：

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

正方向PCRプライマー2：

5'-CAGCCCTGCGCACATGTGC-3'（配列番号：105）

正方向PCRプライマー3：

5'-TACTGGGTGGTTCAGCAAC-3'（配列番号：106）

逆方向PCRプライマー1：

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

さらに、DNA35958コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリッド形成プローブ：

10

20

30

40

50

5' - G C C C T C A T C C T C T C T G G C A A A T G C A G T T A C A G C C C G G
A G C C C G A C - 3' (配列番号: 108)

【0162】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でPCR増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマー対の一方を用いてPRO304遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリの構築のためのRNAは22週ヒト胎児脳組織(LIB153)から単離した。

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、DNA39520-1217 [Fig 17、配列番号: 17] の全長DNA配列; 及びPRO304の誘導タンパク質配列が得られた。 10

DNA39520-1217の全コード化配列がFig 17 (配列番号: 17) に含まれる。クローンDNA39520-1217は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置34-36に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置1702-1704に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は556アミノ酸長である。Fig 18 (配列番号: 18) に示した全長PRO344配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。Fig 18 に示した全長PRO344ポリペプチドの分析により以下の存在が明らかになった: 約アミノ酸1~約アミノ酸16のシグナルペプチド; 約アミノ酸210~アミノ酸214、約アミノ酸222~約アミノ酸226、約アミノ酸286~約アミノ酸290、約アミノ酸313~約アミノ酸317、約アミノ酸443~約アミノ酸447のN-グリコシル化部位; 約アミノ酸361~約アミノ酸365、約アミノ酸408~約アミノ酸412、及び約アミノ酸538~約アミノ酸542のグリコサミノグリカン接着部位; 約アミノ酸2~約アミノ酸8、約アミノ酸107~約アミノ酸113、約アミノ酸195~約アミノ酸201、約アミノ酸199~約アミノ酸205、約アミノ酸217~約アミノ酸223、約アミノ酸219~約アミノ酸225、約アミノ酸248~約アミノ酸254、約アミノ酸270~約アミノ酸276、約アミノ酸284~約アミノ酸290、約アミノ酸409~約アミノ酸415、約アミノ酸410~約アミノ酸416、約アミノ酸473~約アミノ酸479、約アミノ酸482~約アミノ酸488、約アミノ酸521~約アミノ酸527、約アミノ酸533~約アミノ酸539、及び約アミノ酸549~約アミノ酸555のN-ミリストイル化部位。クローンDNA39520-1217は1997年11月21日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209482が付与された。 20 30

【0163】

実施例12

ヒトPRO339をコードするcDNAの単離

発現配列タグ(EST)DNAデータベース(LIFES EQ (商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA)を検索し、ESTを同定した。Incyteクローン及びコンセンサス配列を、4つおの正方向プライマーから形成し、2つの逆方向プライマー及び他のプライマーを形成した。ヒト胎児肝臓cDNAライブラリを、同定したESTに基づく合成オリゴヌクレオチドプローブでのハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。ヒトPRO339をコードするcDNAクローン作成のために用いたcDNAライブラリは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、Not I 部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSal Iヘミキナーゼアダプターに結合させ、Not Iで切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター(pRKB又はpRKD等; pRK5BはSfi I 部位を含まないpRK5Dの前駆体である; Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991) 参照)に、独特のXho I 及びNot I 部位において、所定の方向でクローニングした。 40 50

以下のオリゴヌクレオチドプローブを使用した：

正方向PCRプライマー1：

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

正方向PCRプライマー2：

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

正方向PCRプライマー3：

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

正方向PCRプライマー4：

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

逆方向PCRプライマー1：

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

逆方向PCRプライマー2：

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

プライマー：

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

10

【0164】

全長クローンDNA 43466-1225 [Fig 19、配列番号：19]を同定し、全体を配列決定したところ、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置333-335に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置2649-2651に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は772アミノ酸長であり、約86, 226ダルトンの算定分子量を持つ。Fig 20 (配列番号：20)に示した全長PRO339配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。Fig 20に示した全長PRO339ポリペプチドの分析により以下の存在が明らかになった：約アミノ酸1～約アミノ酸15のシグナルペプチド；約アミノ酸489～約アミノ酸510の膜貫通ドメイン；約アミノ酸121～約アミノ酸125及び約アミノ酸342～約アミノ酸346のN-グリコシル化部位；約アミノ酸319～約アミノ酸323及び約アミノ酸464～約アミノ酸468のcAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸736～約アミノ酸743のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸19～約アミノ酸25、約アミノ酸23～約アミノ酸29、約アミノ酸136～約アミノ酸142、約アミノ酸397～約アミノ酸403、約アミノ酸441～約アミノ酸447、約アミノ酸544～約アミノ酸550、約アミノ酸558～約アミノ酸564、約アミノ酸651～約アミノ酸657、約アミノ酸657～約アミノ酸663、及び約アミノ酸672～約アミノ酸678のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸14～約アミノ酸25の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位；約アミノ酸247～約アミノ酸250の細胞接着配列。クローンDNA 43466-1225は1997年11月21日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209490が付与された。

20

30

Fig 20 (配列番号：20)に示した全長配列のBLAST及びFastA配列アライメント分析に基づくと、PRO339は線虫タンパク質及びコラーゲン様ポリマー配列並びにフリンジと配列同一性を示し、よってPRO339は発育及び組織成長に含まれることが示された。

40

【0165】

実施例13

ヒトPRO1558をコードするcDNAクローンの単離

DNA 71282-1668は、上記実施例2に示されている独自のシグナル配列発見アルゴリズムを適用する事により同定された。上記シグナル配列アルゴリズムを利用することで、LIFESEQデータベース(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, からのIncyte ESTクラスター

50

番号86390で表されるESTクラスター配列の同定を可能ならしめた。その後、存在する相同性を同定するために、このESTクラスター配列を公的（例えば、GenBank）及び／又は私的（LIFESEQ（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA）データベースを含む様々な発現配列タグ（EST）データベースと比較した。相同性検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等、Methods in Enzymology 266: 460-480（1996））を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70（90の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでDNA58842と命名する。 10

DNA58842配列とIncyte EST番号3746964との間の配列相同性に鑑みて、Incyte EST番号3746974を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。このcDNA挿入物の配列をFig 21（配列番号：21）に示し、ここでDNA71282-1668と命名する。

【0166】

DNA71282-1668の全コード配列はFig 21（配列番号：21）に含まれている。クローンDNA71282-1668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84-86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870-872の停止コドンで終端する（Fig 21）。予測されるポリペプチド前駆体は262アミノ酸長である（Fig 22；配列番号：22）。Fig 22に示す全長PRO1558タンパク質は、約28, 809の見積もり分子量及び約8.80のpIを有する。Fig 22（配列番号：22）に示した全長PRO1558配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようによそのものである。Fig 22に示した全長PRO1558配列の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸1～約アミノ酸25のシグナルペプチド；約アミノ酸8～約アミノ酸30及び約アミノ酸109～約アミノ酸130の膜貫通ドメイン；約アミノ酸190～約アミノ酸194のN-グリコシル化部位；約アミノ酸238～約アミノ酸247のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸22～約アミノ酸28、約アミノ酸28～約アミノ酸34、約アミノ酸110～約アミノ酸116、約アミノ酸205～約アミノ酸211、及び約アミノ酸255～約アミノ酸261のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸31～約アミノ酸35及び約アミノ酸39～約アミノ酸43のアミド化部位。クローンDNA71282-1668は1998年10月6日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203312が付与された。 20 30

Fig 22（配列番号：22）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、PRO1558アミノ酸配列と以下に示すDayhoff配列との間に配列相同性が見いだされた：AF75724_2, MXU24657_3, CAMT_EUCGU, MSU20736_1, P_R29515, B70431, JC4004, CEY32B12A_3, CELF53B3_2, 及びP_R13543。 40

【0167】

実施例14

ヒトPRO779をコードするcDNAの単離

ヒト胎児心臓及びヒト胎児肺lg t10バクテリオファージcDNAライブラリ（共にClontechから購入）を、ヒトTNFR1及びCD95の細胞内ドメイン（ICD）と或る程度の相同性を示したEST（GenBank位置W71984）に基づく合成オリゴヌクレオチドプローブでのハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。W71984は523bpのESTであり、その-1読み枠は、ヒトTNFR1のICDにお 50

ける43アミノ酸長配列と27の同一性を有する。スクリーニングに使用したオリゴヌクレオチドプローブは、各々27及び25bp長であり、以下の配列を持つ：

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

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

【0168】

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

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

【0169】

クローン (F20A. 57) DNA58801-1052 (下記のように、ATCC55820として寄託されたApo3クローンFH20. 57とも呼ばれる) は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置103-105に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置1354-1356の停止コドンで終端する [Fig 23; 配列番号：23]。予測されるポリペプチド前駆体は417アミノ酸長である [Fig 24; 配列番号：24]。Fig 24に示す全長PRO779タンパク質は、約45,000の見積もり分子量及び約6.40のpIを有する。Fig 24 (配列番号：24) に示した全長PRO779配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようによそのものである。Fig 24に示した全長PRO779配列の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸1～約アミノ酸24のシグナルペプチド；約アミノ酸199～約アミノ酸219の膜貫通ドメイン；約アミノ酸67～約アミノ酸71、及び約アミノ酸106～約アミノ酸110のN-グリコシル化部位；約アミノ酸157～約アミノ酸161のcAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸44～約アミノ酸50、約アミノ酸50～約アミノ酸56、約アミノ酸66～約アミノ酸72、約アミノ酸116～約アミノ酸122、約アミノ酸217～約アミノ酸223、約アミノ酸355～約アミノ酸361、約アミノ酸391～約アミノ酸397、及び約アミノ酸401～約アミノ酸407のN-ミリスチル化部位；及び約アミノ酸177～約アミノ酸188の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位。クローンDNA58801-1052は1996年9月5日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号55820が付与された。

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

及び24.7%、ICDにおいて31.6%及び18.3%、及び死亡ドメインにおいて47.5%及び20%である。

【0170】

実施例15

ヒトPRO1185をコードするcDNAクローンの単離

DNA62881-1515は、上記実施例2に示されている独自のシグナル配列発見アルゴリズムを適用する事により同定された。上記シグナル配列アルゴリズムを利用することで、LIFESSEQデータベース（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, からのIncyte ESTクラスター番号86390で表されるESTクラスター配列の同定を可能ならしめた。その後、存在する相同性を同定するために、このESTクラスター配列を公的（例えば、GenBank）及び／又は私的（LIFESSEQ（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA）データベースを含む様々な発現配列タグ（EST）データベースと比較した。相同性検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480（1996））を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70（90の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでDNA56426と命名する。

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

【0171】

DNA62881-1515の全コード配列はFig 25（配列番号：25）に含まれている。クローンDNA62881-1515は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置4-6に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置598-600の停止コドンで終端する（Fig 25）。予測されるポリペプチド前駆体は198アミノ酸長である（Fig 26；配列番号：26）。Fig 26に示す全長PRO1185タンパク質は、約22,105の見積もり分子量及び約7.73のpIを有する。Fig 26（配列番号：26）に示した全長PRO1185配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。Fig 26に示した全長PRO1185配列の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸1～約アミノ酸21のシグナルペプチド；約アミノ酸46～約アミノ酸52、約アミノ酸51～約アミノ酸57、及び約アミノ酸78～約アミノ酸84のN-ミリスチル化部位。クローンDNA62881-1515は1998年8月4日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203096が付与された。

Fig 26（配列番号：26）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、PRO1185アミノ酸配列と以下に示すDayhoff配列との間に配列相同性が見いだされた：TUP1_YEAST, AF41382_1, MAOM_SPLTU, SPPBPHU9_1, EPCPLCFAIL_1, HSPLLEC_1, YKL4_CAEEL, A44643, 及びTGU65922_1。

【0172】

実施例16

10

20

30

40

50

ヒトPRO1245をコードするcDNAクローンの単離

DNA64884-1527は、上記実施例2に示されている独自のシグナル配列発見アルゴリズムを適用する事により同定された。上記シグナル配列アルゴリズムを利用することで、LIFESSEQデータベース（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, からのIncyte ESTクラスター番号86390で表されるESTクラスター配列の同定を可能ならしめた。その後、存在する相同性を同定するために、このESTクラスター配列を公的（例えば、GenBank）及び／又は私的（LIFESSEQ（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA）データベースを含む様々な発現配列タグ（EST）データベースと比較した。相同性検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70（90の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。構築に使用したESTの1つ又は複数は耳下腺癌を持つヒトの耳下（唾液）腺から作成したライブラリから誘導した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでDNA56019と命名する。

DNA56019配列とIncyte EST番号1327836との間の配列相同性に鑑みて、Incyte EST番号1327836を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。このcDNA挿入物の配列をFig 27（配列番号：27）に示し、ここでDNA64884-1527と命名する。

【0173】

DNA64884-1527の全コード配列はFig 27（配列番号：27）に含まれている。クローンDNA64884-1527は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置79-81に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置391-393の停止コドンで終端する（Fig 27）。予測されるポリペプチド前駆体は104アミノ酸長である（Fig 28；配列番号：28）。Fig 28に示す全長PRO1245タンパク質は、約10, 100の見積もり分子量及び約8.76のpIを有する。Fig 28（配列番号：28）に示した全長PRO1245配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。Fig 28に示した全長PRO1245配列の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸1～約アミノ酸18のシグナルペプチド；約アミノ酸8～約アミノ酸14、約アミノ酸65～約アミノ酸71、約アミノ酸74～約アミノ酸80、及び約アミノ酸88～約アミノ酸94のN-ミリスチル化部位；約アミノ酸5～約アミノ酸16の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位。クローンDNA64884-1527は1998年8月25日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203155が付与された。

Fig 28（配列番号：28）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、PRO1245アミノ酸配列と以下に示すDayhoff配列との間に配列相同性が見いだされた：SYA__THETH, GEN11167, M TV044__4, AB011151__1, RL AJ2750__3, SNE LIPT RA__1, S63624, C28391, A37907, 及びS14064。

【0174】

実施例17

ヒトPRO1759をコードするcDNAクローンの単離

DNA76531-1701は、上記実施例2に示されている独自のシグナル配列発見アルゴリズムを適用する事により同定された。上記シグナル配列アルゴリズムを利用することで、LIFESSEQデータベース（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals

10

20

30

40

50

t i c a l s , P a l o A l t o , C A , からの I n c y t e E S T クラスター
番号 8 6 3 9 0 で表される E S T クラスター配列の同定を可能ならしめた。その後、存在
する相同性を同定するために、この E S T クラスター配列を公的（例えば、G e n B a n k
）及び／又は私的（L I F E S E Q（登録商標）、I n c y t e P h a r m a c e
u t i c a l s , I n c . , P a l o A l t o , C A）データベースを含む様々
な発現配列タグ（E S T）データベースと比較した。相同性検索は、コンピュータプログ
ラム B L A S T 又は B L A S T 2（A l t s c h u l 等, M e t h o d s i n E n
z y m o l o g y 2 6 6 : 4 6 0 - 4 8 0（1996））を用いて実施した。既知
のタンパク質をコードせず、B L A S T スコア 7 0（90 の場合もある）又はそれ以上を
持つ比較物は、プログラム「p h r a p」（P h i l G r e e n , U n i v e r s i
t y o f W a s h i n g t o n , S e a t t l e , W a s h i n g t o n）で集
団化してコンセンサス D N A 配列を構築した。構築に使用した E S T の 1 つ又は複数は、
アレルギー性喘息患者のプールした好酸球から誘導した。そこから得られたコンセンサス
配列を、ここで D N A 5 7 3 1 3 と命名する。

10

D N A 5 7 3 1 3 配列と I n c y t e E S T 番号 2 4 3 4 2 5 5 との間の配列相同性に鑑
みて、I n c y t e E S T 番号 2 4 3 4 2 5 5 を購入し、c D N A 挿入物を得て配列決定
した。この c D N A 挿入物の配列を F i g 2 9（配列番号：29）に示し、ここで D N A
7 6 5 3 1 - 1 7 0 1 と命名する。

【0175】

D N A 7 6 5 3 1 - 1 7 0 1 の全コード配列は F i g 2 9（配列番号：29）に含まれて
いる。クローン D N A 7 6 5 3 1 - 1 7 0 1 は単一のオープンリーディングフレームを含
み、ヌクレオチド位置 1 2 5 - 1 2 7 に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチ
ド位置 1 4 7 5 - 1 4 7 7 の停止コドンで終端する（F i g 2 9）。予測されるポリペプ
チド前駆体は 4 5 0 アミノ酸長である（F i g 3 0；配列番号：30）。F i g 3 0 に示
す全長 P R O 1 7 5 9 タンパク質は、約 4 9 , 7 6 5 の見積もり分子量及び約 8 . 1 4 の
p I を有する。F i g 3 0（配列番号：30）に示した全長 P R O 1 7 5 9 配列の分析に
より、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペ
プチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。F i g 3 0 に示し
た全長 P R O 1 7 5 9 配列の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸 1 ~
約アミノ酸 1 8 のシグナルペプチド；約アミノ酸 4 1 ~ 約アミノ酸 5 5、約アミノ酸 7 5
~ 約アミノ酸 9 4、約アミノ酸 1 2 7 ~ 約アミノ酸 1 4 3、約アミノ酸 1 9 1 ~ 約アミノ
酸 2 1 3、約アミノ酸 2 4 9 ~ 約アミノ酸 2 7 0、約アミノ酸 2 7 8 ~ 約アミノ酸 2 9 9
、約アミノ酸 3 1 4 ~ 約アミノ酸 3 3 0、約アミノ酸 3 4 3 ~ 約アミノ酸 3 5 9、約アミ
ノ酸 3 7 9 ~ 約アミノ酸 3 9 4、及び約アミノ酸 4 1 0 ~ 約アミノ酸 4 3 0 の膜貫通ドメ
イン；約アミノ酸 1 0 4 ~ 約アミノ酸 1 0 8 の c A M P - 及び c A M P - 依存性プロテイン
キナーゼリン酸化部位；約アミノ酸 1 1 ~ 約アミノ酸 1 7、約アミノ酸 1 8 ~ 約アミノ
酸 2 4、約アミノ酸 8 4 ~ 約アミノ酸 9 0、約アミノ酸 9 2 ~ 約アミノ酸 9 8、約アミノ
酸 1 3 7 ~ 約アミノ酸 1 4 3、約アミノ酸 1 3 8 ~ 約アミノ酸 1 4 4、約アミノ酸 2 3 8
~ 約アミノ酸 2 4 4、約アミノ酸 2 5 3 ~ 約アミノ酸 2 5 9、約アミノ酸 2 7 8 ~ 約アミ
ノ酸 2 8 4、及び約アミノ酸 2 8 2 ~ 約アミノ酸 2 8 8 の N - ミリスチル化部位；約ア
ミノ酸 1 0 2 ~ 約アミノ酸 1 0 6 のアミド化部位；約アミノ酸 6 ~ 約アミノ酸 1 7 の原核
生物膜リポタンパク脂質結合部位。クローン D N A 7 6 5 3 1 - 1 7 0 1 は 1 9 9 8 年 1
1 月 1 7 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 3 4 6 5 が付与された。

20

30

40

F i g 3 0（配列番号：30）に示した全長配列の W U - B L A S T - 2 配列アラインメ
ント分析を用いた D a y h o f f データベース（バージョン 3 5 . 4 5 S w i s s P r
o t 3 5）の分析により、P R O 1 7 5 9 アミノ酸配列と以下に示す D a y h o f f 配
列との間に配列相同性が見いだされた：O P D E _ P S E A E , T H 1 1 _ T R Y B B
 , S 6 7 6 8 4 , R G T 2 _ Y E A S T , S 6 8 3 6 2 , A T S U G T R P R _
 1 , P _ W 1 7 8 3 6（特許出願 W O 9 7 1 5 6 6 8 - A 2）, F 6 9 5 8 7 , A
 4 8 0 7 6 , 及び A 4 5 6 1 1。

50

【0176】

実施例18

ヒトPRO5775をコードするcDNAクローンの単離

DNA96869-2673は、上記実施例2に示されている独自のシグナル配列発見アルゴリズムを適用する事により同定された。上記シグナル配列アルゴリズムを利用することで、LIFESEQデータベース（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, からのIncyte ESTクラスター番号86390で表されるESTクラスター配列の同定を可能ならしめた。その後、存在する相同性を同定するために、このESTクラスター配列を公的（例えば、GenBank）及び／又は私的（LIFESEQ（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA）データベースを含む様々な発現配列タグ（EST）データベースと比較した。相同性検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480（1996））を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70（90の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでDNA79860と命名する。

DNA79860配列とLIFESEQ（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CAデータベースからのクローン番号164726H1に含まれるIncyte EST配列との間の配列相同性に鑑みて、クローン番号164726H1を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。このcDNA挿入物の配列をFig 31（配列番号：31）に示し、ここでDNA96869-2673と命名する。

【0177】

DNA96869-2673の全コード配列はFig 31（配列番号：31）に含まれている。クローンDNA96869-2673は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置193-195に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置1660-1662の停止コドンで終端する（Fig 31）。予測されるポリペプチド前駆体は489アミノ酸長である（Fig 32；配列番号：32）。Fig 32に示す全長PRO5775タンパク質は、約53, 745の見積もり分子量及び約8.36のpIを有する。Fig 32（配列番号：32）に示した全長PRO5775配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。Fig 32に示した全長PRO5775配列の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸1～約アミノ酸29のシグナルペプチド；約アミノ酸381～約アミノ酸399の膜貫通ドメイン；約アミノ酸133～約アミノ酸137、約アミノ酸154～約アミノ酸158、約アミノ酸232～約アミノ酸236、約アミノ酸264～約アミノ酸268、約アミノ酸386～約アミノ酸390、約アミノ酸400～約アミノ酸404、約アミノ酸410～約アミノ酸414、及び約アミノ酸427～約アミノ酸431のN-グリコシル化部位；約アミノ酸58～約アミノ酸64、約アミノ酸94～約アミノ酸100、約アミノ酸131～約アミノ酸137、約アミノ酸194～約アミノ酸200、約アミノ酸251～約アミノ酸257、約アミノ酸277～約アミノ酸283、約アミノ酸281～約アミノ酸287、約アミノ酸361～約アミノ酸367、約アミノ酸399～約アミノ酸405、約アミノ酸440～約アミノ酸446、約アミノ酸448～約アミノ酸454、及び約アミノ酸478～約アミノ酸484のN-ミリスチル化部位。クローンDNA96869-2673は1999年6月22日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-255が付与された。

Fig 32（配列番号：32）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメ

【 0 1 7 8 】

ヒト P R O 7 1 3 3 をコードする c D N A の単離

正方向プライマー：

逆方向プライマー：

プローブ DNA (SOCA-1) は以下のヌクレオチド配列を有していた：

【 0 1 7 9 】

ドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。Fig 34 に示した全長PRO7133配列の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸287～約アミノ酸291及び約アミノ酸375～約アミノ酸379のcAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；シグナルペプチド；約アミノ酸37～約アミノ酸43、約アミノ酸38～約アミノ酸44、約アミノ酸39～約アミノ酸45、約アミノ酸40～約アミノ酸46、約アミノ酸103～約アミノ酸109、約アミノ酸307～約アミノ酸313、約アミノ酸310～約アミノ酸316、約アミノ酸315～約アミノ酸321、約アミノ酸365～約アミノ酸371、約アミノ酸369～約アミノ酸375、約アミノ酸373～約アミノ酸379、約アミノ酸377～約アミノ酸383、約アミノ酸

酸 380～約アミノ酸 386、及び約アミノ酸 381～約アミノ酸 387 の N-ミリスチル化部位；及び約アミノ酸 373～約アミノ酸 377 のアミド化部位。クローン DNA 128451-2739 は 1999 年 8 月 31 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 PTA-618 が付与された。

【0180】

実施例 20

ヒト PRO7168 をコードする cDNA クローンの単離

DNA 102846-2742 は、上記実施例 2 に示されている独自のシグナル配列発見アルゴリズムを適用する事により同定された。上記シグナル配列アルゴリズムを利用することで、LIFESSEQ データベース（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, からの Incyte EST クラスター番号 86390 で表される EST クラスター配列の同定を可能ならしめた。その後、存在する相同性を同定するために、この EST クラスター配列を公的（例えば、GenBank）及び／又は私的（LIFESSEQ（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA）データベースを含む様々な発現配列タグ（EST）データベースと比較した。相同性検索は、コンピュータプログラム BLAST 又は BLAST2（Altschul 等, Methods in Enzymology 266: 460-480（1996））を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLAST スコア 70（90 の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサス DNA 配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここで DNA 57953 と命名する。

10

20

【0181】

DNA 57953 配列と LIFESSEQ（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA データベースからのクローン番号 4181351 に含まれる Incyte EST 配列との間の配列相同性に鑑みて、クローン番号 4181351 を購入し、cDNA 挿入物を得て配列決定した。この cDNA 挿入物の配列を Fig 35（配列番号：35）に示し、ここで DNA 102846-2742 と命名する。

30

【0182】

DNA 102846-2742 の全コード配列は Fig 35（配列番号：35）に含まれている。クローン DNA 102846-2742 は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 23-25 に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置 2540-2542 の停止コドンで終端する（Fig 35）。予測されるポリペプチド前駆体は 839 アミノ酸長である（Fig 36；配列番号：36）。Fig 36 に示す全長 PRO7168 タンパク質は、約 87, 546 の見積もり分子量及び約 4.84 の pI を有する。Fig 36（配列番号：36）に示した全長 PRO7168 配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。Fig 36 に示した全長 PRO7168 配列の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸 1～約アミノ酸 25 のシグナルペプチド；約アミノ酸 663～約アミノ酸 686 の膜貫通ドメイン；約アミノ酸 44～約アミノ酸 48、約アミノ酸 140～約アミノ酸 144、約アミノ酸 198～約アミノ酸 202、約アミノ酸 297～約アミノ酸 301、約アミノ酸 308～約アミノ酸 312、約アミノ酸 405～約アミノ酸 409、及び約アミノ酸 520～約アミノ酸 524 の N-グリコシル化部位；約アミノ酸 490～約アミノ酸 494、約アミノ酸 647～約アミノ酸 651 及び約アミノ酸 813～約アミノ酸 817 のグリコサミノグリカン接着部位；約アミノ酸 655～約アミノ酸 659 の cAMP-及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸 154～約アミノ酸 163 及び約アミノ酸 776～約アミノ酸 783 のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸 57～約

40

50

アミノ酸 63、約アミノ酸 102～約アミノ酸 108、約アミノ酸 255～約アミノ酸 261、約アミノ酸 294～約アミノ酸 300、約アミノ酸 366～約アミノ酸 372、約アミノ酸 426～約アミノ酸 432、約アミノ酸 441～約アミノ酸 447、約アミノ酸 513～約アミノ酸 519、約アミノ酸 517～約アミノ酸 523、約アミノ酸 530～約アミノ酸 536、約アミノ酸 548～約アミノ酸 554、約アミノ酸 550～約アミノ酸 556、約アミノ酸 581～約アミノ酸 587、約アミノ酸 592～約アミノ酸 598、約アミノ酸 610～約アミノ酸 616、約アミノ酸 612～約アミノ酸 618、約アミノ酸 623～約アミノ酸 629、約アミノ酸 648～約アミノ酸 654、約アミノ酸 666～約アミノ酸 672、約アミノ酸 667～約アミノ酸 673、約アミノ酸 762～約アミノ酸 768、約アミノ酸 763～約アミノ酸 769、約アミノ酸 780～約アミノ酸 786、約アミノ酸 809～約アミノ酸 815、約アミノ酸 821～約アミノ酸 827、及び約アミノ酸 833～約アミノ酸 839 の N-ミリスチル化部位；及び約アミノ酸 112～約アミノ酸 123 の ハドヘリン細胞外繰り返しドメイン。クローン DNA 102846-2742 は 1999 年 8 月 17 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 203312 が付与された。

10

【0183】

Fig 36（配列番号：36）に示した全長配列の WU-BLAST-2 配列アラインメント分析を用いた Dayhoff データベース（バージョン 35.45 SwissProt 35）の分析により、PRO7168 アミノ酸配列と以下に示す Dayhoff 配列との間に配列相同性が見いだされた：CELT22D1_9, B48013, F100960_1, MUC2_HUMAN, PRP3_MOUSE, S53363, A39066, HUMSPRPA_1, AF053091_1, 及び S80905_1。

20

【0184】

実施例 21

ヒト PRO5725 をコードする cDNA の単離

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

30

【0185】

全長クローン [DNA92265-2669；配列番号：37] は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 27-29 に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置 522-524 に見かけの停止シグナルを持つ（Fig 37；配列番号：37）。予測されるポリペプチド前駆体は 165 アミノ酸長であり、約 17, 786 の算定分子量及び約 8.43 の pI を有する。Fig 38（配列番号：38）に示した全長 PRO5725 配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかにになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようによそのものである。Fig 38 に示した全長 PRO5725 配列の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸 1～約アミノ酸 35 のシグナルペプチド；約アミノ酸 141～約アミノ酸 157 の膜貫通ドメイン；約アミノ酸 127～約アミノ酸 133 の N-ミリスチル化部位；約アミノ酸 77～約アミノ酸 88 の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位。クローン DNA92265-2669 は 1999 年 6 月 22 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 PTA-256 が付与された。

40

【0186】

Fig 38（配列番号：38）に示した全長配列の WU-BLAST2 配列アラインメント分析を用いた Dayhoff データベース（バージョン 35.45 SwissPro

50

t 35) の分析により、PRO5725 アミノ酸配列と以下の Dayhoff 配列との間の相同性が明らかになった：RNU88958_1, P_W37859, P_W37858, JC6305, HGS_RE778, HGS_RE777, P_W27652, P_W44088, HGS_RE776, 及び HGS_RE425。

【0187】

実施例 22

ヒト PRO1800 をコードする cDNA クローンの単離

実施例 1 に記載したように、phrap を用いて他の EST 配列に対してコンセンサス DNA 配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここで DNA30934 と命名する。DNA30934 コンセンサス配列に基づいて、1) PCR により対象とする配列を含む cDNA ライブラリを同定するため、及び 2) PRO1800 の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

PCR プライマー（正方向及び逆方向）を合成した：

正方向 PCR プライマー（30934. f1）：

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

逆方向 PCR プライマー（30934. r1）：

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

さらに、DNA30934 コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリッド形成プローブ（30934. p1）：

5' - GAAACGAGGAGGCGGCTCAGTGGTGATCGTGTCCTTCCATAGCAGCC - 3' （配列番号：123）

【0188】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからの DNA を上で同定した PCR プライマー対で PCR 増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及び PCR プライマー対の一方を用いて PRO1800 遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNA ライブラリの構築のための RNA はヒト胎児肝臓組織から単離した。

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

【0189】

DNA35672-2508 の全コード化配列が Fig 59 （配列番号：59）に含まれる。クローン DNA35672-2508 は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 36-38 に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置 870-872 に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は 278 アミノ酸長であり、29, 537 ダルトンの見積もり分子量及び約 8.97 の pI を持つ。Fig 60 （配列番号：60）に示した全長 PRO344 配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。Fig 60 に示した全長 PRO344 ポリペプチドの分析により以下の存在が明らかになった：約アミノ酸 1～約アミノ酸 15 のシグナルペプチド；約アミノ酸 183～アミノ酸 187 の N-グリコシル化部位；約アミノ酸 43～約アミノ酸 49、約アミノ酸 80～約アミノ酸 86、約アミノ酸 191～約アミノ酸 197、約アミノ酸 213～約アミノ酸 219、及び約アミノ酸 272～約アミノ酸 278 の N-ミリスチル化部位；約アミノ酸 276～約アミノ酸 280 の微小体 C-末端標的シグナル；及び約アミノ酸 162～約アミノ酸 199 の短鎖アルコールデヒドロゲナーゼ配列。クローン DNA35672-2508 は 1998 年 12 月 15 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 203538 が付与された。

【0190】

Fig 60 （配列番号：60）に示した全長配列の WU-BLAST2 配列アラインメン

ト分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、PRO1800アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の相同性が明らかになった：HE27_HUMAN, CELF36H9_1, CEF54F3_3, A69621, AP000007_227, UCPA_ECOLI, F69868, Y4LA_RHISN, DHK2_STRVN, 及びDHG1_BACME。

【0191】

実施例23

ヒトPRO539をコードするcDNAの単離

発現配列タグ（EST）DNAデータベース（LIFESeq（商品名）、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を検索し、ショウジョウバエメラノガスターのCoastal-2タンパク質と相同性を持つESTを同定した。次いで、このEST配列を公的データベース（例えばGenBank）及び企業のESTデータベース（LIFESeq（商品名）、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）及びを含む種々のESTと比較して相同EST配列を同定した。比較はコンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480（1996））及び他のEST配列を用いて実施した。比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, WA）で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここで（consensus）と命名する。

【0192】

構築した（consensus）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）PRO539の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして用いるためにオリゴヌクレオチドを合成した。正方向及び逆方向PCRプライマーは一般的に20から30ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約100-1000bp長のPCR産物を与えるために設計される。プローブ配列は、典型的に40-55bp長である。幾つかの場合には、コンセンサス配列が約1-1.5kbpより大きいときに付加的なオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからの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。ポジティブライブラリを、次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて対象とする遺伝子をコードするクローンの単離するのに使用した。

PCRプライマー（正方向及び逆方向）を合成した：

正方向PCRプライマー（hcos2.F）：

5'-GATGAGGCCATCGAGGCCCTGG-3'（配列番号：124）

逆方向PCRプライマー（hcos2.R）：

5'-TCTCGGAGCGTCAACCACCTTGTCT-3'（配列番号：125）

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

ハイブリッド形成プローブ（hcos2.P）：

5'-CTGGATGCTGCCATTGAGTATAAGAAATGAGGCCATCA
CA-3'（配列番号：126）

【0193】

cDNAライブラリの構築のためのRNAはヒト胎児腎臓組織から単離した。cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSalIヘミキナーゼアダプターに結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、そして適

切なクローニングベクター（p R K B又はp R K D等；p R K 5 BはS f i I部位を含まないp R K 5 Dの前駆体である；H o l m e s等， S c i e n c e， 2 5 3： 1 2 7 8－1 2 8 0 （1 9 9 1）参照）に、独特のX h o I及びN o t I部位において、所定の方向でクローニングした。

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、DNA 4 7 4 6 5－1 5 6 1 [F i g 6 5、配列番号：6 5]の全長DNA配列；及びP R O 5 3 9の誘導タンパク質配列が得られた。

【0 1 9 4】

DNA 4 7 4 6 5－1 5 6 1の全コード化配列がF i g 6 5（配列番号：6 5）に含まれる。クローンDNA 4 7 4 6 5－1 5 6 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 8 6－1 8 8に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置2 6 7 6－2 6 7 8に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は8 3 0 アミノ酸長であり、約9 5，0 2 9ダルトンの見積もり分子量及び約8．2 6のp Iを持つ。F i g 6 6（配列番号：6 6）に示した全長P R O 5 3 9配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。F i g 6 6に示した全長P R O 5 3 9ポリペプチドの分析により以下の存在が明らかになった：約アミノ酸5 5 7～約アミノ酸5 7 9及び約アミノ酸7 9 4～アミノ酸8 1 6のロイシンジッパーパターン；約アミノ酸1 3 3～約アミノ酸1 3 7及び約アミノ酸3 8 3～約アミノ酸3 8 7のN－グリコシル化部位；約アミノ酸2 3 1～約アミノ酸6 7 2のキネシン関連タンパク質K i f－4 コイルド－コイルドメイン。クローンDNA 4 7 4 6 5－1 5 6 1は1 9 9 9年2月9日にA T C Cに寄託され、A T C C寄託番号2 0 3 6 6 1が付与された。

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

【0 1 9 5】

実施例 2 4

ヒトP R O 4 3 1 6をコードするc D N Aクローンの単離

ここでDNA 8 0 9 3 5と呼ばれるc D N Aクローンを、一次c D N Aクローンの5'末端を優勢に示すヒト腎臓c D N Aライブラリにおいて、酵母スクリーニングを使用して同定した。次いで、このc D N Aを他の公知のE S T配列と比較したが、比較はコンピュータプログラムB L A S T又はB L A S T 2（A l t s c h u l等， M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 2 6 6： 4 6 0－4 8 0 （1 9 9 6））を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、B L A S Tスコア7 0（9 0の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「p h r a p」（P h i l G r e e n， U n i v e r s i t y o f W a s h i n g t o n， S e a t t l e， W a s h i n g t o n）で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでDNA 8 3 5 2 7と命名する。

正方向P C Rプライマー：

5'－T G G A C G A C C A G G A G A A G C T G C－3'（配列番号：1 2 7）

逆方向P C Rプライマー：

5'－C T C C A C T T G T C C T C T G G A A G G T G G－3'（配列番号：1 2 8）

さらに、DNA 8 3 5 2 7コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリッド形成プローブ：

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

C A A G C G G - 3' (配列番号: 129)

【0196】

cDNAライブラリ構築のためのRNAは、ヒト副腎組織から単離した。cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSalIヘミキナーゼアダプターに結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター (pRK5B又はpRK5D等; pRK5BはSfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である; Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991) 参照) に、独特のXhoI及びNotI部位において、所定の方向でクローニングした。 10

【0197】

このスクリーニングから得た全長DNA94713-2561クローンをFig67 [配列番号: 67] に示し、それは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置293-295に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置1934-1936に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体 (Fig68、配列番号: 68) は547アミノ酸長である (Fig68)。Fig68に示す全長PRO4316は61,005ダルトンの見積もり分子量と約6.34のpIを持つ。Fig68 (配列番号: 68) に示した全長PRO4316配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおよそのものである。Fig68に示した全長PRO4316ポリペプチドの分析により以下の存在が明らかになった: 約アミノ酸1~約アミノ酸23のシグナル配列; 約アミノ酸42~約アミノ酸60及び約アミノ酸511~約アミノ酸530の膜貫通ドメイン; 約アミノ酸259~約アミノ酸263、約アミノ酸362~約アミノ酸366のN-グリコシル化部位; 約アミノ酸115~約アミノ酸119、約アミノ酸186~約アミノ酸190、約アミノ酸467~約アミノ酸471、及び約アミノ酸488~約アミノ酸494のカゼインキナーゼIIリン酸化部位; 約アミノ酸255~約アミノ酸261、約アミノ酸304~約アミノ酸310、及び約アミノ酸335~約アミノ酸341のN-ミリスチン化部位; 約アミノ酸7~約アミノ酸11及び約アミノ酸174~約アミノ酸178のアミド化部位。クローンDNA94713-2516は1999年3月9日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203835が付与された。Fig68 (配列番号: 68) に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース (バージョン35.45 SwissProt 35) の分析により、PRO4316アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の配列同一性が明らかにされた: YDA9_SCHPO, S67452, S69714, DP27_CAEEL, S47053, CEY43F8C_4, VP2_BRD, 及びSPCC895_9。 20 30

【0198】

実施例25

ヒトPRO4980をコードするcDNAクローンの単離 40
ここでDNA81573と呼ばれるcDNAクローンを、一次cDNAクローンの5'末端を優勢に示すヒトcDNAライブラリにおいて、酵母スクリーニングを使用して同定した。次いで、このcDNAを公的データベース (例えばGenBank) 及び企業のESTデータベース (LIFESeq (商品名)、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) からのESTと、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2 (Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)) を用いて比較した。ESTは、プログラム「phrap」 (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington) で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでDNA9061 50

3と命名する。

【0199】

ヒト大動脈上皮細胞 cDNAライブラリから、PRO4980の全長コード化配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するために、DNA90613配列に基づいてPCRプライマー（正及び逆）を合成した：

正方向PCRプライマー：

5'-CAACCGTATGGGACCGATACCTCG-3'（配列番号：130）

逆方向PCRプライマー：

5'-CACGCTCAACGAGTCTTCATG-3'（配列番号：131）

ハイブリッド形成プローブ：

5'-GTGGCCCTCGCAGTGCAGGCCCTTCTACGTCCAAATACAAGTG-3'（配列番号：132）

cDNAライブラリ構築のためのRNAは、ヒト大動脈上皮細胞組織から単離した。cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSalIヘミキナーゼアダプターに結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター（pRK5B又はpRK5D等；pRK5BはSfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である；Holmes等, Science, 253: 1278-1280（1991）参照）に、独特のXhoI及びNotI部位において、所定の方向でクローニングした。

【0200】

このスクリーニングから得た全長DNA97003-2649クローンをFig69〔配列番号：69〕に示し、それは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置286-288に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置1900-1902に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は538アミノ酸長である（Fig70）。Fig70に示す全長PRO4980は59,268ダルトンの見積もり分子量と約8.94のpIを持つ。Fig70（配列番号：70）に示した全長PRO4980配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は上記のようにおおよそのものである。Fig70に示した全長PRO4980ポリペプチドの分析により以下の存在が明らかになった：約アミノ酸1～約アミノ酸36のシグナル配列；約アミノ酸77～約アミノ酸95、約アミノ酸111～約アミノ酸133、約アミノ酸161～約アミノ酸184、約アミノ酸225～約アミノ酸248、約アミノ酸255～約アミノ酸273、約アミノ酸299～約アミノ酸314、約アミノ酸348～約アミノ酸373、約アミノ酸406～約アミノ酸421、約アミノ酸435～約アミノ酸456、及び約アミノ酸480～約アミノ酸497の膜貫通ドメイン；約アミノ酸500～約アミノ酸504のN-グリコシル化部位；約アミノ酸321～約アミノ酸325のcAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸13～約アミノ酸19、約アミノ酸18～約アミノ酸24、約アミノ酸80～約アミノ酸86、約アミノ酸111～約アミノ酸117、約アミノ酸118～約アミノ酸124、約アミノ酸145～約アミノ酸151、約アミノ酸238～約アミノ酸244、約アミノ酸251～約アミノ酸257、約アミノ酸430～約アミノ酸436、約アミノ酸433～約アミノ酸439、約アミノ酸448～約アミノ酸454、約アミノ酸458～約アミノ酸464、約アミノ酸468～約アミノ酸474、約アミノ酸475～約アミノ酸481、約アミノ酸496～約アミノ酸502、及び約アミノ酸508～約アミノ酸514のN-ミリスチル化部位；及び約アミノ酸302～約アミノ酸313の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位。クローンDNA97003-2649は1999年5月11日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-43が付与された。

Fig70（配列番号：70）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメ

ント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、PRO4980アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の配列同一性が明らかにされた：SC59_YEAST, S76857, CELF31F4_12, AC002464_1, NU5M_CHOCR, S59109, SAY10108_2, AF055482_2, F69049, 及びG70433。

【0201】

実施例26

遺伝子増幅

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

スクリーニングの出発物質は種々の癌から単離したゲノムDNAである。DNAは、例えば蛍光的に正確に定量化される。ネガティブ対照として、10の正常健常個体からDNAを単離し、それをプールして健常個体における遺伝子コピーのアッセイ対照として使用した（示さず）。5'ヌクレアーゼアッセイ（例えばTaqMan（商品名））及び実時間定量的PCR（例えば、ABI Prizm 7700 Sequence Detection System（商品名）（Perkin Elmer, applied Biosystems Division, Foster City, CA））を、或る種の癌で潜在的に増幅される遺伝子の発見に使用した。結果は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードするDNAがスクリーニングした原発肺又は大腸癌又は癌細

胞系又は乳癌細胞系で過剰表現されるか否かの決定に使用した。原発肺癌は、表2に示した型及び段階の腫瘍を持つ個体から得た。表2に列挙した原発腫瘍及びこの実施例を通して参照される細胞系の表示に使用した略語の説明は上記に与えた。

【0202】

TaqMan (商品名)の結果はデルタ(Δ)Ct単位で報告した。1単位は1PCRサイクル又は正常に対して約2倍の増幅に相当し、2単位は4倍、3単位は8倍増幅等々に相当する。定量化はプライマー及びPRO197-、PRO207-、PRO226-、PRO232-、PRO243-、PRO256-、PRO269-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO206-、PRO264-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO773-、PRO861-、PRO1216-、PRO1686-、PRO1800-、PRO3562-、PRO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO4980-コード化遺伝子から誘導したTaqMan (商品名)蛍光プローブを用いて得た。最も独特の核酸配列を含むと思われる、最もスプライシングされたイントロンを持たないと思われるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の領域が、プライマー及びプローブ誘導、例えば3-非翻訳領域のために好ましい。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980遺伝子増幅分析に使用されるプライマー及びプローブ(正、逆及びプローブ)の配列は次の通り：

【0203】

PRO197 (DNA 22780-1078) :

22780. tm. f :

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

22780. tm. p :

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

22780. tm. r :

5'-AGCCCCCTGCCTCAG-3' (配列番号: 135)

PRO207 (DNA 30879-1152) :

30879. tm. f :

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

30879. tm. p :

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

30879. tm. r :

5'-GGAATACTGTATTTATGTGGGATGGA-3' (配列番号: 138)

PRO226 (DNA 33460-1166) :

33460. 3utr-5 :

10

20

30

40

50

5' - G C A A T A A A G G G A G A A A G A A A G T C C T - 3' (配列番号: 139)

33460. 3utr-probe.rc:

5' - T G A C C C G C C C A C C T C A G C C A - 3' (配列番号: 140)

33460. 3utr-3b:

5' - G C C T G A G G C T T C C T G C A G T - 3' (配列番号: 141)

【0204】

PRO232 (DNA34435-1140):

34435. 3utr-5:

5' - G C C A G G C C T C A C A T T C G T - 3' (配列番号: 142)

34435. 3utr-probe:

5' - C T C C C T G A A T G G C A G C C T G A G C A - 3' (配列番号: 143)

34435. 3utr-3:

5' - A G G T G T T T A T T A A G G G C C T A C G C T - 3' (配列番号: 144)

PRO243 (DNA35917-1207):

35917. tm.f:

5' - C C A G T G C C T T T G C T C C T C T G - 3' (配列番号: 145)

35917. tm.p:

5' - T G C C T C T A C T C C C A C C C C C A C T A C C T - 3' (配列番号: 146)

35917. tm.r:

5' - T G T G G A G C T G T G G T T C C C A - 3' (配列番号: 147)

PRO256 (DNA35880-1160):

35880. 3utr-5:

5' - T G T C C T C C C G A G C T C C T C T - 3' (配列番号: 148)

35880. 3utr-probe:

5' - C C A T G C T G T G C G C C C A G G G - 3' (配列番号: 149)

35880. 3utr-3:

5' - G C A C A A A C T A C A C A G G G A A G T C C - 3' (配列番号: 150)

【0205】

PRO269 (DNA38260-1180):

38260. tm.f:

5' - C A G A G C A G A G G G T G C C T T G - 3' (配列番号: 151)

38260. tm.p:

5' - T G G C G G A G T C C C C T C T T G G C T - 3' (配列番号: 152)

38260. tm.r:

5' - C C C T G T T T C C C T A T G C A T C A C T - 3' (配列番号: 153)

PRO274 (DNA39987-1184):

39987. tm.f:

5' - G G A C G G T C A G T C A G G A T G A C A - 3' (配列番号: 154)

39987. tm.p:

5' - T T C G G C A T C A T C T C T T C C C T C T C C C - 3' (配列番号: 155)

39987. tm.r:

5' - A C A A A A A A A G G G A A C A A A A T A C G A - 3' (配列番号: 156)

PRO304 (DNA39520-1217):

39520. tm.f:

5' - T C A A C C C C T G A C C C T T T C C T A - 3' (配列番号: 157)

10

20

30

40

50

3 9 5 2 0. t m. p :

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

3 9 5 2 0. t m. r :

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

【0 2 0 6】

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

4 3 4 6 6. t m. f 1 :

5' - G G G C C C T A A C C T C A T T A C C T T T - 3' (配列番号: 1 6 0)

4 3 4 6 6. t m. p 1 :

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

4 3 4 6 6. t m. r :

5' - T C T G T C C A C C A T C T T G C C T T G - 3' (配列番号: 1 6 2)

PRO 1 5 5 8 (DNA 7 1 2 8 2 - 1 6 6 8) :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5' - T C A G G G T C T A C A T C A G C C T C C T G C - 3' (配列番号: 1 6 7)

)

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

5' - A A G G C C A A G G T G A G T C C A T - 3' (配列番号: 1 6 8)

PRO 7 7 9 (DNA 5 8 8 0 1 - 1 0 5 2) :

5 8 8 0 1. t m. f 1 :

5' - C C C T A T C G C T C C A G C C A A - 3' (配列番号: 1 6 9)

5 8 8 0 1. t m. p 1 :

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

7 0)

5 8 8 0 1. t m. r 1 :

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

)

【0 2 0 7】

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

6 2 8 8 1. t m. f 1 :

5' - A C A G A T C C A G G A G A G A C T C C A C A - 3' (配列番号: 1 7 2)

6 2 8 8 1. t m. p 1 :

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

6 2 8 8 1. t m. r 1 :

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

PRO 1 2 4 5 (DNA 6 4 8 8 4 - 1 5 2 7) :

6 4 8 8 7. t m. f 1 :

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

6 4 8 8 7. t m. p 1 :

5' - C A G G G C C T T C A G G G C C T T C A C - 3' (配列番号: 1 7 6)

6 4 8 8 7. t m. r 1 :

10

20

30

40

50

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

64887. tm. f2:

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

64887. tm. p2:

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

64887. tm. r2:

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

PRO1759 (DNA76531-1701):

76531. tm. f1:

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

76531. tm. p1:

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

76531. tm. r1:

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

【0208】

PRO5775 (DNA96869-2673):

96869. tm. f1:

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

96869. tm. p1:

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

96869. tm. r1:

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

PRO7133 (DNA128451-2739):

128451. tm. f1:

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

128451. tm. p1:

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

128451. tm. r1:

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

PRO7168 (DNA102846-2742):

102846. tm. f1:

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

102846. tm. p1:

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

102846. tm. r1:

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

【0209】

PRO5725 (DNA92265-2669):

92265. tm. f1:

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

92265. tm. p1:

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

92265. tm. r1:

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

PRO202 (DNA30869):

30869. tm. f:

10

20

30

40

50

5' - C G G A A G G A G G C C A A C C A - 3' (配列番号: 196)

30869. tm. p:

5' - C G A C A G T G C C A T C C C C A C C T T C A - 3' (配列番号: 197)

30869. tm. r:

5' - T T C T T T C T C C A T C C C T C C G A - 3' (配列番号: 198)

PRO206 (DNA34405):

34405. tm. f:

5' - G C A T G G C C C C A A C G G T - 3' (配列番号: 199)

34405. tm. p:

5' - C A C G A C T C A G T A T C C A T G C T C T T G A C C T T G T - 3' (配列番号: 200)

34405. tm. r:

5' - T G G C T G T A A A T A C G C G T G T T C T - 3' (配列番号: 201)

【0210】

PRO264 (DNA36995):

36995. 3utr-5:

5' - C C T G T G A G A T T G T G G A T G A G A A G A - 3' (配列番号: 202)

36995. 3utr-probe:

5' - C C A C A C C A G C C A G A C T C C A G T T G A C C - 3' (配列番号: 203)

36995. 3utr-3:

5' - G G G T G G T G C C C T C C T G A - 3' (配列番号: 204)

PRO313 (DNA43320):

43320. tm. f:

5' - C C A T T G T T C A G A C G T T G G T C A - 3' (配列番号: 205)

43320. tm. p:

5' - C T C T G T T A A C T C T A A G A T T C C T A A G G C A T G C T G T G T C - 3' (配列番号: 206)

43320. tm. r:

5' - A T C G A G A T A G C A C T G A G T T C T G T C G - 3' (配列番号: 207)

PRO342 (DNA38649):

38649. tm. f:

5' - C T C G G C T C G C G A A A C T A C A - 3' (配列番号: 208)

38649. tm. p:

5' - T G C C C G C A C A G A C T T C T A C T G C C T G - 3' (配列番号: 209)

38649. tm. r:

5' - G G A G C T A C A T A T C A T C C T T G G A C A - 3' (配列番号: 210)

38649. tm. f2:

5' - G A G A T A A A C G A C G G G A A G C T C T A C - 3' (配列番号: 211)

38649. tm. p2:

5' - A C G C C T A C G T C T C C T A C A G C G A C T G C - 3' (配列番号: 212)

38649. tm. r2:

5' - G C T G C G G C T T T A G G A T G A A G T - 3' (配列番号: 213)

【0211】

30

50

PRO 542 (DNA 56505) :

56505. tm. f1 :

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

56505. tm. p1 :

5' - TGC TGC TCAGGCCCATGCTATGAGT - 3' (配列番号 : 215)

56505. tm. r1 :

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

PRO 773 (DNA 48303) :

48303. tm. f1 :

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

48303. tm. p1 :

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

48303. tm. r1 :

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

PRO 861 (DNA 50798) :

50798. tm. f1 :

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

50798. tm. p1 :

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

50798. tm. r1 :

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

【0212】PRO 1216 (DNA 66489) :

66489. tm. f1 :

5' - CTA ACTGCCCCAGCTCCAAAGAA - 3' (配列番号 : 223)

66489. tm. p1 :

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

66489. tm. r1 :

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

PRO 1686 (DNA 80896) :

80896. tm. f1 :

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

80896. tm. p1 :

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

80896. tm. r1 :

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

PRO 1800 (DNA 35672-2508) :

35672. tm. f1 :

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

35672. tm. p1 :

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

35672. tm. r1 :

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

10

20

30

40

50

【0213】

PRO3562 (DNA96791) :

96791. tm. f1 :

5' - G A C C C A C G C G C T A C G A A - 3' (配列番号 : 232)

96791. tm. p1 :

5' - C G G T C T C C T T C A T G G A C G T C A A C A G - 3' (配列番号 : 233)

96791. tm. r1 :

5' - G G T C C A C G G T T C T C C A G G T - 3' (配列番号 : 234)

PRO9850 (DNA58725) :

58725. tm. f1 :

5' - A T G A T T G G T A G G A A A T G A G G T A A A G T A C T - 3' (配列番号 : 235)

58725. tm. p1 :

5' - C C A T C T T T C T C T G G C A C A T T G A G G A A C T G - 3' (配列番号 : 236)

58725. tm. r1 :

5' - T G A T C T A G A A C T T A A A C T T T G G A A A A C A A C - 3' (配列番号 : 237)

PRO539 (DNA47465-1561) :

. tm. f1 :

5' - T C C C A C C A C T T A C T T C C A T G A A - 3' (配列番号 : 238)

47465. tm. p1 :

5' - A T T G T C C T G A G A T T C G A G C A A G A - 3' (配列番号 : 239)

47465. tm. r1 :

5' - C T G T G G T A C C C A A T T G C C G C C T T G T - 3' (配列番号 : 240)

【0214】

PRO4316 (DNA94713-2561) :

94713. tm. f1 :

5' - G G T C A C C T G T G G G A C C T T - 3' (配列番号 : 241)

94713. tm. p1 :

5' - T G C A C C T G A C A G A C A A A G C - 3' (配列番号 : 242)

94713. tm. r1 :

5' - T C C C T C A C T C C C C T C C C T C C T A G T - 3' (配列番号 : 243)

PRO4980 (DNA97003-2649) :

97003. tm. f1 :

5' - A A G C C T T T G G G T C A C A C T C T - 3' (配列番号 : 244)

97003. tm. p1 :

5' - T G G T C C A C T G T C T C G T T C A - 3' (配列番号 : 245)

97003. tm. r1 :

5' - C G G A G C T T C C T G T C C C T T T T C T G - 3' (配列番号 : 246)

【0215】

5' ヌクレアーゼアッセイ反応は蛍光PCRベースの技術であり、実時間での増幅監視のための Taq DNA ポリメラーゼ酵素の 5' エキソヌクレアーゼ活性を使用する。PCR 反応に典型的な単位複製配列の生成に 2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用した。第3のオリゴヌクレオチド、又はプローブは、2つのPCRプライマーの間に位置する核酸配列を検出するために設計された。プローブは Taq DNA ポリメラーゼ酵素により非

10

20

30

40

50

伸展性であり、レポーター蛍光染料及び消光剤蛍光染料で標識される。2つの染料がプローブ上に接近して位置する場合、レポーター染料からのレーザー誘導発光は消光染料によって消光される。増幅反応の間、プローブはT A Q D N Aポリメラーゼ酵素によりテンプレート依存的方式で切断される。得られたプローブ断片は溶液中に解離し、放出されたレポーター染料からのシグナルは第2のフルオロホアからの消光効果を受けない。レポーター染料の一分子は、新たに合成された各分子について標識され、非消光レポーター染料の検出がデータの定量的解釈の基礎を提供する。

5'ヌクレアーゼ法は、A B I P r i s m 7700TM配列検出などの実時間定量的PCR装置で実施される。系は温度サイクル器、レーザー、電荷結合装置(C C D)カメラ及びコンピュータからなる。系は温度サイクル器上で96ウェルでの試料を増幅させる。増幅中に、レーザー誘導蛍光シグナルは光ファイバーケーブルで96ウェルに集められ、C C Dで検出される。系は装置の実行及びデータの分析のためのソフトウェアを含む。

5'ヌクレアーゼアッセイデータは、最初はC t又は境界サイクルで表現される。これは、レポーターシグナルが蛍光のバックグラウンドを越えて蓄積されるサイクルとして定義される。 $\Delta C t$ 値は核酸試料における特定の標的配列の種発コピー相対数の定量的尺度として使用した。

表2は、本発明のP R O 1 9 7、P R O 2 0 7、P R O 2 2 6、P R O 2 3 2、P R O 2 4 3、P R O 2 5 6、P R O 2 6 9、P R O 2 7 4、P R O 3 0 4、P R O 3 3 9、P R O 1 5 5 8、P R O 7 7 9、P R O 1 1 8 5、P R O 1 2 4 5、P R O 1 7 5 9、P R O 5 7 7 5、P R O 7 1 3 3、P R O 7 1 6 8、P R O 5 7 2 5、P R O 2 0 2、P R O 2 0 6、P R O 2 6 4、P R O 3 1 3、P R O 3 4 2、P R O 5 4 2、P R O 7 7 3、P R O 8 6 1、P R O 1 2 1 6、P R O 1 6 8 6、P R O 1 8 0 0、P R O 3 5 6 2、P R O 9 8 5 0、P R O 5 3 9、P R O 4 3 1 6又はP R O 4 9 8 0化合物のスクリーニングに用いた種々の原発腫瘍の段階(s t a g e)、T段階及びN段階を記載する。

【0216】

表 6
原発肺及び結腸腫瘍プロフィール

原発腫瘍	時期	他の時期	デュークス時期	T時期	N時期
ヒト 肺 腫瘍 AdenoCa (SRCC724) [LT1]	IIA			T1	N1
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC725) [LT1a]	IIB			T3	N0
ヒト 肺 腫瘍 AdenoCa (SRCC726) [LT2]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 AdenoCa (SRCC727) [LT3]	IIIA			T1	N2
ヒト 肺 腫瘍 AdenoCa (SRCC728) [LT4]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC729) [LT6]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 Aden/SqCCa (SRCC730) [LT7]	IA			T1	N0
ヒト 肺 腫瘍 AdenoCa (SRCC731) [LT9]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC732) [LT10]	IIB			T2	N1
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC733) [LT11]	IIA			T1	N1
ヒト 肺 腫瘍 AdenoCa (SRCC734) [LT12]	IV			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 AdenoSqCCa (SRCC735) [LT13]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC736) [LT15]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC737) [LT16]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC738) [LT17]	IIB			T2	N1
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC739) [LT18]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC740) [LT19]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 LCCa (SRCC741) [LT21]	IIB			T3	N1
ヒト 肺 AdenoCa (SRCC811) [LT22]	IA			T1	N0
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC742) [CT2]		M1	D	pT4	N0
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC743) [CT3]			B	pT3	N0
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC 744) [CT8]			B	T3	N0
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC745) [CT10]			A	pT2	N0
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC746) [CT12]		MO, R1	B	T3	N0
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC747) [CT14]		pMO, RO	B	pT3	pN0
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC748) [CT15]		M1, R2	D	T4	N2
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC749) [CT16]		pMO	B	pT3	pN0
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC750) [CT17]			C1	pT3	pN1
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC751) [CT1]		MO, R1	B	pT3	N0
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC752) [CT4]			B	pT3	M0
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC753) [CT5]		G2	C1	pT3	pN0
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC754) [CT6]		pMO, RO	B	pT3	pN0
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC755) [CT7]		G1	A	pT2	pN0
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC756) [CT9]		G3	D	pT4	pN2
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC757) [CT11]			B	T3	N0
ヒト 大腸 AdenoCa (SRCC758) [CT18]		MO, RO	B	pT3	pN0

10

20

30

40

50

【0217】

DNA調製：

DNAは培養した細胞系、原発腫瘍、正常ヒト血液から調製した。単離は、全てQ u i a g e nからの、精製キット、バッファースセット及びプロテアーゼを用い、製造者の指示と下記に従って実施した。

細胞培養溶解：

細胞を洗浄し、チップ当たり 7.5×10^8 の濃度でトリプシン化し、 4°C で5分間1000rpmで遠心分離してペレット化し、次いで1/2容量のPBS再遠心で洗浄した。ペレットを3回洗浄し、懸濁細胞を回収して2xPBSで洗浄した。次いで細胞を10mLのPBSに懸濁させた。バッファーC1を 4°C で平衡化させた。Q u i a g e nプロテアーゼ#19155を6.25mlの冷ddH₂Oで最終濃度20mg/mlまで希釈して 4°C で平衡化させた。10mLのG2バッファーを、Q u i a g e nRNAseAストック(100mg/ml)を200μg/mlの最終濃度まで希釈して調製した。

バッファーC1(10ml、 4°C)及びddH₂O(40ml、 4°C)を、次いで10mlの細胞懸濁物に添加し、反転させて混合し、氷上で10分間インキュベートした。細胞核をB e c k m a nスイングバケットロータで 4°C において2500rpmで15分間遠心分離することによりペレット化した。上清を捨て、核をボルテックスしながら2mlの

バッファー C1 (4℃) 及び 6 ml の ddH₂O に懸濁し、1 秒後に 4℃ において 2500 rpm で 15 分間遠心分離した。次いで核を残りのバッファー中にチップ当たり 200 µl を用いて再懸濁した。G2 バッファー (10 ml) を懸濁した核に添加しながら緩いボルテックスを適用した。バッファー添加が完了したら、強いボルテックスを 30 秒間適用した。QuiaGen プロテアーゼ (200 µl 上記のように調製) を添加し、50℃ で 60 分間インキュベートした。インキュベーション及び遠心分離を、溶解物が透明になるまで繰り返した (例えば、さらに 30-60 分間インキュベートし、4℃ で 10 分間 3000 x g でペレット化する)。

【0218】

固体ヒト腫瘍試料の調製及び溶解：

腫瘍試料を秤量し 50 ml のコニカル管に配して氷上に保持した。加工は調製当たり 250 mg の組織未満に制限した (1 チップ/調製)。プロテアーゼ溶液を 6.25 ml の冷 ddH₂O 中に最終濃度 20 mg/ml まで希釈することにより新たに調製して 4℃ で貯蔵した。DNAse A を最終濃度 200 mg/ml まで希釈することにより G2 バッファー (20 ml) を調製した (100 mg/ml のストックから)。エアロゾルの吸入を避けるために層流フード内でポリトロン of の大きなチップを用いて、腫瘍組織を 19 ml の G2 バッファー中で 60 秒間均一化し、室温に保持した。試料間で、各々 2 L の ddH₂O で 2 x 30 秒間、次いで G2 バッファー (50 ml) でスピンさせることによりポリトロンを透明化した。組織がジェネレータチップ上に存在する場合は、装置を分解して清浄化した。

QuiaGen プロテアーゼ (上記の用に調製、1.0 ml) を添加し、次いでボルテックスして 50℃ で 3 時間インキュベートした。インキュベーション及び遠心分離を、溶解物が透明になるまで繰り返した (例えば、さらに 30-60 分間インキュベートし、4℃ で 10 分間 3000 x g でペレット化する)。

【0219】

ヒト血液調製及び溶解：

健常なボランティアから標準的な感染薬プロトコールを用いて血液を採りだし、チップ当たり 10 ml の試料にクエン酸化した。QuiaGen プロテアーゼを 6.25 ml の冷 ddH₂O 中に最終濃度 20 mg/ml まで希釈することにより新たに調製して 4℃ で貯蔵した。DNAse A を 100 mg/ml のストックから最終濃度 200 µg/ml まで希釈することにより G2 バッファー (20 ml) を調製した。血液 (10 ml) を 50 ml のコニカル管に配し、10 ml の C1 バッファー及び 30 ml の ddH₂O (ともに 4℃ で平衡化したもの) を添加し、反転させて混合して氷上に 10 分間保持した。Beckman スイングバケットローターで、4℃ において 2500 rpm で 15 分間核をペレット化し、上清を捨てた。ボルテックスしながら、核を 2 ml の C1 バッファー (4℃) 及び 6 ml の ddH₂O (4℃) 中に懸濁させた。ボルテックスはペレットが白くなるまで繰り返した。次いで核を残りのバッファー中に 200 µl チップを用いて懸濁させた。G2 バッファー (10 ml) を懸濁核に添加しながら緩くボルテックスし、次いで 30 秒間強くボルテックスした。QuiaGen プロテアーゼを添加 (200 µl) し、50℃ で 60 分間インキュベートした。インキュベーション及び遠心分離を、溶解物が透明になるまで繰り返した (例えば、さらに 30-60 分間インキュベートし、4℃ で 10 分間 3000 x g でペレット化する)。

【0220】

透明化溶解物の精製：

(1) ゲノム DNA の単離：

ゲノム DNA を 10 ml の QBT バッファーで平衡化した (最大チップ調製当たり 1 試料)。QF 溶離バッファーを 50℃ で平衡化した。試料を 30 秒間ボルテックスし、次いで平衡化チップに負荷して重力により排液した。チップを 2 x 15 ml の QC バッファーで洗浄した。DNA を、30 ml のシラン化したオートクレーブ 30 ml Cortex 管に 15 ml の QF バッファー (50℃) で溶離した。イソプロパノール (10.5 ml) を

10

20

30

40

50

各試料に添加し、管をパラフィンで被覆し、DNAが沈殿するまで繰り返し反転させて混合した。試料を、SS-34ロータで4℃において15,000rpmで10分間遠心分離してペレット化した。ペレット位置をマークして上清を捨て、10mlの70%エタノール(4℃)を添加した。試料を、SS-34ロータで4℃において10,000rpmで10分間遠心分離して再度ペレット化した。ペレット位置をマークして上清を捨てた。次いで管を乾燥棚の各面に置き、37℃で10分間乾燥させたが、使用の過剰乾燥には注意した。

乾燥後、ペレットを1.0mlのTE(pH8.5)に溶解し、50℃に1-2時間置いた。試料を4℃に終夜保持して溶解を続けた。次いでDNA溶液を、ツベルクリンシリンジ上に26ゲージの針を具備する1.5ml管に移した。DNAを剪断するために移行を5x繰り返した。次いで試料を50℃に1-2時間置いた。

10

【0221】

(2)ゲノムDNAの定量及び遺伝子増幅アッセイのための調製:

各管のDNAレベルを1:20希釈(5μl DNA+95μl ddH₂O)での標準的なA₂₆₀、A₂₈₀分光分析により、Beckman DU640分光光度計の0.1ml石英キュベットを用いて定量した。A₂₆₀/A₂₈₀比率は1.8-1.9の範囲であった。次いで各DNA試料をTE(pH8.5)中に約200ng/mlまで希釈した。最初の材料が高濃度(約700ng/μl)である場合、材料を50℃に再懸濁するまで数時間置いた。

次いで、希釈した材料(20-600ng/ml)に対して、製造者の指示を以下のように改変して蛍光DNA定量化を実施した。これは、Hoeffer DyNA Quant 200蛍光計を約15分間暖めて実施した。Hoechst染料作業溶液(#H33258、10μl、使用の12時間以内に調製)を100mlの1xTNEバッファーに希釈した。2mlキュベットを蛍光計溶液で満たし、機械に配し、機械をゼロ調節した。pGEM3Zf(+)(2μl、ロット#360851026)を2mlの蛍光計溶液に添加して200単位で校正した。次いで、さらに2μlのpGEM3Zf(+)DNAを試験し、400+/-10単位で読みを確認した。次いで各試料を少なくとも3回読んだ。3試料が互いに10%以内であることが見られたとき、それらの平均をとり、この値を定量化値として用いた。

20

次いで、蛍光測定で決定した濃度を、各試料をddH₂O中に10ng/μlまで希釈するのに用いた。これは、1回のTaqManプレートアッセイについて全てのテンプレート試料について同時に行い、500-1000アッセイを実施するのに十分な材料で行った。試料は、Taqman(商品名)プライマー及びプローブで3回試験し、B-アクリン及びGAPDHともに正常なヒトDNAを持ちテンプレート対照を持たない単一のプレート上にある。希釈した試料を用いたが、試験DNAから減算した正常ヒトDNAのCT値は+/-1CTであった。希釈した、ロット定性化したゲノムDNAを、1.0mlアリコートで-80℃において保存した。続いて遺伝子増幅アッセイに使用するアリコートは、4℃で保存した。各1mlのアリコートは、8-9プレート又は64試験に十分である。

30

【0222】

遺伝子増幅アッセイ:

本発明のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980化合物を以下の原発腫瘍でスクリーニングし、得られたΔCt値を表3に報告する。

40

【0223】

50

表 7A
肺及び大腸原発腫瘍及び細胞系モデルにおけるΔCt値

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
HF-000 631	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 641	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 643	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 840	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.39	1.51	---	---
HF-000 842	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.24	---	---	---
HBL100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MB435s	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T47D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MB468	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MB175	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
MB361														
BT20														
MCF7														
SKBR3														
SW480		1.85	2.14									1.87 1.56		
SW620		1.96	2.67			1.23						1.13 1.38 1.21		
Colo320		1.09										1.18		
HT29			2.15			1.58						1.03 1.90		
HM7			1.23									1.33		

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
WiDr	---	---	2.21	---	---	1.35	---	---	---	---	---	1.35	---	---
HCT116	---	1.83	2.13	---	---	1.35	---	---	---	---	---	2.24 1.70	---	---
SKCO1	---	1.13	1.94	---	---	---	---	---	---	---	---	1.11	---	---
SW403	---	---	1.81	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LS174T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.18	---	---
Colo205	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HCT15	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HCC 2998	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
KM12	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A549	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

10

20

30

40

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
Calu-1														
Calu-6														
H157														
H441														
H460														
SKMES1														
SW900														
H522														1.10
H810														
SRCC 1094														
SRCC 1095														
SRCC 1096														

10

20

30

40

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
SRCC 1097														
SRCC 1098														
SRCC 1099														
SRCC 1100														
SRCC 1101														
HF-000 545														
HF-000 499														
HF-000 539														
HF-000 575														
HF-000 698														

10

20

30

40

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
HF-000 756	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 762	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 789	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 795	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.01	---	---	---
HF-000 811	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 755	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT2	---	---	1.15	---	---	---	---	---	---	---	---	1.83 2.41 2.28 2.91	1.73	---
CT3	---	1.29	1.26	---	---	---	---	---	---	---	---	1.06 1.14 1.72	---	---
CT8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.01 1.03 1.20	---	---

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
CT10	---	1.33	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.03	---	---
CT12	---	---	1.20	---	---	---	---	---	---	---	---	1.05 1.15	---	---
CT14	---	---	1.38	---	1.14	---	---	---	---	---	---	1.01 1.14 1.20	---	---
CT15	---	1.26	1.07	---	---	---	---	---	---	---	---	1.14 1.12 1.05	---	1.00
CT16	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.14 1.22	---	---
CT17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.12 1.17	---	---
CT1	---	1.10	---	2.41	---	---	---	---	---	---	---	1.02 1.69 1.54 1.28 1.15	---	---
CT4	---	1.13	1.11	2.05	---	---	---	---	---	---	---	1.19 1.22 1.12	---	---
												1.62		

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
CT5	---	1.14	1.12	1.59	1.17	---	---	---	---	---	---	2.02 2.24 2.32 2.36 1.75	---	---
CT6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.17	---	---
CT7	---	---	---	1.00	---	---	---	---	---	---	---	1.00 1.04	---	---
CT9	---	---	---	1.13	---	---	---	---	---	---	---	1.05	---	---
CT11	---	1.32	1.35	1.92	---	---	---	---	---	---	---	1.27 1.73 1.82 1.89 1.93 1.43	---	---
CT18	---	---	---	1.29	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT25	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT28	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT35	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 611	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
HF-000 613	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1291	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1293	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1294	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.50	---	---	---	---
HF-00 1295	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1296	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2.88	---	---	---	---
HF-00 1297	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1299	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.37	---	---	---	---
HF-00 1300	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT7	---	---	1.12	---	---	---	1.04	---	---	1.08	---	---	---	---
LT27	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
LT13	1.40	1.26 1.29	1.10 1.10	---	1.05	---	1.27	---	1.29	1.04	---	1.69 2.79 2.42 1.44	---	3.84
LT1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT3	1.50	1.14	1.59	---	1.08	---	---	---	---	1.17	---	1.65 1.19 1.17	1.01	---
LT4	---	---	1.11	---	---	---	---	1.24	---	---	---	---	---	---
LT9	1.25	---	1.36	---	---	---	1.80	---	---	1.03	---	1.27	---	---
LT12	---	---	---	2.40	1.20	---	1.14	---	1.15	1.26	---	1.03 2.09 1.99 1.20	---	---
LT22	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT30	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.58	---
LT33	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
LT21	1.10	1.12	1.17	---	---	---	---	---	---	---	---	1.00	---	---
LT1a	---	---	1.39	---	---	---	---	---	---	---	---	1.46 1.04	---	---
LT6	1.39	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.75 1.25	---	---
LT10	1.03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.50	---	---
LT11	1.65	1.33 1.59	1.28 1.01	---	1.34	---	1.14	---	1.51	1.39	---	1.77 1.39 1.48	---	---
LT15	1.22	1.22 1.18	1.04	1.86	2.34 1.72	---	1.36	---	1.34	---	---	2.50 3.73 3.31 1.89	---	1.01
LT16	---	---	---	---	1.24 1.64	---	---	1.00	1.00	---	---	1.89 1.50 1.38	---	1.98
LT17	1.68	1.32 1.57	1.26 1.57	1.35	1.27	---	1.42	---	1.68	1.63	---	1.08 1.95 1.51 1.50	---	---
LT18	---	---	---	1.04	---	---	---	1.61	---	---	---	1.00	---	---

【 0 2 3 4 】

10

20

30

40

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
LT19	---	1.16 1.58	1.08 1.25	1.21	1.39	---	1.60	---	1.15	---	---	3.49 3.21 3.73	---	---
LT26	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.66	---
LT28	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT29	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT31	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 854	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 855	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 856	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 831	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 832	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 550	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

原発腫瘍	PRO197	PRO207	PRO226	PRO232	PRO243	PRO256	PRO269	PRO274	PRO304	PRO339	PRO1558	PRO779	PRO1185	PRO1245
551														
HF-000 733														
HF-000 716														

表 7B
肺及び大腸原発腫瘍及び細胞系モデルにおけるΔCt値

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
HF-000 631	1.97 1.70			1.43										
HF-000 641	1.90 1.87				1.17 1.03									
HF-000 643	1.13 1.21													
HF-000 840	1.11 3.64 3.55		2.11	2.65	1.82 2.20 1.99					1.35				
HF-000 842	2.56 2.42 2.12 2.88			1.73						1.13				
HBL100											1.20			
MB435s														
T47D														
MB468														
MB175														
MB361														

【 0 2 3 7 】

10

20

30

40

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
BT20	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MCF7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.14	---	---	---
SKBR3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SW480	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.35	---	---	---
SW620	---	---	---	---	---	---	---	---	1.03	2.09	1.17 1.13	---	---	---
Colo320	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.31	---	---
HT29	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	3.08 2.59 3.24 2.68 2.77	1.97	---	---
HM7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
WiDr	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	3.35 3.15 2.59 2.94 3.03 2.99	---	---	2.42
HCT116	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2.09 2.01	---	---	1.71

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
											2.12 1.87 1.98 2.07			
SKCO1											1.71 2.00 1.97 1.64 1.82			
SW403											1.73 1.15 1.64 1.17 1.51 1.28			1.14
LS174T										1.13	1.41			1.16
Colo205												1.41		
HCT15														
HCC 2998														
KM12														
A549														

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
Calu-1										1.21				
Calu-6														
H157														
H441										1.65	1.15	1.51	1.71	
H460														
SKMES1														
SW900														
H522													1.02	
H810														
SRCC 1094														
SRCC 1095														
SRCC 1096														
SRCC 1097														
SRCC														

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
1098														
SRCC 1099														
SRCC 1100														
SRCC 1101														
HF-000 545														
HF-000 499														
HF-000 539														
HF-000 575														
HF-000 698														
HF-000 756														
HF-000		2.01												
					1.26									

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
762		1.04			1.04									
HF-000 789	---	1.30 1.12	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 795	1.32	---	1.08	---	1.02 1.28 1.10	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 811	---	1.82 1.80	1.09	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-000 755	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CT2	---	---	---	---	---	---	1.21	---	1.75	3.04	---	---	2.40 2.35	---
CT3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.21	---	---	1.52 1.39	---
CT8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.21	---	---	1.55	---
CT10	---	---	---	---	---	---	1.06	---	---	1.81	1.13	---	1.97 1.33	---
CT12	---	---	---	---	---	---	1.06	---	---	1.41	1.08 1.17	---	1.36	1.18
CT14	---	---	---	---	---	---	1.29	---	---	1.61	1.41	---	1.75	---

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
													1.17	
CT15							1.32			1.41		1.04	1.75	
CT16							1.59			1.39		1.37	1.11	
CT17										1.19		1.34	1.11	
CT1									1.28	1.61			1.09 1.22	
CT4									1.57	1.58			1.16	
CT5							1.23		2.01	2.29	1.06		1.95	1.21
CT6										1.20				
CT7													1.14	
CT9									1.56	1.00	1.03		1.00	
CT11									2.12	2.27			1.88	
CT18							1.33							
CT25														
CT28														
CT35														
HF-000														

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
611														
HF-000 613	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1291	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1293	---	2.12 2.09	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1294	---	2.15 1.99	---	---	---	---	---	---	---	1.57	---	---	---	---
HF-00 1295	---	1.99 2.15	---	---	1.10	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1296	1.51	4.62 4.78	1.71	---	1.22	---	---	---	---	3.15	---	---	---	---
HF-00 1297	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1299	---	1.92 1.95	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HF-00 1300	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT7	---	---	---	---	---	1.50	---	---	---	1.25	1.11	---	---	1.15

10

20

30

40

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO364	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
						1.79								
LT27	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT13	---	---	---	---	---	1.64	---	---	---	1.34 2.85 2.12	1.38	2.98	1.33	---
LT1	---	---	---	---	---	1.29 1.15	---	---	---	---	---	---	---	---
LT2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT3	---	---	---	---	---	1.67 1.66	---	1.82	---	1.89 1.71	---	---	---	---
LT4	---	---	---	---	---	1.21	---	1.43	---	---	---	---	---	---
LT9	---	---	---	---	---	1.30	---	1.13	1.19	1.51	---	---	---	---
LT12	---	---	---	---	---	1.73	---	---	1.03	2.02 1.74	1.31 1.41	---	1.18 1.38	1.02
LT22	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT30	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT33	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LT8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.00	---

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
LT21	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.00	1.19	---	---	---
LT1a	---	---	---	---	---	1.26 1.24	---	1.28	---	1.72 1.29	---	---	1.19	---
LT6	---	---	---	---	---	1.75 1.34	---	1.62	---	2.01	---	---	---	---
LT10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2.02 1.06	2.79	---	---	---
LT11	---	---	---	---	---	1.31	---	---	---	1.08 1.88 1.93	---	---	1.03	---
LT15	---	---	---	---	---	1.63	---	---	---	2.12 3.16 2.80	---	---	1.28	---
LT16	---	---	---	---	---	1.30	---	---	2.48	1.05	1.32	2.19	1.33	---
LT17	---	---	---	---	---	1.74	---	1.72	---	1.12 2.26 1.77	1.00 1.45	---	---	---
LT18	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.21	---	---	---
LT19	---	---	---	---	---	1.98	---	---	2.10	3.47 3.02	1.35	---	---	---

10

20

30

40

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
LT26														
LT28														
LT29														
LT31														
HF-000 854														
HF-000 855														
HF-000 856														
HF-000 831														
HF-000 832														
HF-000 550														
HF-000 551														
HF-000 733														

10

20

30

40

原発腫瘍	PRO1759	PRO5775	PRO7133	PRO7168	PRO5725	PRO202	PRO206	PRO264	PRO313	PRO342	PRO542	PRO773	PRO861	PRO1216
HF-000 716														

表 7C
肺及び大腸原発腫瘍及び細胞系モデルにおけるΔCt値

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
HF-000631	1.61						
HF-000641							
HF-000643							
HF-000840	1.61		1.87			2.34	1.01
HF-000842	1.11						
HBL100							
MB435s							
T47D							
MB468							
MB175							
MB361							
BT20							
MCF7							
SKBR3							
SW480							
SW620			1.08				

【 0 2 4 9 】

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
Colo320		1.16					
HT29							
HM7							
WiDr							
HCT116			1.26 1.15				
SKCOI							
SW403							
LS174T							
Colo205							
HCT15							
HCC2998							
KM12							
A549							
Calu-1							
Calu-6							
H157							

10

20

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
H441	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
H460	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SKMES1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SW900	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
H522	0.000	0.000	2.93	0.000	0.000	0.000	0.000
H810	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SRCC 1094	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SRCC 1095	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SRCC 1096	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SRCC 1097	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SRCC 1098	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SRCC 1099	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SRCC							

【 0 2 5 1 】

10

20

30

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
1100							
S RCC 1101							
HF-000545			1.05				
HF-000499							
HF-000539			2.10				
HF-000575							
HF-000698							
HF-000756							
HF-000762							
HF-000789							
HF-000795	1.13					1.06	
HF-000811							
HF-000755							
CT2	1.38	1.50					
CT3					1.17		
CT8							

【 0 2 5 2 】

10

20

30

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
CT10	1.32	---	---	1.10	1.16	---	---
CT12	1.20	---	---	---	1.19	---	---
CT14	---	1.62	---	---	---	---	---
CT15	---	1.48 1.08	1.01	1.23	1.03	---	---
CT16	---	---	---	1.49	---	---	---
CT17	---	---	---	---	---	---	---
CT1	1.50	---	---	1.00	---	---	---
CT4	1.75	---	---	1.25	---	---	---
CT5	2.32	1.10	---	1.49	---	---	---
CT6	1.13	---	---	1.04	---	---	---
CT7	---	---	---	1.15	---	---	---
CT9	---	---	---	---	---	---	---
CT11	2.76	1.20	---	1.35	1.12	---	---
CT18	---	---	---	---	---	---	---
CT25	---	---	---	---	---	---	---

【 0 2 5 3 】

10

20

30

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
CT28	---	---	---	---	---	---	---
CT35	---	---	---	---	---	---	---
HF-000611	---	---	---	---	---	---	---
HF-000613	---	---	---	---	---	---	---
HF-001291	---	---	---	---	---	---	---
HF-001293	---	---	---	---	---	---	---
HF-001294	1.69	---	---	---	---	---	1.14
HF-001295	---	---	---	---	---	---	---
HF-001296	3.08	---	---	---	---	---	1.87
HF-001297	---	---	---	---	---	---	---
HF-001299	1.11	---	---	---	---	---	1.12
HF-001300	---	---	---	---	---	---	---
LT7	---	---	---	---	---	---	---
LT27	---	---	---	---	---	---	---
LT13	1.42	1.27 2.18 2.22	3.94 3.57	1.19	1.64 1.08	---	---

【 0 2 5 4 】

10

20

30

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
		1.70					
LT1	---	---	---	---	---	---	---
LT2	---	---	---	---	---	---	---
LT3	---	---	---	---	---	---	---
LT4	---	---	---	---	---	---	---
LT9	---	---	---	---	---	---	---
LT12	---	1.34 2.28 2.03	---	1.32	1.25	---	---
LT22	---	---	---	---	---	---	---
LT30	---	---	---	---	---	---	---
LT33	---	---	---	---	---	---	---
LT8	---	---	---	---	---	---	---
LT21	---	1.30	---	---	1.32	---	---
LT1a	---	---	---	---	---	---	---
LT6	---	---	---	---	---	---	---
LT10	---	---	---	---	---	---	---

【 0 2 5 5 】

10

20

30

原発腫瘍	PRO1686	PRO1800	PRO3562	PRO9850	PRO539	PRO4316	PRO4980
LT11	1.12	1.03 1.65 1.59	---	1.35	---	---	---
LT15	1.67	1.70 2.23 1.93	---	1.61	1.78 1.10	---	---
LT16	---	1.00 1.05 1.09	2.64 2.25	---	---	---	---
LT17	1.59	1.94 1.63	---	---	1.94 1.01	---	---
LT18	1.07	1.12	---	---	---	---	---
LT19	---	2.51 2.18	---	---	1.16	---	---
LT26	---	---	---	---	---	---	---
LT28	---	---	---	---	---	---	---
LT29	---	---	---	---	---	---	---
LT31	---	---	---	---	---	---	---
HF-000854	---	---	---	---	---	---	---
HF-000855	---	---	---	---	---	---	---

10

20

PRO4980	---	---	---	---	---	---	---
PRO4316	---	---	---	---	---	---	---
PRO539	---	---	---	---	---	---	---
PRO9850	---	---	---	---	---	---	---
PRO3562	---	---	---	---	---	2.03	1.83
PRO1800	---	---	---	---	---	---	---
PRO1686	---	---	---	---	---	---	---
原発腫瘍	HF-000856	HF-000831	HF-000832	HF-000550	HF-000551	HF-000733	HF-000716

10

20

30

【0257】

議論と結論：

PRO197 (DNA22780-1078)：

種々の腫瘍におけるDNA22780-1078についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは原発肺腫瘍：LT13、LT3、LT9、LT21、LT6、LT10、LT11、LT15及びLT17におけるPRO197ポリペプチドをコードする核酸DNA22780-1078の有意な増幅を示す。

DNA22780-1078の増幅は種々の肺腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA22780-1078にコードされるタンパク質 (PRO197) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

40

【0258】

PRO207 (DNA30879-1152)：

種々の腫瘍におけるDNA30879-1152についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは (1) 原発肺腫瘍：LT13、LT3、LT21、LT11、LT15、LT17及びLT19； (2) 原発大腸腫瘍：CT3、CT10、CT15、CT1、CT4、CT5及びCT11；及び (3) 大腸腫瘍細胞系：SW480、SW620、Colo

50

320、HCT116及びSKCO1におけるPRO207ポリペプチドをコードする核酸DNA30879-1152の有意な増幅を示す。

DNA30879-1152の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA30879-1152にコードされるタンパク質（PRO207）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0259】

PRO226（DNA33460-1166）：

種々の腫瘍におけるDNA33460-1166についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは（1）原発肺腫瘍：LT7、LT13、LT3、LT4、LT9、LT21、LT1a、LT11、LT15、LT17及びLT19；（2）原発大腸腫瘍：CT2、CT3、CT12、CT14、CT15、CT4、CT5及びCT11；及び（3）大腸腫瘍細胞系：SW480、SW620、HT29、HM7、Widr、HCT116、SKCO1及びSW403におけるPRO226ポリペプチドをコードする核酸DNA33460-1166の有意な増幅を示す。

DNA33460-1166の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA33460-1166にコードされるタンパク質（PRO226）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0260】

PRO232（DNA34435-1140）：

種々の腫瘍におけるDNA34435-1140についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは（1）原発肺腫瘍：LT12、LT15、LT17、LT18及びLT19；及び（2）原発大腸腫瘍：CT1、CT4、CT5、CT7、CT9、CT11及びCT18におけるPRO232ポリペプチドをコードする核酸DNA34435-1140の有意な増幅を示す。

DNA34435-1140の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA34435-1140にコードされるタンパク質（PRO232）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0261】

PRO243（DNA35917-1207）：

種々の腫瘍におけるDNA35917-1207についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは（1）原発肺腫瘍：LT13、LT3、LT12、LT11、LT15、LT16、LT17及びLT19；及び（2）原発大腸腫瘍：CT14及びCT5におけるPRO243ポリペプチドをコードする核酸DNA35917-1207の有意な増幅を示す。

DNA35917-1207の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA35917-1207にコードされるタンパク質（PRO243）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0262】

PRO256（DNA35880-1160）：

種々の腫瘍におけるDNA35880-1160についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは原発大腸腫瘍細胞系：SW620、HT29、Widr、及びHCT116におけるPRO256ポリペプチドをコードする核酸DNA35880-1160の有意な

増幅を示す。

DNA 35880-1160の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 35880-1160にコードされるタンパク質 (PRO 256) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0263】

PRO 269 (DNA 38260-1180) :

種々の腫瘍におけるDNA 38260-1180についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは原発肺腫瘍: LT7、LT13、LT9、LT12、LT11、LT15、LT17及びLT19におけるPRO 269ポリペプチドをコードする核酸DNA 38260-1180の有意な増幅を示す。 10

DNA 38260-1180の増幅は種々の肺腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 38260-1180にコードされるタンパク質 (PRO 269) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0264】

PRO 274 (DNA 39987-1184) :

種々の腫瘍におけるDNA 39987-1184についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは原発肺腫瘍: LT4、LT16及びLT18におけるPRO 274ポリペプチドをコードする核酸DNA 39987-1184の有意な増幅を示す。 20

DNA 39987-1184の増幅は種々の肺腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 39987-1184にコードされるタンパク質 (PRO 274) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0265】

PRO 304 (DNA 39520-1217) :

種々の腫瘍におけるDNA 39520-1217についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは原発肺腫瘍: LT13、LT12、LT11、LT15、LT16、LT17及びLT19におけるPRO 304ポリペプチドをコードする核酸DNA 39520-1217の有意な増幅を示す。 30

DNA 39520-1217の増幅は種々の肺腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 39520-1217にコードされるタンパク質 (PRO 304) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0266】

PRO 339 (DNA 43466-1225) :

種々の腫瘍におけるDNA 43466-1225についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは原発肺腫瘍: LT7、LT13、LT3、LT9、LT12、LT11及びLT17におけるPRO 339ポリペプチドをコードする核酸DNA 43466-1225の有意な増幅を示す。 40

DNA 43466-1225の増幅は種々の肺腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 43466-1225にコードされるタンパク質 (PRO 339) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0267】

PRO 1558 (DNA 71282-1668) :

50

種々の腫瘍におけるDNA 71282-1668についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは(1)原発肺腫瘍: HF-000842、HF-001294、HF-001296、及びHF-001299; 及び(2)大腸腫瘍中心HF-000795におけるPRO1558ポリペプチドをコードする核酸DNA 71282-1668の有意な増幅を示す。

DNA 71282-1668の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 71282-1668にコードされるタンパク質(PRO1558)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

10

【0268】

PRO779 (DNA 58801-1052) :

種々の腫瘍におけるDNA 58801-1052についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは(1)原発肺腫瘍: LT13、LT3、LT9、LT12、LT21、LY1-a、LT6、LT10、LT11、LT15、LT16、LT17、LT18、LT19及びHF-000840; (2)原発大腸腫瘍: CT2、CT3、CT8、CT10、CT12、CT14、CT15、CT16、CT17、CT1、CT4、CT5、CT6、CT7、CT9及びCT11; 及び(3)大腸腫瘍細胞系: SW480、SW620、Colo320、HT29、HM7、Widr、HCT116、HCT116、SKCO1及びLS174TにおけるPRO779ポリペプチドをコードする核酸DNA 58801-1052の有意な増幅を示す。

20

DNA 58801-1052の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 58801-1052にコードされるタンパク質(PRO779)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0269】

PRO1185 (DNA 62881-1515) :

種々の腫瘍におけるDNA 62881-1515についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは(1)原発肺腫瘍: LT3及びLT30; 及び(2)原発大腸腫瘍: CT2におけるPRO1185ポリペプチドをコードする核酸DNA 62881-1515の有意な増幅を示す。

30

DNA 62881-1515の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 62881-1515にコードされるタンパク質(PRO1185)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0270】

PRO1245 (DNA 64884-1527) :

種々の腫瘍におけるDNA 64884-1527についての ΔCt 値を表7Aに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Aは(1)原発肺腫瘍: LT13、LT15及びLT16; (2)肺腫瘍細胞系H522; 及び(3)原発大腸腫瘍: CT15におけるPRO1245ポリペプチドをコードする核酸DNA 64884-1527の有意な増幅を示す。

40

DNA 64884-1527の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 64884-1527にコードされるタンパク質(PRO1245)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0271】

PRO1759 (DNA 76531-1701) :

50

種々の腫瘍におけるDNA 76531-1701についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは(1)原発肺腫瘍：HF-000840及びHF-001296；(2)原発大腸腫瘍：HF-000795におけるPRO1759ポリペプチドをコードする核酸DNA 76531-1701の有意な増幅を示す。

DNA 76531-1701の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 76531-1701にコードされるタンパク質(PRO1759)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0272】

10

PRO5775 (DNA 96869-2673) :

種々の腫瘍におけるDNA 96869-2673についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは(1)原発肺腫瘍：HF-000631、HF-000641、HF-000643、HF-000840、HF-000842、HF-001293、HF-001294、HF-001295、HF-001296及びHF-001299；(2)原発大腸腫瘍：HF-000792、HF-000789及びHF-000811におけるPRO5775ポリペプチドをコードする核酸DNA 96869-2673の有意な増幅を示す。

DNA 96869-2673の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 96869-2673にコードされるタンパク質(PRO5775)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

20

【0273】

PRO7133 (DNA 128451-2739) :

種々の腫瘍におけるDNA 128451-2739についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは(1)原発肺腫瘍：HF-000840及びHF-001296；及び(2)原発大腸腫瘍：HF-000795及びHF-000811におけるPRO7133ポリペプチドをコードする核酸DNA 128451-2739の有意な増幅を示す。

30

DNA 128451-2739の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 128451-2739にコードされるタンパク質(PRO7133)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0274】

PRO7168 (DNA 102846-2742) :

種々の腫瘍におけるDNA 102846-2742についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは原発肺腫瘍：HF-000631、HF-000840及びHF-000842におけるPRO7168ポリペプチドをコードする核酸DNA 102846-2742の有意な増幅を示す。

40

DNA 102846-2742の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 102846-2742にコードされるタンパク質(PRO7168)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0275】

PRO5725 (DNA 92265-2669) :

種々の腫瘍におけるDNA 92265-2669についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは(1)原発肺腫瘍：HF-000641、HF-000840、HF-001

50

295及びHF-001296；及び(2)原発大腸腫瘍中心：HF-000762及びHF-000795におけるPRO5725ポリペプチドをコードする核酸DNA92265-2669の有意な増幅を示す。

DNA92265-2669の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA92265-2669にコードされるタンパク質(PRO5725)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0276】

PRO202 (DNA30869) :

種々の腫瘍におけるDNA30869についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは原発肺腫瘍：LT7、LT13、LT1、LT3、LT4、LT9、LT12、LT1a、LT6、LT11、LT15、LT16、LT17、及びLT19におけるPRO202ポリペプチドをコードする核酸DNA30869の有意な増幅を示す。 10

DNA30869の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA30869にコードされるタンパク質(PRO202)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0277】

PRO206 (DNA34405) :

種々の腫瘍におけるDNA34405についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは原発大腸腫瘍：CT2、CT10、CT12、CT14、CT15、CT16、CT5及びCT18におけるPRO206ポリペプチドをコードする核酸DNA34405の有意な増幅を示す。 20

DNA34405の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA34405にコードされるタンパク質(PRO206)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0278】

PRO264 (DNA36995) :

種々の腫瘍におけるDNA36995についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは原発肺腫瘍：LT3、LT4、LT9、LT1a、LT6及びLT17におけるPRO264ポリペプチドをコードする核酸DNA36995の有意な増幅を示す。 30

DNA36995の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA36995にコードされるタンパク質(PRO264)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0279】

PRO313 (DNA43320) :

種々の腫瘍におけるDNA43320についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは(1)原発肺腫瘍：LT9、LT12、LT16及びLT19；(2)原発大腸腫瘍：CT2、CT1、CT4、CT5、CT9及びCT11；及び(3)大腸腫瘍細胞系SW620におけるPRO313ポリペプチドをコードする核酸DNA43320の有意な増幅を示す。 40

DNA43320の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA43320にコードされるタンパク質(PRO313)に対するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと 50

予測される。

【0280】

PRO342 (DNA38649) :

種々の腫瘍におけるDNA38649についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは (1) 原発肺腫瘍: LT7、LT13、LT3、LT9、LT12、LT21、LT1a、LT6、LT10、LT11、LT15、LT16、LT17、LT19、HF-000840、HF-000842、HF-001294、及びHF-001296; (2) 原発大腸腫瘍: CT2、CT3、CT8、CT10、CT12、CT14、CT15、CT16、CT17、CT1、CT4、CT5、CT6、CT9、及びCT11; (3) 肺腫瘍細胞系: Calu-1及びH441; 及び(4) 大腸腫瘍細胞系: SW620及びLS174TにおけるPRO342ポリペプチドをコードする核酸DNA38649の有意な増幅を示す。

DNA38649の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA38649にコードされるタンパク質 (PRO342) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0281】

PRO542 (DNA56505) :

種々の腫瘍におけるDNA56505についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは (1) 原発肺腫瘍: LT7、LT13、LT12、LT21、LT10、LT16、LT17、LT18、及びLT19; (2) 原発大腸腫瘍: CT10、CT12、CT14、CT5及びCT9; (3) 肺腫瘍細胞系H441; (4) 大腸腫瘍細胞系: SW480、SW620、HT29、Widr、HCT116、SKCO1、SW403、及びLS174T; 及び(5) 乳房腫瘍細胞系: HBL100及びMCF7におけるPRO542ポリペプチドをコードする核酸DNA56505の有意な増幅を示す。

DNA56505の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA56505にコードされるタンパク質 (PRO542) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0282】

PRO773 (DNA48303) :

種々の腫瘍におけるDNA48303についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは (1) 原発肺腫瘍: LT13及びLT16; (2) 原発大腸腫瘍: CT15、CT16、及びCT17; (3) 大腸腫瘍細胞系: Colo320、HT29及びColo205; 及び(4) 肺腫瘍細胞系H441におけるPRO773ポリペプチドをコードする核酸DNA48303の有意な増幅を示す。

DNA48303の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA48303にコードされるタンパク質 (PRO773) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0283】

PRO861 (DNA50798) :

種々の腫瘍におけるDNA50798についての ΔCt 値を表7Bに報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは2倍の遺伝子コピーを表す。表7Bは (1) 原発肺腫瘍: LT13、LT12、LT8、LT1a、LT11、LT15及びLT16; (2) 原発大腸腫瘍: CT2、CT3、CT8、CT10、CT12、CT14、CT15、CT16、CT17、CT1、CT4、CT5、CT7、CT9、及びCT

11 ; (3) 肺腫瘍細胞系 : H 4 4 1 及び H 5 2 2 における P R O 8 6 1 ポリペプチドをコードする核酸 D N A 5 0 7 9 8 の有意な増幅を示す。

D N A 5 0 7 9 8 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、D N A 5 0 7 9 8 にコードされるタンパク質 (P R O 8 6 1) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0284】

P R O 1 2 1 6 (D N A 6 6 4 8 9) :

種々の腫瘍における D N A 6 6 4 8 9 についての $\Delta C t$ 値を表 7 B に報告する。 $\Delta C t > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7 B は (1) 原発肺腫瘍 : L T 7 及び L T 1 2 ; (2) 原発大腸腫瘍 : C T 1 2 及び C T 1 5 ; 及び (3) 大腸腫瘍細胞系 : W i D r 、 H C T 1 1 6 、 S W 4 0 3 及び L S 1 7 4 T における P R O 1 2 1 6 ポリペプチドをコードする核酸 D N A 6 6 4 8 9 の有意な増幅を示す。

D N A 6 6 4 8 9 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、D N A 6 6 4 8 9 にコードされるタンパク質 (P R O 1 2 1 6) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0285】

P R O 1 6 8 6 (D N A 8 0 8 9 6) :

種々の腫瘍における D N A 8 0 8 9 6 についての $\Delta C t$ 値を表 7 C に報告する。 $\Delta C t > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7 C は (1) 原発肺腫瘍 : L T 1 3 、 T L 1 1 、 L T 1 5 、 L T 1 7 、 L T 1 8 、 H F - 0 0 8 4 0 、 H F - 0 0 0 8 4 2 、 H F - 0 0 1 2 9 4 及び H F - 0 0 1 2 9 9 ; (2) 原発大腸腫瘍 : C T 2 、 C T 1 0 、 C T 1 2 、 C T 1 、 C T 4 、 C T 5 、 C T 6 及び C T 1 1 ; 及び (3) 大腸腫瘍細胞系 : H F - 0 0 0 7 9 5 における P R O 1 6 8 6 ポリペプチドをコードする核酸 D N A 8 0 8 9 6 の有意な増幅を示す。

D N A 8 0 8 9 6 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、D N A 8 0 8 9 6 にコードされるタンパク質 (P R O 1 6 8 6) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0286】

P R O 1 8 0 0 (D N A 3 5 6 7 2 - 2 5 0 8) :

種々の腫瘍における D N A 3 5 6 7 2 - 2 5 0 8 についての $\Delta C t$ 値を表 7 C に報告する。 $\Delta C t > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7 C は (1) 原発肺腫瘍 : L T 1 3 、 L T 1 2 、 L T 2 1 、 L T 1 1 、 L T 1 5 、 L T 1 6 、 L T 1 6 、 L T 1 7 、 L T 1 8 及び L T 1 9 ; (2) 原発大腸腫瘍 : C T 2 、 C T 1 4 、 C T 1 5 、 C T 5 及び C T 1 1 ; 及び (3) 大腸腫瘍細胞系 : C o l o 3 2 0 における P R O 1 8 0 0 ポリペプチドをコードする核酸 D N A 3 5 6 7 2 - 2 5 0 8 の有意な増幅を示す。

D N A 3 5 6 7 2 - 2 5 0 8 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、D N A 3 5 6 7 2 - 2 5 0 8 にコードされるタンパク質 (P R O 1 8 0 0) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0287】

P R O 3 5 6 2 (D N A 9 6 7 9 1) :

種々の腫瘍における D N A 9 6 7 9 1 についての $\Delta C t$ 値を表 7 C に報告する。 $\Delta C t > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7 C は (1) 原発肺腫瘍 : L T 1 3 、 L T 1 6 及び H F - 0 0 0 8 4 0 ; (2) 原発大腸腫瘍 : C T 1 5 ; (3) 大腸腫瘍中心 H F - 0 0 0 5 3 9 ; (4) 胚珠用細胞系 h 5 2 2 ; (5

）大腸腫瘍細胞系 SW620 及び HCT116；（６）乳房腫瘍 HF-000545；及び（７）精巣腫瘍：HF-000733 及び HF-000716 における PRO3562 ポリペプチドをコードする核酸 DNA96791 の有意な増幅を示す。

DNA96791 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA96791 にコードされるタンパク質（PRO3562）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0288】

PRO9850 (DNA58725) :

種々の腫瘍における DNA58725 についての ΔCt 値を表 7C に報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7C は（１）原発肺腫瘍：LT13、LT12、LT11 及び LT15；及び（２）原発大腸腫瘍：CT10、CT15、CT16、CT1、CT4、CT5、CT6、CT7 及び CT11 における PRO9850 ポリペプチドをコードする核酸 DNA58725 の有意な増幅を示す。 10

DNA58725 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA58725 にコードされるタンパク質（PRO9850）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0289】

PRO539 (DNA47465-1561) :

種々の腫瘍における DNA47465-1561 についての ΔCt 値を表 7C に報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7C は（１）原発肺腫瘍：LT13、LT12、LT21、LT15、LT17 及び LT19；及び（２）原発大腸腫瘍：CT3、CT10、CT12、CT15 及び CT11 における PRO539 ポリペプチドをコードする核酸 DNA47465-1561 の有意な増幅を示す。

DNA47465-1561 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA47465-1561 にコードされるタンパク質（PRO539）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。 30

【0290】

PRO4316 (DNA94713-2561) :

種々の腫瘍における DNA94713-2561 についての ΔCt 値を表 7C に報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7C は（１）原発肺腫瘍 HF-000840；及び（２）原発大腸腫瘍中心 HF-000795 における PRO4316 ポリペプチドをコードする核酸 DNA94713-2561 の有意な増幅を示す。

DNA94713-2561 の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA94713-2561 にコードされるタンパク質（PRO4316）に対するアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌治療における有用性を持つと予測される。 40

【0291】

PRO4980 (DNA97003-2649) :

種々の腫瘍における DNA97003-2649 についての ΔCt 値を表 7C に報告する。 $\Delta Ct > 1$ は典型的に増幅評点化の閾値として用い、これは 2 倍の遺伝子コピーを表す。表 7C は（１）原発肺腫瘍：HF-000840、HF-001294、HF-001296 及び HF001299 における PRO4980 ポリペプチドをコードする核酸 DNA97003-2649 の有意な増幅を示す。 50

DNA 97003-2649の増幅は種々の腫瘍で生じたので、腫瘍形成及び成長における有意な役割を果たす可能性が高い。結果として、DNA 97003-2649にコードされるタンパク質 (PRO4980) に対するアンタゴニスト (例えば抗体) は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0292】

実施例27

インサイツハイブリッド形成

インサイツハイブリッド形成は、細胞又は組織調製物内での核酸配列の検出及び局在化のための強力で多用途の技術である。それは、例えば、遺伝子発現部位の同定、転写物の組織分布の分析、ウイルス感染の同定及び局在化、特定mRNA合成及び染色体マッピングにおける追跡に有用である。 10

インサイツハイブリッド形成は、Lu及びGillett, Cell Vision 1: 169-176 (1994) のプロトコルの最適な変形に従って、PCR生成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。 [³³P] UTP-標識アンチセンスリボプローブをPCR産物から生成し、55℃で終夜ハイブリッド形成する。スライドをKodak NTB 2 (商品名) 核トラックエマルジョンに浸漬して4週間露出する。 20

【0293】

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及び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-50限外濾過ユニットに負荷し、プログラム10を用いてスピンのさせた (6分間)。濾過ユニットを第2の管に変換し、プログラム2を用いてスピンさせた (3分間)。最終回収スピンの後、100 µlのTEを添加した。1 µlの最終生成物をDE81紙にピペットし6mlのBiofluor IIで数えた。 40

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

【0294】

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 50

． 5 x S S C で 5 分間室温で洗浄した (2 5 m l 2 0 x S S C + 9 7 5 m l S Q H₂O) 。 0 . 5 μ g / m l のプロテイナーゼ中、 3 7 ° C で 1 0 分間の脱タンパクの後 (2 5 0 m l の予備加熱 R N a s e 無し R N a s e バッファー中の 1 0 m g / m l ストック 1 2 . 5 μ l) 、切片を 0 . 5 x S S C で 1 0 分間室温で洗浄した。切片を、 7 0 % 、 9 5 % 、 1 0 0 % エタノール中、各 2 分間脱水した。

B . パラフィン包埋切片の前処理： スライドを脱パラフィンし、 S Q H₂O 中に配置し、 2 x S S C で室温において各々 5 分間 2 回リンスした。切片を 2 0 μ g / m l のプロテイナーゼ K (2 5 0 m l の R N a s e 無し R N a s e バッファー中 1 0 m g / m l を 5 0 0 μ l ; 3 7 ° C 、 1 5 分間) - ヒト胚又は 8 x プロテイナーゼ K (2 5 0 m l の R N a s e バッファー中 1 0 0 μ l 、 3 7 ° C 、 3 0 分間) - ホルマリン組織で脱タンパクした。 10
続く 0 . 5 x S S C でのリンス及び脱水は上記のように実施した。

【 0 2 9 5 】

C . プレハイブリッド化： スライドを B o x バッファー (4 x S S C 、 5 0 % ホルムアミド) - 飽和濾紙で列を作ったプラスチックボックスに並べた。組織を 5 0 μ l のハイブリッド形成バッファー (3 . 7 5 g デキストラン硫酸 + 6 m l S Q H₂O) で被覆し、ボルテックスし、キャップを外して 2 分間マイクロ波で加熱した。氷上で冷却した後、 1 8 . 7 5 m l のホルムアミド、 3 . 7 5 m l の 2 0 x S S C 及び 9 m l の S Q H₂O を添加し、組織を良くボルテックスし、 4 2 ° C で 1 - 4 時間インキュベートした。

D . ハイブリッド形成： スライド当たり 1 . 0 x 1 0 ⁶ c p m のプローブ及び 1 . 0 μ l の t R N A (5 0 m g / m l ストック) を 9 5 ° C で 3 分間加熱した。スライドを氷上で 20
冷却し、スライド当たり 4 8 μ l のハイブリッド形成バッファーを添加した。ボルテックスの後、 5 0 μ l の ³²P 混合物をスライド上のプレハイブリッド 5 0 μ l に添加した。スライドを 5 5 ° C で終夜インキュベートした。

E . 洗浄： 洗浄は、 2 x 1 0 分間、 2 x S S C 、 E D T A で室温で実施し (4 0 0 m l の 2 0 x S S C + 1 6 m l の 0 . 2 5 M E D T A 、 V f = 4 L) 、次いで R N a s e A 処理を 3 7 ° C で 3 0 分間行った (2 5 0 m l R N a s e バッファー中 1 0 m g / m l を 5 0 0 μ l = 2 0 μ g / m l) 。スライドを 2 x 1 0 分間、 E D T A で室温において洗浄した。緊縮性洗浄条件は次の通り： 5 5 ° C で 2 時間、 0 . 1 x S S C 、 E D T A (2 0 m l の 2 0 x S S C + 1 6 m l の E D T A 、 V f = 4 L) 。

【 0 2 9 6 】

F . オリゴヌクレオチド

インサイツハイブリッド形成は、ここに開示した D N A のうち 6 つについて実施した。これらの分析に使用したオリゴヌクレオチドは以下の通り：

(1) P R O 1 9 7 (D N A 2 2 7 8 0 - 1 0 7 8) :

2 2 7 8 0 . p 1 :

5 ' - G A A T T C T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G C C G C C A C C G C C G T G C T A C T G A - 3 ' (配列番号 : 2 4 7)

2 2 7 8 0 . p 2 :

5 ' - C T A T G A A A T T A A C C C T C A C T A A A G G G A T G C A G G C G G C T G A C A T T G T G A - 3 ' (配列番号 : 2 4 8)

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

3 0 8 7 9 . p 1 :

5 ' - G G A T T C T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G C T C C T G C G C C T T T C C T G A A C C - 3 ' (配列番号 : 2 4 9)

3 0 8 7 9 . p 2 :

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

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

3 3 4 6 0 . p 1 :

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

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

3 3 4 6 0 . p 2 :

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

【0 2 9 7】

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

3 4 4 3 5 0 p 1 :

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

3 4 4 3 5 . p 2 :

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

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

3 5 9 1 7 . p 1 :

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

- 3 ' (配列番号 : 2 5 5)

3 5 9 1 7 . p 2 :

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

(6) PRO 3 4 2 (DNA 3 8 6 4 9) :

3 8 6 4 9 . p 1 :

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

3 8 6 4 9 . p 2 :

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

【0 2 9 8】

7. 結果

(1) PRO 1 9 7 (DNA 2 2 7 8 0 - 1 0 7 8) :

炎症を起こした虫垂の良性だが反応性の間質細胞全体に中程度から強いシグナルが見られた。これらの細胞は典型的に顕著な核小体を持つ大きな核を有している。哺乳動物の管腺癌における腫瘍細胞の小さなサブセット (< 5 %) 全体、及び腫瘍周辺の間質細胞に強いシグナルが存在した。ポジティブ細胞の組織学的外観は、隣接するネガティブ細胞と顕著に相違しなかった。壊死性組織に隣接する腎性細胞癌において、腫瘍及び／又は間質細胞全体に非常に集中したポジティブシグナルが見られた。肺性腺癌にはシグナルは見られなかった。

【0 2 9 9】

(2) PRO 2 0 7 (DNA 3 0 8 7 9 - 1 1 5 2) (A p o 2 L 相同体) :

軟骨芽細胞腫全体、及び他の柔組織肉腫全体に低レベルの発現が観察された。他の全ての組織はネガティブであった。

試験したヒト胎児組織 (E 1 2 - E 1 6 週) は以下を含む：胎盤、臍帯、肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、肺、心臓、大血管、食道、胃、小腸、脾臓、胸腺、膵臓、脳、眼、脊髄、体壁、骨盤及び下肢。

試験した成体ヒト組織は以下を含む：腎臓 (正常及び末期)、副腎、心筋、脾臓、リンパ節、膵臓、肺、皮膚、眼 (網膜を含む)、膀胱、及び肝臓 (正常、慢性及び急性不全)。

試験した非ヒト霊長類組織は以下を含む：

チンパンジー組織：唾液腺、胃、甲状腺、副甲状腺、舌、胸腺、卵巣、及びリンパ節。

アカゲザル組織：大脳皮質、海馬、小脳、及び陰茎。

(3) PRO 2 2 6 (DNA 3 3 4 6 0 - 1 1 6 6) (E G F 相同体) :

10

20

30

40

50

胎児の眼において発達中の外眼筋の直近の緩い結合組織における細胞全体に特異的なシグナルが観察された。

【0300】

(4) PRO232 (DNA34435-1140) (幹細胞抗原相同体) :

ヒト及び胎児組織での発現パターン

前立腺上皮、膀胱上皮における強い発現と、気管支上皮における低レベルの発現が見られた。低レベルの発現は、その他の中で、骨、血液、軟骨肉腫、成体心臓及び胎児肝臓を含む多くの部位で見られた。他の全ての組織はネガティブであった。

腎盂輸尿管の尿路管上皮及びアカゲザル陰茎の尿道における発現

発現は、前立腺の上皮、膀胱の尿路管の表層、腎盂を内張する尿路管、及び輸尿管の尿路 (2つの実験のうち1つ) で観察された。アカゲザルの尿道はネガティブであったが; このことが尿道による発現を本当に欠いているのか、あるいはアカゲザル組織と交差反応するプローブの欠陥によるのかは不明である。前立腺及び膀胱での発見は、同位体検出技術を用いて既に記載したものに類似していた。この抗原に対するmRNAの発現は、前立腺上皮特異的ではなかった。抗原は尿路誘導組織の有用なマーカーとして提供されうる。尿路上皮の表面の有糸分裂後細胞における発現も、それが特異的な幹細胞マーカーを表現していないであろうことを示唆し、これは基底上皮において特異的に発現されると予想される。

【0301】

前立腺及び膀胱癌におけるPSCA

様々な程度の前立腺及び膀胱癌の6つの試料、各々が正常な腎盂、輸尿管、膀胱、前立腺 (精嚢を含む) の一試料、及び陰茎尿路、及びLNCaP及びPC3前立腺癌細胞系のペレットを分析した: 各試料はPSCAに対するセンス及びアンチセンスプローブ、及びベータアクチンのみに対するアンチセンスプローブ (mRNA完全性コントロール) でハイブリダイゼーションした。

腎盂、輸尿管、及び膀胱の正常な移行性上皮、及び陰茎尿路の真直な円柱状の上皮は全てPSCAに対してポジティブであった。正常な前立腺の腺性上皮はPSCAに対するポジティブ性が変化し; 中程度から強いポジティブ性の腺が同じ組織片内のネガティブ腺の直近で生じた。全てのポジティブな上皮 (膀胱及び前立腺) は、移行性又は前立腺の上皮でより強い発現を示した。精嚢上皮及び他の全ての組織 (神経、血管、繊維支質、腎臓実質細胞) はPSCAを発現しない。前立腺腫瘍細胞は一般にPSCA-ネガティブであり; LNCaP及びPC3細胞及び6つの組織試料中の3つにおいて検出可能な発現は記録されず; 中程度から弱い発現が6つの前立腺腫瘍試料の中の3つのみで生じた。PSCA-ネガティブな前立腺腫瘍試料は十分なmRNA保存に一致するベータアクチン発現を示した。

乳頭移行性癌細胞 (6つのケースのうち5つ) は、PSCAに対して中程度から強くポジティブであった。6つの腫瘍のうちの1つ (侵襲性の低分化TCC) は集中したポジティブ細胞のみを示した。

【0302】

更なる前立腺及び膀胱癌試料におけるPSCA及びPSA発現

前立腺癌の13試料 (全ては中程度から僅かに分化した腺癌)、腫瘍を持たない前立腺の一試料、及び様々な程度の膀胱移行性細胞癌 (8つの分化が進んだもの、3つの中程度に分化したもの、2つの僅かしか分化していないもの) を、PSCAに対するセンス及びアンチセンスプローブ及びベータアクチンのみに対するアンチセンスプローブ (mRNA完全性コントロール) でハイブリダイゼーションした。さらなる対照として、14の前立腺ケースを、以前の実験からの前立腺CAの6切片でしたように、PSAに対するアンチセンスプローブでハイブリダイゼーションした。

1つの前立腺癌のケース (#127) は、PSCAの均一で高い発現を示した。2つのケースの前立腺CA (#399、#403) は、集中した高レベルのPSCAのみを示し、1つのケース (#124) は集中した中程度の発現を示し、全ては腺から腺で顕著に変動

した。これら3つのケースの殆どの領域、及び他の9つのケースの全ての領域は、PSCA発現が均一に低いか存在しなかった。低PSCAシグナルはmRNA分解によるものではなく：PSCAに対してネガティブな前立腺CAの全てのケースはPSA及び／又はベータアクチンに対してポジティブであった。

膀胱の11の分化が進んだ又は中程度に分化が進んだ移行性癌は全て、PSCAに対して均一に中程度又は強くポジティブであった。ともに分化の進んでいないTCCである2つの腫瘍は、ネガティブであるか弱いポジティブであった。

これらの結果は、既に記載した実験を立証する。これら2つの実験において、19の前立腺CAケースが試験され：19のうち1つが均一で高い発現を示し；19のうち6つが腫瘍細胞の一部における集中した高い発現を示し；19のうち12がネガティブ又は弱冠のポジティブであった。これに対して、これら2つの実験は、19の膀胱TCCケースを含み、その大部分は均一で中程度又は強いPSCAポジティブであった。16の分化が進んだ又は中程度に分化したTCCケースは全てポジティブであり；3つの僅かに分化したケースはネガティブ又は弱冠のポジティブであった。

【0303】

(5) PRO243 (DNA35917-1207) :

大腿骨頭と寛骨臼との間（股関節）を形成する発達中の滑膜関節の開裂線で微かな発現が観察された。この発現パターンが関節形成の他の部位で観察された場合、それはコルネリア・ド・ランゲ症候群で観察される顔面及び四肢の異常を示しうる。

ヒト胎児顔面、頭部、四肢及びマウス胚の更なる切片も試験した。マウス組織のいずれでも発現は見られなかった。発現はアンチセンスプローブでのみ見られた。

発現は、骨膜間葉における発達中の四肢及び顔面骨に隣接して観察された。発現は高度に特異的で、多くは血管形成中の領域に隣接していた。分布は、コルネリア・ド・ランゲ症候群において観察される骨格異常と一致していた。また発現は、胎児脳における発達中の側頭葉及び後頭葉でも観察されたが、他では観察されなかった。さらに、発達中の内耳の神経節で発現が見られた。

【0304】

(6) PRO342 (DNA38649) :

このDNAは多くの組織及び多くの細胞型で発現された。胎児では、発現は網膜の内面、後根神経節、小腸上皮、胸腺髄質及び脾臓で見られた。成人では、発現は尿細管の上皮、肝臓の肝細胞及び膀胱で見られた。また発現は浸潤している炎症細胞及び骨肉腫にも存在した。チンパンジーでは、発現は胃腸上皮、唾液腺及び胸腺で見られた。試験した他の組織は特異的な発現の証拠を示さなかった。

試験した胎児組織（E12-E16週）は以下を含む：肝臓、腎臓、副腎、肺、心臓、大血管、食道、胃、脾臓、生殖腺、脊髄、及び体壁。試験したヒト組織は以下を含む：肝臓、腎臓、胃、膀胱、前立腺、胚、肝細胞癌、骨肉腫、肝炎及び肝硬変。試験したチンパンジー組織は以下を含む：副腎、神経、胸腺、副腎胃腸粘膜及び唾液腺。試験したアカゲザル組織はアカゲザル脳を含む。

さらに、肺の8つの扁平及び8つの腺癌を試験した。発現は全ての腫瘍で観察されたが、発現レベルは変動した。シグナル強度に基づいて、腫瘍を高及び低発現に分類した。3つの腫瘍（2つの腺癌：96-20125及び96-3686及び1つの扁平癌95-6727）を高発現として分類した。また中程度の発現が正常な良性気管支上皮及びリンパ性浸潤に見られ、この所見は、このレセプターが殆どの検体で広く発現されるという以前の観察と一致する。

【0305】

実施例12

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

4、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980のハイブリッド形成プローブとしての使用
以下の方法は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドをコードする核 10
酸配列のハイブリッド形成プローブとしての使用を記述する。

ここに開示されるような全長又は成熟「PRO197」、「PRO207」、「PRO226」、「PRO232」、「PRO243」、「PRO256」、「PRO269」、「PRO274」、「PRO304」、「PRO339」、「PRO1558」、「PRO779」、「PRO1185」、「PRO1245」、「PRO1759」、「PRO5775」、「PRO7133」、「PRO7168」、「PRO5725」、「PRO202」、「PRO206」、「PRO264」、「PRO313」、「PRO342」、「PRO542」、「PRO773」、「PRO861」、「PRO1216」、「PRO1686」、「PRO1800」、「PRO3562」、「PRO9850」、「PRO539」、「PRO4316」又は「PRO4980」ポリペプチド又はその断片の 20
コード化配列を含むDNAは、ヒト組織cDNAライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリにおける同種DNA（PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチド、PRO533、PRO214、PRO240、PRO211、PRO230、PRO261、PRO246又はPRO317の天然発生変異体をコードするもの等）のスクリーニング 30
のためのプローブとして用いられ得る。

【0306】

ハイブリッド形成及びいずれかのライブラリを含むフィルターの洗浄は、以下の高い緊縮性条件下で実施される。放射性標識PRO197-、PRO207-、PRO226-、PRO232-、PRO243-、PRO256-、PRO269-、PRO274-、PRO304-、PRO339-、PRO1558-、PRO779-、PRO1185-、PRO1245-、PRO1759-、PRO5775-、PRO7133-、PRO7168-、PRO5725-、PRO202-、PRO206-、PRO264-、PRO313-、PRO342-、PRO542-、PRO773-、PRO861-、PRO1216-、PRO1686-、PRO1800-、PRO3562-、PRO9850-、PRO539-、PRO4316-又はPRO4980-誘導プローブのフィルターへのハイブリッド形成は、50%ホルムアミド、5xSSC、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、2xデンハード液、及び10%デキストラン硫酸の溶液中で42℃で20時間実施した。フィルターの洗浄は、0.1xSSC及び0.1%SDS水溶液中で、42℃で実施した。 40

全長天然配列PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO8 50

61、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードするDNAと所望の同一性を持つDNAは、次いでこの分野で知られた標準的技術を用いて同定できる。

【0307】

実施例29

大腸菌におけるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの発現
この実施例は、大腸菌での組換え発現による非グリコシル化形態のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の調製を例示する。

対象とするPROポリペプチドをコードするDNA配列を、選択したPCRプライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位を持たなければならない。種々の発現ベクターが用いられる。好適なベクターの例は、pBR322（大腸菌から誘導されたもの；Bolivar等，Gene，2：95（1977）参照）であり、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性についての遺伝子を含む。ベクターは、制限酵素で消化され脱リン酸される。PCR増幅した配列は、次いでベクターに結合させる。ベクターは、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、trpプロモーター、ポリhisリーダー（最初の6つのSTIIコドン、ポリhis配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む）、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980コード化領域、ラムダ転写終結区、及びargU遺伝子を含む。

【0308】

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

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

更に数時間の培養の後、細胞を採集して遠心分離できる。遠心分離で得られた細胞ペレットは、この分野で知られた種々の試薬を用いて可溶化され、可溶化PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、P

PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980タンパク質を金属キレート化カラムを用いてタンパク質を緊密に結合させる条件下で精製した。

PRO197、PRO207、PRO1185、PRO5725、PRO202、及びPRO3562は、以下の手法を用いて、大腸菌においてポリHisタグ形態で発現させた。PRO197、PRO207、PRO1185、PRO5725、PRO202、及びPRO3562をコードするDNAを選択したPCRプライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いでPCR増幅された、ポリHisタグ配列を発現ベクターに結合させ、それを株52 (W3110 fuhA (tonA) lon galE rpoH ts (htpR ts) cllpP (lacI q)) 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50 mg/mlのカルベニシリンを含有するLB中、30℃で振盪しながら3-5のO.D. 600に達するまで成長させた。ついで培地をCRAP培地 (3.57 gの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.71 gのクエン酸ナトリウム・ $2\text{H}_2\text{O}$ 、1.07 gのKCl、5.36 gのDifco酵母抽出物、500 mL水中の5.36 gのSheffield hycase SF、並びに110 mMのMPOS、pH 7.3、0.55% (w/v)のグルコース及び7 mMの MgSO_4 の混合で調製) 中に50-100倍希釈し、30℃で振盪させながら約20-30時間成長させた。試料を取り出してSDS-PAGEにより発現を確認し、バルク培地を遠心分離して細胞のペレットとした。細胞細胞ペレットを精製及び再折りたたみまで凍結させた。

【0309】

0.5から1 Lの発酵 (6-10 g ペレット) からの大腸菌ペーストを、7 Mのグアニジン、20 mMのトリス、pH 8 バッファー中で10容量 (w/v) で再懸濁させた。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々0.1 M及び0.02 Mとし、溶液を4℃で終夜攪拌した。この工程により、亜硫酸によりブロックされたシステイン残基を持つ変性タンパク質がもたらされた。溶液をBeckman Ultracentrifuge中で40,000 rpm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 (6 Mのグアニジン、20 mMのトリス、pH 7.4) 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5 mLのQiagen Ni-NTA金属キレートカラムに負荷した。カラムを50 mMのイミダゾール (Calbiochem, Utrrol grade) を含む添加バッファー、pH 7.4で洗浄した。タンパク質を250 mM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280 nmにおけるその吸収により見積もった。試料を、20 mMのトリス、pH 8.6、0.3 MのNaCl、2.5 Mの尿素、5 mMのシステイン、20 mMのグリシン及び1 mMのEDTAからなる新たに調製した再折りたたみバッファー中に徐々に希釈することによりタンパク質を再折りたたみさせた。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が50-100マイクログラム/mlとなるように選択した。リフォールディング溶液を4℃で12-36時間ゆっくり攪拌した。リフォールディング反応はTFAを採取濃度0.4% (約3のpH) で添加することにより停止させた。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を0.22ミクロンフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度2-10%で添加した。再折りたたみされたタンパク質を、Poros R1/H逆相カラムで、0.1% TFAの移動バッファーと10-80%のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかけた。A₂₈₀吸収を持つ画分のアリコートでSDSポリアクリルアミドゲルで分析し、相同な再折りたたみされたタンパク質を含有する画分をプールした。一般的に、殆どのタンパク質の正

しく再折りたたみされた種は、これらの種が最もコンパクトであり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。タンパク質の誤って折りたたまれた形態を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。所望の折りたたまれたPRO197、PRO207、PRO1185、PRO5725、PRO202、及びPRO3562タンパク質各々を含有する画分をプールし、溶液に向けた窒素の弱い気流を用いてアセトニトリルを除去した。タンパク質を、透析又は調製バッファーで平衡化したG25 Superfine (Pharmacia) 樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、0.14Mの塩化ナトリウム及び4%のマンニトールを含む20mMのHEPES、pH6.8に調製した。

10

【0310】**実施例30**

哺乳動物細胞におけるPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の発現

この実施例は、哺乳動物細胞での組換え発現によるグリコシル化形態のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の調製を例示する。

20

発現ベクターとしてベクターpRK5 (1989年3月15日発行のEP 307, 247参照)を用いた。場合によっては、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980 DNAを選択した制限酵素でpRK5に結合させ、上掲のSambrook等に記載されたような結合方法を用いてPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980 DNAの挿入を行う。得られたベクターは、pRK5-PRO197、pRK5-PRO207、pRK5-PRO226、pRK5-PRO232、pRK5-PRO243、pRK5-PRO256、pRK5-PRO269、pRK5-PRO274、pRK5-PRO304、pRK5-PRO339、pRK5-PRO1558、pRK5-PRO779、pRK5-PRO1185、pRK5-PRO1245、pRK5-PRO1759、pRK5-PRO5775、pRK5-PRO7133、pRK5-PRO7168、pRK5-PRO5725、pRK5-PRO202、pRK5-PRO206、pRK5-PRO264

30

40

50

、pRK5-PRO313、pRK5-PRO342、pRK5-PRO542、pRK5-PRO773、pRK5-PRO861、pRK5-PRO1216、pRK5-PRO1686、pRK5-PRO1800、pRK5-PRO3562、pRK5-PRO9850、pRK5-PRO539、pRK5-PRO4316又はpRK5-PRO4980と呼ばれる。

【0311】

一実施態様では、選択された宿主細胞は293細胞とすることができる。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)は、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分又は抗生物質を添加したDMEMなどの媒質中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化した。約10 μ gのpRK5-PRO197、pRK5-PRO207、pRK5-PRO226、pRK5-PRO232、pRK5-PRO243、pRK5-PRO256、pRK5-PRO269、pRK5-PRO274、pRK5-PRO304、pRK5-PRO339、pRK5-PRO1558、pRK5-PRO779、pRK5-PRO1185、pRK5-PRO1245、pRK5-PRO1759、pRK5-PRO5775、pRK5-PRO7133、pRK5-PRO7168、pRK5-PRO5725、pRK5-PRO202、pRK5-PRO206、pRK5-PRO264、pRK5-PRO313、pRK5-PRO342、pRK5-PRO542、pRK5-PRO773、pRK5-PRO861、pRK5-PRO1216、pRK5-PRO1686、pRK5-PRO1800、pRK5-PRO3562、pRK5-PRO9850、pRK5-PRO539、pRK5-PRO4316又はpRK5-PRO4980 DNAを約1 μ gのVA RNA遺伝子をコードするDNA [Thimmapaya等, Cell, 31:543 (1982)]と混合し、500 μ lの1mMトリス-HCl、0.1mMのEDTA、0.227MのCaCl₂に溶解させた。この混合物に、滴状の、500 μ lの50mMのHEPES (pH7.35)、280mMのNaCl、1.5mMのNaPO₄を添加し、25℃で10分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、293細胞に加えて37℃で約4時間定着させた。培養培地を吸引し、2mlのPBS中20%グリセロールを30秒間添加した。293細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートした。

形質移入の約24時間後、培養培地を除去し、培養培地(のみ)又は200 μ Ci/mlの³⁵S-システイン及び200 μ Ci/mlの³⁵S-メチオニンを含む培養培地で置換した。12時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15%SDSゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの存在を現す選択された時間にわたってフィルムに暴露した。形質転換した細胞を含む培地は、更なるインキュベーションを施し(無血清培地で)、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

【0312】

これに換わる技術において、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980 DNAは、Sompariyac等, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575

(1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて293細胞に一過的に導入される。293細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700 μ gのpRK5-PRO197、pRK5-PRO207、pRK5-PRO226、pRK5-PRO232、pRK5-PRO243、pRK5-PRO256、pRK5-PRO269、pRK5-PRO274、pRK5-PRO304、pRK5-PRO339、pRK5-PRO1558、pRK5-PRO779、pRK5-PRO1185、pRK5-PRO1245、pRK5-PRO1759、pRK5-PRO5775、pRK5-PRO7133、pRK5-PRO7168、pRK5-PRO5725、pRK5-PRO202、pRK5-PRO206、pRK5-PRO264、pRK5-PRO313、pRK5-PRO342、pRK5-PRO542、pRK5-PRO773、pRK5-PRO861、pRK5-PRO1216、pRK5-PRO1686、pRK5-PRO1800、pRK5-PRO3562、pRK5-PRO9850、pRK5-PRO539、pRK5-PRO4316又はpRK5-PRO4980DNAを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄した。DNA-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートした。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、5 μ g/mlウシインシュリン及び0.1 μ g/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約4日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いで発現されたPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を含む試料を濃縮し、透析又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製した。

【0313】

他の実施態様では、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をCHO細胞で発現させることができる。pRK5-PRO197、pRK5-PRO207、pRK5-PRO226、pRK5-PRO232、pRK5-PRO243、pRK5-PRO256、pRK5-PRO269、pRK5-PRO274、pRK5-PRO304、pRK5-PRO339、pRK5-PRO1558、pRK5-PRO779、pRK5-PRO1185、pRK5-PRO1245、pRK5-PRO1759、pRK5-PRO5775、pRK5-PRO7133、pRK5-PRO7168、pRK5-PRO5725、pRK5-PRO202、pRK5-PRO206、pRK5-PRO264、pRK5-PRO313、pRK5-PRO342、pRK5-PRO542、pRK5-PRO773、pRK5-PRO861、pRK5-PRO1216、pRK5-PRO1686、pRK5-PRO1800、pRK5-PRO3562、pRK5-PRO9850、pRK5-PRO539、pRK5-PRO4316又はpRK5-PRO4980ベクターは、CaPO₄又はDEAE-デキストランなどの公知の試薬を用いてCHO細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地(のみ)又は³⁵S-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1

558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980ポリペプチドの存在を同定した後、培養培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約6日間インキュベートし、次いで条件培地を収集する。次いで、発現されたPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を含む培地を濃縮して、選択した方法によって精製することができる。

10

【0314】

また、エピトープタグPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980は、宿主CHO細胞において発現させてもよい。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980はpRK5ベクターからサブクローニングした。サブクローン挿入物は、次いで、PCRを施してバキュロウイルス発現ベクター中のポリ-hisタグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。ポリ-hisタグPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980挿入物は、次いで、安定なクローンの選択のためのDHFR等の選択マーカを含むSV40誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、CHO細胞をSV40誘導ベクターで（上記のように）形質移入した。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-hisタグPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を含む培養培地は、次いで濃縮し、Ni²⁺-キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。

20

30

40

【0315】

PRO197、PRO226、PRO256、PRO202、PRO264、PRO542、PRO773及びPRO861は安定発現法でCHO細胞において発現された、PRO256、PRO264及びPRO861はCHO細胞で一過性発現された。CHO細胞における安定な発現は以下の方法を用いて実施された。タンパク質は、それは対応するタンパク質の可溶化形態及び／又はポリ-Hisタグ形態のコード化配列（例えば、細胞外ドメイン）がIgG1のヒンジ、CH2及びCH2ドメインを含む定常領域配列に融合したIgG作成物（イムノアドヘシン）として発現された。

PCR増幅に続いて、対応するDNAを、Ausubel等、Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.26, John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いてCHO発現ベクターにサブクローニングした。CHO発現ベクターは、対象とするDNAの5'及び3'に適合する制限部位を有し、cDNAの便利なシャトル化ができるように作成される。ベクターは、Lucas等、Nucl. Acids res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようにCHO細胞での

発現を用い、対象とするcDNA及びジヒドロフォレートレダクターゼ(DHFR)の発現の制御にSV40初期プロモーター／エンハンサーを用いる。DHFR発現は、形質移入に続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

所望のプラスミドDNAの12マイクログラムを、市販の形質移入試薬Superfect (登録商標) (Qiagen), Dospers (登録商標) 及びFugene (登録商標) (Boehringer Mannheim) 約一千万のCHO細胞に導入した。細胞は、上掲のLucas等に記載されているように成長させた。約 3×10^7 細胞を、下記のような更なる成長及び生産のためにアンプル中で凍結させた。

【0316】

プラスミドDNAを含むアンプルを水槽に配して解凍し、ボルテックスにより混合した。内容物を10mLの媒質を含む遠心管にピペットして、1000rpmで5分間遠心分離した。上清を吸引して細胞を10mLの選択培地(0.2 μ m濾過PS20、5%の0.2 μ m透析濾過ウシ胎児血清を添加)中に懸濁させた。次いで細胞を90mLの選択培地を含む100mlスピナーに分けた1-2日後、細胞を150mLの選択培地を満たした250mLスピナーに移し、37℃でインキュベートした。さらに2-3日後、250mL、500mL及び2000mLのスピナーを 3×10^5 細胞/mLで播種した。細胞培地を遠心分離により新鮮培地に交換し、生産培地に再懸濁させた。任意の適切なCHO培地を用いてもよいが、実際には1992年6月16日に発行の米国特許第5,122,469号に記載された生産培地を使用した。3Lの生産スピナーを 1.2×10^6 細胞/mLで播種した。0日目に、細胞数とpHを測定した。1日目に、スピナーをサンプルし、濾過空気での散布を実施した。2日目に、スピナーをサンプルし、温度を33℃に変え、500g/Lのグルコース及び0.6mLの10%消泡剤(例えば35%ポリジメチルシロキサンエマルジョン、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion)の30mLとした。生産を通して、pHは7.2近傍に調節し維持した。10日後、又は生存率が70%を下回るまで、細胞培地を遠心分離で回収して0.22 μ mフィルターを通して濾過した。濾過物は、4℃で貯蔵するか、即座に精製用カラムに負荷した。

ポリ-Hisタグ作成物について、タンパク質はNi²⁺-NTAカラム(Qiagen)を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのNaCl及び5mMイミダゾールを含む20mMのHepes, pH7.4バッファーで平衡化した6mlのNi-NTAカラムに4-5ml/分の流速で4℃においてポンプ供給した。負荷後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのHepes、0.14MのNaCl及び4%のマニトールを含む貯蔵バッファー中で25mlのG25 Superfine (Pharma 50

c i a) を用いて脱塩し、 -80°C で貯蔵した。

イムノアドヘシン (F c 含有) 作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、 20mM のリン酸ナトリウムバッファー、 $\text{pH}6.8$ 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、 $\text{pH}3.5$ で溶離した。溶離したタンパク質は、 1ml の画分を $275\mu\text{l}$ の 1M トリスバッファー、 $\text{pH}9$ を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-His タグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。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。

【0317】

10

実施例32

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

以下の方法は、酵母菌中でのPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の組換え発現を記載する。

20

第1に、ADH2/GAPDHプロモーターからのPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードするDNA及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の細胞内発現を指示する。分泌のために、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO3

30

40

50

39、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980をコードするDNAを選択したプラスミドに、ADH2/GAPDHプロモーター、天然PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980シグナルペプチド又は他の哺乳類シグナルペプチドをコードするDNA、又は、例えば酵母菌アルファ因子分泌シグナル／リーダー配列、及び（必要ならば）PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の発現のためのリンカー配列とともにクローニングすることができる。

【0318】

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

続いて組換えPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980は、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。

【0319】

実施例33

バキュロウイルス感染昆虫細胞でのPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、P

RO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の発現以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中における組換え発現を記載する。

PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980は、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。このようなエピトープタグは、ポリ-hisタグ及び免疫グロブリンタグ(IgGのFc領域など)を含む。pVL1393(Navogen)などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単には、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980あるいはPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980のコード化配列の所定部分(膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列など)が、5'及び3'領域に相補的なプライマーでのPCRにより増幅される。5'プライマーは、隣接する(選択された)制限酵素部位を包含していてもよい。生成物は、次いで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

【0320】

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold™ウイルスDNA(Pharmingen)を、Spodoptera frugiperda(「Sf9」)細胞(ATCC CRL 1711)中にリポフェクシン(GIBCO-BRLから市販)を用いて同時形質移入することにより作成される。28℃で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilly等, Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施した。次いで、発現されたポリ-hisタグPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980は、例えば、Ni²⁺-キレートアフィニティクロマトグラフィーにより以下のように精製される。抽出物は、Rupert等, Nature, 362:175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染した組み換えSf9細胞から

調製した。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー（25mlのHepes、pH7.9；12.5mMのMgCl₂；0.1mMのEDTA；10%のグリセロール；0.1%のNP-40；0.4MのKCl）中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を負荷バッファー（50mMリン酸塩、300mMNaCl、10%のグリセロール、pH7.8）で50倍希釈し、0.45μmフィルターで濾過した。Ni²⁺-NTAアガロースカラム（Qiagenから市販）を5mlの総容積で調製し、25mlの水で洗浄し、25mlの負荷バッファーで平衡させた。濾過した細胞抽出物は、毎分0.5mlでカラムに負荷した。カラムを、分画回収が始まる点であるA₂₈₀のベースラインまで負荷バッファーで洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー（50mMのリン酸塩；300mMのNaCl、10%のグリセロール、pH6.0）で洗浄した。A₂₈₀のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で0から500mMのイミダゾール勾配で展開した。1mlの分画を回収し、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ（Qiagen）に複合したNi²⁺-NTAでのウェスタンブロットで分析した。溶離したHis₁₀-タグPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980を含む分画をプールし、負荷バッファーで透析した。

10

20

30

50

【0321】

あるいは、IgGタグ（又はFcタグ）PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980の精製は、例えば、プロテインA又はプロテインGカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

発現は実際には0.5-2Lのスケールであったが、容易により大きな（例えば8L）調製にスケールアップできる。タンパク質はIgG作成物（イムノアドヘシン）として発現され、そこではタンパク質細胞外領域がヒンジ、CH2及びCH3ドメイン及び／又はポリ-Hisタグ形態を含むIgG1定常領域配列に融合している。

【0322】

PCR増幅に続いて、対応するコード化配列をバキュロウイルス発現ベクター（IgG融合物に対するpb. PH. IgG及びポリHisタグに対するpb. PH. His. c）にサブクローニングし、そのベクター及びBaculogold（登録商標）バキュロウイルスDNA（Pharmingen）を105スポドプテラグルヒペルダ（Spodoptera frugiperda）（「Sf9」）細胞（ATCC CRL 1711）にリポフェクチン（Gibco BRL）を用いて同時形質移入した。pb. PH. IgG及びPH. His. cは、市販のバキュロウイルス発現ベクターpVL1393（Pharmingen）の修飾物であり、His又はFcタグ配列を含むように修飾されたポリリンカー領域を持つ。細胞を、10%のFBS（Hyclone）を添加したHinkのTNM-FM培地で成長させた。細胞は、28℃で5日間インキュベートした。上清を回収し、続いて10%FBSを添加したHinkのTNM-FH培地におけるSf9細胞感染による約10の感染効率（MOI）での最初のウイルス増幅に用いた。細胞を28℃で3日間インキュベートした。上清を回収し、バキュロウイルス発現ベクターにおける

作成物の発現を、1 mlの上清の25 mLのヒスチジンタグタンパク質用のNi²⁺-NTAビーズ (Q I A G E N) 又はIgGタグタンパク質用のプロテインAセファロースCL-4Bビーズ (P h a r m a c i a) へのバッチ結合、次いでクマシーブルー染色により周知の濃度のタンパク質標準と比較するSDS-PAGE分析により測定した。

第1の増幅ウイルス上清をESF-921培地 (E x p r e s s i o n S y s t e m L L C) で成長させたSf9細胞のスピナー培地 (500 ml) の約0.1のMOIでの感染に使用した。細胞は28℃で3日間インキュベートした。上清を回収して濾過した。バッチ結合及びSDS-PAGEを、スピナー培地の発現が確認されるまで、必要に応じて繰り返した。

【0323】

形質移入細胞からの条件培地 (0.5~3 L) を、遠心分離により細胞を除去し0.22ミクロンフィルターを通して濾過することにより回収した。ポリ-Hisタグ作成物については、配列を含むタンパク質をNi²⁺-NTAカラム (Q i a g e n) を用いて精製した。精製前に、イミダゾールを条件培地に5 mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3 MのNaCl及び5 mMイミダゾールを含む20 mMのHepes, pH 7.4バッファーで平衡化した6 mlのNi²⁺-NTAカラムに4-5 ml/分の流速で4℃においてポンプ供給した。負荷後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25 Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10 mMのHepes、0.14 MのNaCl及び4%のマニトールを含む貯蔵バッファー, pH 6.8中で25 mlのG25 Superfine (P h a r m a c i a) を用いて脱塩し、-80℃で貯蔵した。

タンパク質のイムノアドヘシン (Fc含有) 作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、20 mMのリン酸ナトリウムバッファー, pH 6.8で平衡化した5 mlのプロテインAカラム (P h a r m a c i a) に負荷した。負荷後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、100 mMのクエン酸, pH 3.5で溶離した。溶離したタンパク質は、1 mlの画分を275 mLの1 Mトリスバッファー, pH 9を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Hisタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。PROポリペプチドの均一性はSDSポリアクリルアミドゲル (P E G) 電気泳動及びエドマン (E d m a n) 分解によるN-末端アミノ酸配列決定により評価できる。

PRO256、PRO269、PRO1245、PRO264及びPRO542は、バキュロウイルス感染Sf9昆虫細胞において上記の手法により発現された。

【0324】

あるいは、修飾バキュロウイルス法をhigh5細胞取り込みに使用してもよい。この方法では、所望の配列をコードするDNAは、Pfu (S t r a t a g e n e) 等の適当な系で増幅されても、又はバキュロウイルス発現ベクターの含まれるエピトープタグの上流 (5'-) に融合させてもよい。このようなエピトープタグは、ポリ-Hisタグ及び免疫グロブリンタグ (IgGのFc領域等) を含む。種々のプラスミドを用いることができ、pIE-1 (N o v a g e n) 等の市販のプラスミドから誘導されたプラスミドを含む。pIE-1及びpIE-2ベクターは、安定に形質転換された昆虫細胞におけるバキュロウイルスie1プロモーターからの組換えタンパク質の構成的発現のために設計される。このプラスミドは複数のクロニング部位の方向においてのみ相違し、未感染昆虫細胞におけるie1媒介遺伝子発現に重要であることが知られた全てのプロモーター配列並びにhr5エンハンサー成分を含む。pIE-1及びpIE-2はie1翻訳開始部位を含み、融合タンパク質の製造に使用できる。簡単には、所望の配列又は配列の所望の部分 (膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列など) を、5'及び3'領域に相補的なプライマーでのPCRにより増幅する。5'プライマーは隣接する (選択された) 制限酵素部位を導入してもよい。生成物は、次いで、選択された制限酵素で消化して発現ベクターにサブクロニングされる。例えば、pIE1-1の誘導体はヒトIgG (p b. P H. I g G) のFc領域又は8ヒスチジン (p b. P H. H i s) タグ下流 (3'-) を

10

20

30

40

50

含むことができる。好ましくは、ベクター作成物は確認のために配列決定される。

H i g h 5細胞は、27℃、CO₂無し、pen/strep無しの条件下で50%の集密度まで成長させた。150mmプレート各々について、30μgのPROポリペプチドを含むpIEベースベクターを1mlのEx-細胞培地（媒質：Ex-細胞401+1/100のL-Glu JRH Biosciences #14401-78P（注：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（Cell FECTIN（Gibco BRL #10362-010）（ボルテックスで混合））を1mlのEx-細胞培地と混合した。2つの溶液を混合し、室温で15分間インキュベーションした。8mlのEx-細胞培地を2mlのDNA/セルフェクチン混合物に添加し、Ex-細胞培地で1回洗浄したHi5細胞上に層形成させた。次いでプレートを暗中室温でインキュベートした。次いでDNA/セルフェクチン混合物を吸引し、細胞をEx-細胞で1回戦乗して過剰のセルフェクチンを除去した。30mlの新鮮なEx-細胞培地を添加し、細胞を28℃で3日間インキュベートした。上清を回収して、バキュロウイルス感染ベクターでの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。

【0325】

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、続いてポリ-Hisタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。PROポリペプチドの均一性はSDSポリアクリルアミドゲル及びエドマン（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。

PRO226、PRO232、PRO243、PRO269、PRO779、PRO202、PRO542及びPRO861は、high5細胞を導入する上記の改変バキュロウイルス法により成功裏に発現された。

【0326】

実施例34

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

539、PRO4316又はPRO4980に結合する抗体の調製

この実施例は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980に特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

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、Godi 10
n g, 上掲に記載されている。用いられ得る免疫原は、精製PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO 20
5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980含む融合タンパク質、細胞表面に組換えPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO98 30
50、PRO539、PRO4316又はPRO4980を発現する細胞を含む。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなくすることができる。

【0327】

Balb/c等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に1-100マイクログラムで注入したPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO 40
3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をMPL-TDMアジュバント(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで10から12日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202 50

、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980抗体の検出のためのELISAアッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。適当な抗体価が検出された後、抗体に「ポジティブ」な動物に、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980静脈内注射の最後の注入をすることができる。3から4日後、マウスを屠殺し、脾臓を取り出した。次いで脾臓細胞を（35%ポリエチレングリコールを用いて）、ACTTから番号CRL1597で入手可能なP3X63AgU.1等の選択されたマウス骨髓腫細胞系に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン）培地を含む96ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髓腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

【0328】

ハイブリドーマ細胞は、PRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980に対する反応性についてのELISAでスクリーニングされる。所望のPRO197、PRO207、PRO226、PRO232、PRO243、PRO256、PRO269、PRO274、PRO304、PRO339、PRO1558、PRO779、PRO1185、PRO1245、PRO1759、PRO5775、PRO7133、PRO7168、PRO5725、PRO202、PRO206、PRO264、PRO313、PRO342、PRO542、PRO773、PRO861、PRO1216、PRO1686、PRO1800、PRO3562、PRO9850、PRO539、PRO4316又はPRO4980に対するモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

ポジティブハイブリドーマ細胞を同系のBalb/cマウスに腹腔内注入し、抗-PRO197、抗-PRO207、抗-PRO226、抗-PRO232、抗-PRO243、抗-PRO256、抗-PRO269、抗-PRO274、抗-PRO304、抗-PRO339、抗-PRO1558、抗-PRO779、抗-PRO1185、抗-PRO1245、抗-PRO1759、抗-PRO5775、抗-PRO7133、抗-PRO7168、抗-PRO5725、抗-PRO202、抗-PRO773、抗-PRO861、抗-PRO1216、抗-PRO1686、抗-PRO1800、抗-PRO3562、抗-PRO9850、抗-PRO539、抗-PRO4316又は抗-PRO4980モノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインA又はプロテインGへの親和性に基づくアフィニティクロマトグラフィーを用いることもできる。

【0329】

材料の寄託

次の細胞系をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, 10801 ユニバーシティ 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	
DNA 22780-1078	209284	1997年 9月18日	
DNA 30879-1152	209358	1997年10月10日	
DNA 33460-1166	209376	1997年10月16日	
DNA 34435-1140	209250	1997年 9月16日	
DNA 35917-1207	209508	1997年12月03日	
DNA 35880-1160	209379	1997年10月16日	10
DNA 38260-1180	209397	1997年10月17日	
DNA 39987-1184	209786	1998年 4月21日	
DNA 39520-1217	209482	1997年11月21日	
DNA 43466-1225	209490	1997年11月21日	
DNA 71282-1668	203312	1998年10月 6日	
DNA 58801-1052	55820	1996年 9月 5日	
DNA 62881-1515	203096	1987年 8月 4日	
DNA 64884-1527	203155	1998年 8月25日	
DNA 76531-1701	203465	1998年11月17日	
DNA 96869-2673	PTA-255	1999年 6月22日	20
DNA 128451-2739	PTA-618	1999年 8月31日	
DNA 102846-2742	PTA-545	1999年 8月17日	
DNA 92265-2669	PTA-256	1999年 6月22日	
DNA 35672-2508	203538	1998年12月15日	
DNA 47465-1561	203661	1999年 2月 2日	
DNA 94713-2561	203835	1999年 3月 9日	30
DNA 97003-2649	PTA-43	1999年 5月11日	

【0330】

この寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則（ブダペスト条約）の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、どれが最初であろうとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則（特に参照番号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。 40

本出願の譲受人は、寄託した培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと即座に取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの物質の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不 50

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、本発明を様々に改変することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

【図面の簡単な説明】

【F i g 1】天然配列 P R O 1 9 7 をコードするヌクレオチド配列を含む c D N A のヌクレオチド配列（配列番号：1）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：1）はここで D N A 2 2 7 8 0 - 1 0 7 8 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 2】F i g 1 に示した配列番号：1 のコード化配列から誘導された天然配列 P R O 1 9 7 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：2）を示す図である。 10

【F i g 3】天然配列 P R O 2 0 7 をコードするヌクレオチド配列を含む c D N A のヌクレオチド配列（配列番号：3）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：3）はここで D N A 3 0 8 7 9 - 1 1 5 2 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 4】F i g 3 に示した配列番号：3 のコード化配列から誘導された天然配列 P R O 2 0 7 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：4）を示す図である。

【F i g 5】天然配列 P R O 2 2 6 をコードするヌクレオチド配列を含む c D N A のヌクレオチド配列（配列番号：5）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：5）はここで D N A 3 3 4 6 0 - 1 1 6 6 と命名されるクローンである。また、太字及び下線 20

フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 6】F i g 5 に示した配列番号：5 のコード化配列から誘導された天然配列 P R O 2 2 6 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：6）を示す図である。

【F i g 7】天然配列 P R O 2 3 2 をコードするヌクレオチド配列を含む c D N A のヌクレオチド配列（配列番号：7）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：7）はここで D N A 3 4 4 3 5 - 1 1 4 0 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 8】F i g 7 に示した配列番号：7 のコード化配列から誘導された天然配列 P R O 2 3 2 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：8）を示す図である。

【F i g 9】天然配列 P R O 2 4 3 をコードするヌクレオチド配列を含む c D N A のヌクレオチド配列（配列番号：9）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：9）はここで D N A 3 5 9 1 7 - 1 2 0 7 と命名されるクローンである。また、太字及び下線 30

フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 1 0】F i g 9 に示した配列番号：9 のコード化配列から誘導された天然配列 P R O 2 4 3 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：10）を示す図である。

【F i g 1 1】天然配列 P R O 2 5 6 をコードするヌクレオチド配列を含む c D N A のヌクレオチド配列（配列番号：11）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：11）はここで D N A 3 5 8 8 0 - 1 1 6 0 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 1 2】F i g 1 1 に示した配列番号：11 のコード化配列から誘導された天然配列 P R O 2 5 6 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：12）を示す図である。 40

【F i g 1 3】天然配列 P R O 2 6 9 をコードするヌクレオチド配列を含む c D N A のヌクレオチド配列（配列番号：13）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：13）はここで D N A 3 8 2 6 0 - 1 1 8 0 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 1 4】F i g 1 3 に示した配列番号：13 のコード化配列から誘導された天然配列 P R O 2 6 9 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：14）を示す図である。

【F i g 1 5】天然配列 P R O 2 7 4 をコードするヌクレオチド配列を含む c D N A のヌクレオチド配列（配列番号：15）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：15）はここで D N A 3 9 9 8 7 - 1 1 8 4 と命名されるクローンである。また、太字及 50

び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 1 6】F i g 1 5に示した配列番号：15のコード化配列から誘導された天然配列PRO274ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：16）を示す図である。

【F i g 1 7】天然配列PRO304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：17）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：17）はここでDNA39520-1217と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 1 8】F i g 1 7に示した配列番号：17のコード化配列から誘導された天然配列PRO304ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：18）を示す図である。

【F i g 1 9】天然配列PRO339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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：19）はここでDNA43466-1225と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 2 0】F i g 1 9に示した配列番号：19のコード化配列から誘導された天然配列PRO339ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：20）を示す図である。

【F i g 2 1】天然配列PRO1558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：21）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：21）はここでDNA71282-1668と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 2 2】F i g 2 1に示した配列番号：21のコード化配列から誘導された天然配列PRO1558ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：22）を示す図である。

【F i g 2 3】天然配列PRO779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：23）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：23）はここでDNA58801-1052と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 2 4】F i g 2 3に示した配列番号：23のコード化配列から誘導された天然配列PRO779ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：24）を示す図である。

【F i g 2 5】天然配列PRO1185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：25）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：25）はここでDNA62881-1515と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 2 6】F i g 2 5に示した配列番号：25のコード化配列から誘導された天然配列PRO1185ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：26）を示す図である。

【F i g 2 7】天然配列PRO1245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：27）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：27）はここでDNA64884-1527と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 2 8】F i g 2 7に示した配列番号：27のコード化配列から誘導された天然配列PRO1245ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：28）を示す図である。

【F i g 2 9】天然配列PRO1759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、当該ヌクレオチド配列（配列番号：29）はここでDNA76531-1701と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 3 0】F i g 2 9に示した配列番号：29のコード化配列から誘導された天然配列PRO1759ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：30）を示す図である。

【F i g 3 1】天然配列PRO5775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：31）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：31）はここでDNA96869-2673と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 3 2】F i g 3 1に示した配列番号：31のコード化配列から誘導された天然配

列 PRO5775 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：32）を示す図である。

【Fig 33】天然配列 PRO7133 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：33）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：33）はここで DNA128451-2739 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 34】Fig 33 に示した配列番号：33 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO7133 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：34）を示す図である。

【Fig 35】天然配列 PRO7168 をコードするヌクレオチド配列を含む cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：35）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：35）はここで DNA102846-2742 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。 10

【Fig 36】Fig 35 に示した配列番号：35 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO7168 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：36）を示す図である。

【Fig 37】天然配列 PRO5725 をコードするヌクレオチド配列を含む cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：37）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：37）はここで DNA92265-2669 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 38】Fig 37 に示した配列番号：37 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO5725 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：38）を示す図である。

【Fig 39】天然配列 PRO202 をコードするヌクレオチド配列を含む cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：39）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：39）はここで DNA30869 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。 20

【Fig 40】Fig 39 に示した配列番号：39 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO202 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：40）を示す図である。

【Fig 41】天然配列 PRO206 をコードするヌクレオチド配列を含む cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：41）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：41）はここで DNA34405 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 42】Fig 41 に示した配列番号：41 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO206 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：42）を示す図である。 30

【Fig 43】天然配列 PRO264 をコードするヌクレオチド配列を含む cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：43）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：43）はここで DNA36995 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 44】Fig 43 に示した配列番号：43 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO264 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：44）を示す図である。

【Fig 45】天然配列 PRO313 をコードするヌクレオチド配列を含む cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：45）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：45）はここで DNA43320 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。 40

【Fig 46】Fig 45 に示した配列番号：45 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO313 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：46）を示す図である。

【Fig 47】天然配列 PRO342 をコードするヌクレオチド配列を含む cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：47）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：47）はここで DNA38649 と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 48】Fig 47 に示した配列番号：47 のコード化配列から誘導された天然配列 PRO342 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：48）を示す図である。

【Fig 49】天然配列 PRO542 をコードするヌクレオチド配列を含む cDNA のヌ 50

クレオチド配列（配列番号：49）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：49）はここでDNA56505と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 50】Fig 49に示した配列番号：49のコード化配列から誘導された天然配列PRO542ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：50）を示す図である。

【Fig 51】天然配列PRO773をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：51）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：51）はここでDNA48303と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 52】Fig 51に示した配列番号：51のコード化配列から誘導された天然配列PRO773ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：52）を示す図である。 10

【Fig 53】天然配列PRO861をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：53）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：53）はここでDNA50798と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 54】Fig 53に示した配列番号：53のコード化配列から誘導された天然配列PRO861ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：54）を示す図である。

【Fig 55】天然配列PRO1216をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：55）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：55）はここでDNA66489と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。 20

【Fig 56】Fig 55に示した配列番号：55のコード化配列から誘導された天然配列PRO1216ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：56）を示す図である。

【Fig 57】天然配列PRO1686をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：57）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：57）はここでDNA80896と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 58】Fig 57に示した配列番号：57のコード化配列から誘導された天然配列PRO1686ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：58）を示す図である。

【Fig 59】天然配列PRO1800をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：59）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：59）はここでDNA35672-2508と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。 30

【Fig 60】Fig 59に示した配列番号：59のコード化配列から誘導された天然配列PRO1800ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：60）を示す図である。

【Fig 61】天然配列PRO3562をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：61）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：61）はここでDNA96791と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 62】Fig 61に示した配列番号：61のコード化配列から誘導された天然配列PRO3562ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：62）を示す図である。 40

【Fig 63】天然配列PRO9850をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：63）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：63）はここでDNA58725と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【Fig 64】Fig 63に示した配列番号：63のコード化配列から誘導された天然配列PRO9850ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：64）を示す図である。

【Fig 65】天然配列PRO539をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：65）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：65）はここでDNA47465-1561と命名されるクローンである。また、太字及 50

び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 6 6】F i g 6 5に示した配列番号：65のコード化配列から誘導された天然配列PRO539ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：66）を示す図である。

【F i g 6 7】天然配列PRO4316をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：67）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：67）はここでDNA94713-2561と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 6 8】F i g 6 7に示した配列番号：67のコード化配列から誘導された天然配列PRO4316ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：68）を示す図である。

【F i g 6 9】天然配列PRO4980をコードするヌクレオチド配列を含むcDNAのヌクレオチド配列（配列番号：69）を示す図であり、当該ヌクレオチド配列（配列番号：69）はここでDNA97003-2649と命名されるクローンである。また、太字及び下線フォントで示したのは、各々開始及び停止コドンである。

【F i g 7 0】F i g 6 9に示した配列番号：69のコード化配列から誘導された天然配列PRO4890ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：70）を示す図である。

【図1】
[Fig1]

GCCGAGCTGAGCGGATCCTCAGTACTGTGATCCGATCTTTCCAGCGGCTTCTGCAACCAAGCGGCTTACG
CCGGTCTCCGGCTCTCAGTCTCGCAGCTCGAACCCCAAGTCCCGAGAGTCCCGGAATCCCGCTCCAG
CTTACTTAAGAGGATGAGCGGTGCTCCGACGGCCGGGGCAGCCTGATGCTCTGCGCCGCCACCGCGTGTACT
GAGCGCTCAGGGCGGACCCCTGCACTCAAGTTCGCCCGCTTTGCGTCTCGGACGAGATGAATGCTCTGGCGCA
CGACTCTCTGAGCTCTGGCGAGGGGCTGCGGAACACCGGAGCGCACCCGAGTCACTGAGCGCGCTGGAGCG
GCGCTGAGCGCTGCGGGTCCGCGCTGTGAGGGAACCGAGGGGTCCACCGACCTCCCGTTAGCCCTGAGAGCG
GGTGGACCTGAGTCTCTTACAGCTCGACGACAACTCAAGGCTCAGAACGAGGATCCAGCACTCTTCCA
CAAGGTGGCCAGCAGCAGCGGCACCTGGAGAAGCAGCACCTGCGAATTCAGCATCTGCAAGCCAGTTTGGCT
CTTGAGCCCAAGCAGCTAGACCATGAGGTGGCCAAAGCTGCCGAAGAAAGAGGCTGCCGAGATGGCCAGCC
AGTTGACCCGGCTCAAAATGTACCGCGCTGCAACCGCTGCCAGGATTCAGGAGCTGTTCCAGGTGGGGA
TGGAGCTGGACAGTAATTCAGAGCGGCCAGTGGCTCAGTGGACTTCAACCGGCCCTGGGAAGCTACAAGGC
GGGTTTGGGATCCCCACGGCGAGTCTTGGCTGGGCTTGGGAAGGTGCATGATCACGGGGGACCGCAACAG
CGCGTGGCGGTGAGCTGCGGGAGTGGCAACCGCGAGTTGCTGCACTTCCGTCGACACTGGTGGGCA
GGACACGGCTATAGCTGCACTGCAACCGCTGGCGGAGCTGGGGCCACCGCTCCACCGCCAGCG
CTTCCGTAACCTCTCAGCTTGGGACAGGATCAGGACCTCCGAGGACCAAGAACTGCGCCAAAGAGCTCTC
TGGAGGCTGGGTTTGGCACTCGAGCATTCAACCTCAACGCGCACTACTCCGCTCCATCCACAGCAGCG
CGAAGACTTAAGAAGGGAATCTTGGGAAGACTGGCGGGGCGCTACTACCGCTCGAGGCCACCACTGTT
GATCCAGCCCATGGCAGCAGGCGAGCTCTTGGCTGGGCTGCTCCAGGCCACAGAAAGACGGT
ACTCTTGGCTCTGCGGAGGATGTGGCGCTTCCCTGCTGGCGAGGGCTCCAAGGAGGGGCTCTGGAATTT
GTGGACAGAGAAGAGACCACTGGGAGGAGCGCTTCTGAGTGCAGGGGGCTGCATGCGTTCGCTCTGA
GATCGAGGCTCGAGGATATGCTCAGACTAGAGGCTGGACCAAGGGGATGAGGCTTCACTCTTGTGGCA
GGAGTTGGGACTCAGAGGGACCACTTGGGGCAGCGAGCTGCGCTCAATGGCGGACTCAGTCACATTGACTG
ACGGGACAGGGCTTGTGGGTGAGAGCGCCCTCATGGTGTGCTGTGTGTGTAGTCCCTGGGGAC
ACAAGCAGGCGCCAAATGATCTGGGCGAGCTCACAGATGTTTGGAAATAAAGCAACCTCAGAACAC

【図3】
[Fig3]

CGATCCCTCGGGTCCCGGGATGGGGGGGCGGTGAGGCGAGGCAGAGCCCCCGCCCCATGGCGCGCTCGGAGC
CAGAGCGGAGGGGGGCGCGGGGGAGCCGGGCACCGCCCTGCTGGTCCGCTCGCGCTGGGCTGGGCTGGCG
CTGGCTGCTCGGCTCTGCTGGCGGTGGTCACTTTGGGAGCGGGCATCGCTGCTCCGCCAGGAGCTGCC
CAGGAGGAGCTGGTGGCAGAGGAGGACCGGACCCGTCGAACTGAATCCCGACAGAGAAGAACCCAGGATCCT
CGCGCTTTCTGAACGACTAGTTCGGCTCGCAGAAGTGCACCTAAAGCCCGAAACACGGGCTCGAAGAGCG
ATCGCAGCCATTAAGAGTTTCACTCCAGCAGCTGGACAGGACGGGCGAGGCGAGGCTGGGAGCGGACAGT
GGCTGGGAGGAAGCCAGAATCAACAGCTCCAGCCCTCTGGCTACAAACCGCAGATCGGGGAGTTTATAGTACC
CGGCTGGGCTCTACTACTGTACTGTGAGTCACTTGTAGTGGGGAAGGCTGTCTACTGAAGCTGGACTTG
CTGGTGGATGGTGTGCTGGCCCTGGCTGGAGGAATTCAGCCATGCGCGGAGTTCTCTCGGGGCCAG
CTCGGCTCTGGCAGTGTCTGGGCTGTGGGCTTGGGCTTGGGCTTGGGCTTGGGCTTGGGCTTGGGCTTGGGCT
GCCATCTCAAGGCTGCCCTTCTCACTACTTTCGAGCTCTTCAGGTTCACTAGGGGCTTGGTTCGCG
CAGTCTGCTCCAGGCTGCCGCTTCTGACAGCTCTCTGGCAGCGGCTTCTGGGCTTCTGGGCTTCTGGGCT
CTTGGCTCAGAGCTTCCCTTCTGAGGCTTCTGAGGCTTCTGAGGCTTCTGAGGCTTCTGAGGCTTCTGAGGCT
GATTCCTCACTTCTTCTTCAACCTCCCGCCACCGCCACTCTCCACTCTACTAGTCTCCCAATCTGACCTTT
GAGGCCCCAGTCACTCGACTCCCGCTGGCCACAGACCCCGAGTCAATGTGTCTCACTACTCTGTTGGCAA
GGATGGGTCCAGAAGACCCACTTCAGGCACTAAGAGGGGCTGGAGCTGGCGGAGGAGCAAGAGAGCTGGG
TAAAGCAGATATTATTTTATTATTATTGACAAAATGTTGATAAATGATTAATAAGTATATAA

【図2】
[Fig2]

MTVIRFFPAASATKRVLPPVLRVSSPRTWNPVPSRIPAPRLPKRMSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGV
QSKSPRFASWDMNLVLAHLGLQGLREHAERTSGLSALERRLSACGSACQTEGSTDLPLAPSRVDPVLH
SLQTLQKAGNRSLQQLFHKAQVQORHLEKHLRIQHLQSOFLDHHKHLDEHVAKPARRKRLPMAQPVDPANV
SRLHRLPRDQELFQVGERQSLFEIQPGSPFVLNCKMTSDGGWTVIQRHDSVDFNRPWEAYKAGFGDPHG
EFWLGLEKVSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGGEDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPSPSLVPPST
WDQDHLDRDKCAKSLSGGWFGTCSHSLNQQYFRSIPQQRKLLKGIKFWTKWGRYPLQATMLLIQPMAAE
AAS

【図4】
[Fig4]

MAARRSQRRRRRGEPTALLVPLALGLLALACLGLLAVVSLGSRASLSAQEPAQEELVAEEDQDPSELNPQT
EESQDPAPFNLRLVRRPSAPKGRKTRARRAIAAHYEVHPRPGDGAQAGVDGTSGWEEARINSSPLRYNRQI
GEPIVTRAGLYLYLCQVHFDEGKAVYLLKDLLVDGVLALRCLLEFSATASSLGPGQLRCLVSGLLALRPGSSLR
IRTLPAWHLKAAPFLTYFGLFQVH

膜貫通ドメイン： アミノ酸 51-70
N-グリコシル化部位： アミノ酸 224-228
cAMP-及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 46-50;118-122
N-ミリスチル化部位： アミノ酸 50-56;129-135;341-347;
357-363
フィブリノーゲン-ベータ及びガンマ鎖C-末端ドメインシグネチャー
アミノ酸 396-409

シグナルペプチド： アミノ酸 1-40
N-グリコシル化部位： アミノ酸 139-143
N-ミリスチル化部位： アミノ酸 27-33;29-35;36-42;45-51;
118-124;121-127;125-131;128-134
アミド化部位： アミノ酸 10-14;97-101
原核生物膜リポタンパク脂質結合部位： アミノ酸 24-35

【図 5】
【Fig5】

CCCAAGCCAGCCGAGCCGACAGAGCCGCGGGCCGCGGGGGTGTGCGGGGCCAACCCAGG**A**TGCTCCCTGCGC
CTCCTGCTACCCGGGGTCTCTACTGCTCTGGGGGCTGCTACTGTTGCTCTTGGAGTACCTTCTCTCAGGAGTTC
TGAAGAGCCCGACGCTACACGGAAATGACAGATGCGTATGAGTGGGACCCAGACAGGCTGCGCGGAGTGT
CAACGAGTGTCTGACCATCTCTGAGGCTGCGAAGGGGGAATGAAGTGTCATCAACCACTACGGGGGCTACTTGTG
C
CTGCCCGGTCTCCGCTGCGCTCATCAACGACCTTACATGGGAGGGACCCCGCCACAGTGCCTCCCGCTCAACAC
CCCAACCCCTCCGCCACAGGCTATGAGCCCGACGATCAGGACAGCTGTGTGGATGTGGACAGTGTGCCAGCC
CTGCACGACTGTGCCCGCAGCCAGGACTGCCATAAATTGCTGCTGCTCTCATGATGCACCTGCCCTGATGGTTAC
CGCAAGATCGGGCCGAGTGTGTGGACATAGACGAGTGCGCGCTACCGCTACTGCCAGCACCGCTGCTGTAACCTG
CTGGCTCTCTTCCGCTGCCAGTGCAGGACGGGCTTCCAGCTGGGGCTTAACAACCGCTCTGTTGATGTGAAC
GAGTGTGACATGGGGGCCCATGCGAGCAGCGCTTCTCAACTCTATGGGACCTTCTGTGTGCTGCCACAG
GGCTATGAGCTGCATCGGATGGCTTCTCTGCGAGTGATTTGATGAGTGTAGCTACTCCAGTACCTCTGTGAG
TACCGCTGCGCTCAACGAGCCAGGCGCTTCTCTGCTGCCACGCGGTACCAGCTGCTGGCCACACGCTC
TGCCAAAGCAATTGATGAGTGTGAGTCTGTGCGCACACAGTGTCTCCGAGGGCCCAACCTGTGTGCAACTTCCATGG
GCTACCGCTGCGTGGACACCAACCGCTGGTGGAGCCCTACATCCAGGCTCTGTGAGAACCCGCTGTCTCTGCGC
GCTCTCCAAACCTCTATGTCCAGAGAGGCTTATCATCAATTGTGCACCGCTACATGACCATCACTCCGAGCGGAGC
GTCCCGCGTGTGCTTCCAGATCCAGGCGACCTCCGCTTACCCGCGTGTCTACAATGCCCTTTCAGATCCGTGCT
GGAACCTGCGAGGGGAGCTTTTACATTAGGCAAAATCAACAAGCTCAGCGCATGCTGGTCTCTGCCCGCGCGTGT
ACGGGCCCCCGGAGTACGTGTGGACCTGGAGATGGTCAACATGAATTCCTCATGAGCTACCGGGCGAGCTCT
GTACTGAGGCTCACGCTCTTTTAGGGGCTACACCTTCT**T**AGGAGCAGGAGGGAGCCACCTCCCTGCAGCTAC
CTGAGCTGAGAGGCTGTGTTGTAGGGGCGAATGAGAAAGGCAATAAAGGAGAGAAGAGCTCTGGTGGCTGAG
GTGGCGGGTCACTGTCAGGAAGCTCAGGCTGGGGCAGGGTGGCACTTGGGGGGCGAGGCTGCACTTCACTAA
ATGGGGTCTCTATATGTTAGGCCACGGGGCCCCATTGACAGGAGCTGGGAGCTCTGCACACAGAGCTCACT
C
ACCCCGAGAGGAGGAGGATTAACGAGGAGGGCGGACTCCAGGCCCGGCCAGAGATTGGGACTTGGCTGGCTTG
CAGGGGCTCTAAGAACTCCACTCTGGACAGCGCCAGGAGGCCCTGGGTTCCATTCTCAACTCTGCTCAAACTG
TACATTGGATAAGCCCTAGTAGTTCCTGGGCTGTFTTCTATAAAAGAGGCAACTGGAAAAA

【図 6】
【Fig6】

MLPCASCLPGSLLWLLLLLLLSASPQDSEEPDSYTECTDGYEWDPSQHCRDVNECLTIPEACKGEMKCNINHY
GGYLLCLPRSAVINDLHGGEPFPFPVPAQHNPFCPGYEPDDQDSVDVDECAQALHDCRPSQDCHNLPGSYQFT
CPDGYRKIPBCVDIDECRYRQCQHRVNLPGSFRQCPEPGFQLGNRRSCVDVNECDMGAPCEQRCFNSYGTLL
CRCHQGYELHRDGFSCSDIDECSSYSYLQCYRVNEPGRFSCHCPQGYQLLATRLQDIDECESGHAQCSEAQT
VNFHGGYRCVDTNRCVEPIYQSENRLCPASNPLCREQPSIVHRYMTITERSVPADVPFIQATSVYPGAYNA
FQIRAGNSQGBFIYRIQINNVSAMVLARPVTGPREYVLDLDMVTMNSLMSYRASSVLRITVTVGAYTF

シグナルペプチド：

アミノ酸 1-25

N-グリコシル化部位：

アミノ酸 198-202;394-398

N-ミストイル化部位：

アミノ酸 76-82;145-151;182-188;
222-228;290-296;305-311;371-377;
381-387

アスパラギン酸及びアスパラギンヒドロキシル化部位：

140-152;177-189;217-229;258-270

【図 9】
【Fig9】

CGGACGCGTGGGCGGACGCGTGGGCGCGCGACCGCCCCGGCCGGCCCTCGGCCCTCGGCACTCGCGCTCC
CTCCCTCCGCCCGCTGCGCGCGCTCTCCCTCCCTCTCTCCACAGTGTCCCGTTCGGGTCA**A**TGCCGAGGCTCC
GGCCCGCGCGCGCGCTGCTGCTCTCGGGCTGCTGCTGCTCGGCTCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCAGA
GCCCGCGTGTGCCCATCCGTTCTTGAAGAAGGACCGCTGCCGCTTGGGGAAGGCGAGCTGCACTTCCGCGG
GAAGGTCTATGCTTGGACGAGACGTGGCACCCGAGCTTAGGGCAGCCATTCCGGGTGATGGCTGCTGCTGCTGTG
C
GCCTGCGAGGGCGCTCAGTGGGGTGCGCGTACACGGGGCCCTGGCAGGGTCACTGCAAGAATCAAAACAGAG
TGCCCAACCCCGGCTGTGGGCGCGCGCGCGCTGCGCGGAGCTGCTGCCAGCTGCTGCCAGAGCGCGACG
AGTTGCGAGCGCGAGCGCGCGCGCTGCTTTCGAGATTCGCGGGACCGAGCATTCGACGATATAGAGCACCG
GGGAGCGCGAGCGCTGCGAGCGCGCGCGCTGCTGACGCGCACACGAGCTTCTGCGGCTGCTGCTGACAGCGCGAG
TCCGAGCGGGTGGCACGAGCCGAGCTTCCGCTGCGGCTCTAGCCTCCGCTCTCTATCTCTCAAGCGCGGTG
GACCGCTTACAGGATCCGCTTCTCAGACTCCAATGGCAGTGTCTGTTGTAGCACCCCTGCGAGCGCCACCCAA
GATGGCTGGCTGTGGGGTGTGGCGGCGAGTGCCTCGTGTGCTCTGCGGCTCCTTAGGGCAGAACAGCTGCAT
GTGGCACTTGTGACACTCACTCACCTTTCAGGGAGGCTTGGGGGCTCTCATCCGCGACCGGGCGCTGGTGCAT
GAGACTTCAATGGCATCCGCTGACTGTAGAAGGCCCGCCACAGCAGGGCGTAGGGGGCATCACCTGCTCACTCTC
AGTGACACAGAGGACTCTTGTGATTTTGTGCTGCTTCTCCGAGGGCTGTGTGAACCCAGGAGTGGGGGACTAACC
CAGGTTCCCTTAGGCTCCAGATTCTACACAGGGGCGAGTACTGCGAGAACTTACGGCCAAATGTTCTAGCCCGAG
GAACAGGCTTGTGAGGTGCTGCCAACCTGACAGCTCCAGAGAGATGGAAGTGGCTGGTGTGGGGAGCTGAG
ATGGCCCTGGAGTGGGACGCGACCGCAGGGCTGCGCATCAGTGGACACTTGTGCCAGGAAGAGGTGCGACGTC
CTGCAAAAGTGTCTTTGTGGGGCTGATGCCCTGATCCCAAGTGCAGAGGGTGTGCTGGCGCTCAGCCAGCTCAGC
TGTGCTAGGAATAAGTCTCCCTGATCTATCAGGTGCAAGTGGTGGGACAGCAAGTGAAGTGGTGGCCATGACATG
GAGACCAAGCTCAGCGAGGAGTACGCACTGTCTGTGCCCATGTGCTGAGCTCCAGCAGGAGGACACAG
CGCTGTGGGTACTGCTTGGCTGGGCTGGCTGCCAGGGGCTCATATGCTGCTGCAGAAATGAGCTTCTCTGAACTGT
GGCACCAAGGACTTCCACAGGAGAGCTTCCGGGGGACGTGGCTGCCCTACTGTGGGACATGAGCGCGCG
CATGACACGCTGCCCTGCCCTTAGCAGGAGCCCTGTGTGCTACCCCTGTGAAGAGCCAAAGCAGAGGGCAGCGC
TGGCTTTCTTGGATACCCACTGTGCACTGCACTATGAAGTGTGCTGGCTGGGCTTGGTGGCTCAGAACAAGCG
ACTGTCACTGCCCACTCTCTTGGGCTCTCTGGAACGCCAGGGGCTCGCGCGCTGCTGTAAGGAGTCTTATGGCTCA
GAGGCCAGGGTGTGTGAAGGACCTGGAGCGGAACTGCTGCGGCACCTGGCAAAAGGATGAGCTCTCTGTGATG
ATCACCAACAAAGGTAGCCCCAGAGGGGAGCTCCGAGGGCAGGTGCATAGCCAAACAAATGTGAGGTTGGCGGA
CTGCGCTGGAGCGCGCGCGCGCGAGGGGCTGCGGGCGCTGGGGGCTCCGGATACAGCTCTGCTGCGCGCGCT
GTGGTGTGCTGCTCCGCGCCCTAGCGCCCGCCAAACCTGGTGGTCTTGGGCGCGCGCGAGACCCCAACATATGC
TCTTTCGAGGGGCGAGCGCGCCCGCCACCGGGCTGCTGGGGGCCCAACTACAGCCGCTCTGCTCACTCTGCGACC
TGCCAGAGAGCAAGCGGTGATCTGTGACCCGGTGGTGTGCCACCGCCCGCAGCTGCCACAGCGGTGAGGCTCCG
GACGACTGCTGCTGCTTGTGCTGTGAGAAAGATGTGAGAGACTTCCAGGGCTGCCAAGGCGCGGACCCCA
CGAGAGGCTGCTGATTTTGTAGTGTGACCGAGCTGGCGGGCAGCGGGTACGCGGTGGCAACCCGCTTGTGCCCGCC
TTTGGCTTAATTAAGTGTGCTGCTGCTGCACTGCAAGGGGGGCACTGGAGAGGTGCATGTGAGAAGGTGCAGTGT
CCCCGCTGGGCTGTGCCAGCGCTGTGCTGTCAACCCACCGACTGCTGCAAAACAGTGTCCAGTGGGGTGGGG
GCCACCCCGAGCTGGGGGACCCATGCGAGGCTGATGGGCGCGGGGCTGCCCTTTTGGCTGGGACAGTGGTGTCCA
GAGAGTCAAGCTGGCACCCCTCAGTGGCCCTTTTGGAGAGTGAAGTATCACTGCTGAGATGGGGCAGGG
GTGGCTCACTGTGAGCGGAGTCACTGCTCACTGCCACTGCTGTGTGGCTCGGGGAAGGAGAGTGCAGTGTGCTTCC
CGCTGACCGCCACCGCGCGCGCCAGAGCAAGCACTGATCCAGAGCTGGAGAAAGGAGTGCAGAGGCTCT**T**AG
GGAGCGCGCAGAGGGCGAAGTGACCAAGAGGATGGGGCTGAGCTGGGGAAGGGGTGGCATCGAGGACCTTCTTG
CATTTCTCTGTGGAAAGCCAGTGCCTTTGCTCTCTGTGCTGCTCTACTCCACCCCACTCACTCTGGGAAAG
CACAGCTCCACAAGGGGGAGGCGAGCTGGGCGAGACCGAGGTGCAGGCCACTCCAAGTCTCTGCCCTGCCACCT
CGGCTCTGTGCTGAGAACCCACCCCTTCTCTCTGCTGATCATATGATGCTCACTGGCTTGTGGGATTTTAAATTTAT
CTTCACTAGCAACCAAGGGCCCCGACACTCCACTCTGCTGCGCTGAGCTGAGCAGAGTCAATTTGGAGAGT
TTTGTATTTTAAATAAATCTTTTTCAGTCAAAAAA

【図 7】
【Fig7】

GCTGCTTGCCCTGTTGATGGCAGGCTTGGCCCTGCAGCCAGGCACTGCCCTGCTGTGCTACTCTCTGCAAGGCCCA
GGTGAGCAACGAGGACTGCTTCAAGTGGAGAACTGCACCAAGTGGGGAGAGTGTGGACCGCGCGGATCG
CGAGTGGCTTCTGACCTCATCAGCAAGGCTGCAGCTTGAACTGCTGGATGATCAACAGGACTACTACGT
GGGCAAGAAGAACATCAGTGTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCAGCGGGGCCCATGCCCTGAGCGGCTGC
CGCATCTCTGCGCTGCTCCTGCACTGGCTGCTGCTCTGGGACCGCGGCGAGCT**A**TAGGCTCTGGGGGGCGC
CGCTGCAGCCCACTGCGGTGTGGTGGCCAGGCTCTGTGGCACTCTCAGACAGCTGGCCAGTGGGAGGCTG
TCTTGGTCTCTGAGGCATCTTAACCGAAGTCTGACCATGTATGTCTGCACACCTGTCCCCACCTTGACCTTC
CCATGGCGCTCTCCAGGACTCCACCCCGGAGATCAGCTCTAGTGACACAGATCCGCTGCGAGATGGCCCTCCA
ACCTCTCTGCTGCTGTTTCCATGGCCCGAGCTTCTCCACCTTAACTCTGCTCAGGCACTCTTCCCCCAGG
AAGCTTCTCTCTGCCACCCCATCTATGACTTGAGCCAGGCTGTGGTGGTGTCTCCCCGACCCAGCAGGGGAC
AGGCACTCAGGAGGGCCCACTAAAGGCTGACATGAAGTGTGACTGATGCACTGGAGGACAAAGATCGACGTGAG
TTCTGGGACTCTCCAGAGATGGGCGCTGGAGGCTGGAGGAAGGGGCGAGGCTCACATTCTGGGCGCTCCCTG
AATGGCAGCTGAGCACAGCTAGGCCCTTAATAAACACTCTTGGATAAGCAAAAAA

【図 8】
【Fig8】

LLALLMAGLALPGTALLCYSCKAQVSNEDCLQVENCTLQLEGQCWTARIVAGLLTVISKGSLNCVDDSDYYV
GKNITTCDDTLNCASGAHALQPAATLALLPALGLLLWPGQL

シグナルペプチド：

アミノ酸 1-16

N-グリコシル化部位：

アミノ酸 36-40;79-83;89-93

N-ミストイル化部位：

アミノ酸 61-67

アミド化部位：

アミノ酸 75-79

【図 10】
【Fig10】

MPSLPAPPAPLILLGLLLLSRPARFAGAPPEPVLPIRSEKEFLPVRGAAGCTFGGKYALDETWHFPLDGGQPGVFM
RCVLACACEAPQWRNRTRGPRGRVSKNKKPECPPTACGQPRQLPGHCCQTCQBERSSSERQPSGLSEFYPRDPEHR
SYSRDEGEPAERARGDGHDFVALLTGPSSQAVARARVLLRSLRFSISYRLLDRPTRIFRFSDSMSVLEPFP
AAPTQDGLVGVWYRPLSLRLLRQLHVALVTLTHPSGVEWGLIRHRAAAEFBSAILLECPQGVGVI
TLTLESPDESILLFLLFRLLEPRSGLTQVPLRLQLLHQGLLRETOANVSAQEPGPAEVLNLTQVQMDWL
LCRLQMALEWAGRPGLRISGHIAARKSCDVLQSVLCADALIPVQTGAAGSASLTLLNGSLIYQVQVVGTSSEV
VAMTLETQPORRDRQTVLCHMACLOPGGHTAVGICPLGARGAHMLLQNELFLNVGTKDFPDGELRGHVAALPYC
GHSARBDTLPVPLAGALVLPVKSQAAGHAWLSLDTCHLHYEVLLAGLGGSEQGTVTAHLLGPPTGPPRRLK
FGYGSBAQGVVKDLEPELLRHLAKGMASLMITTKGSPRGLRGQVHIANQCEVGGRLLEAAGAEVRALGAPDTA
SAAPPVVVGLPALAPAKPGGPRPRDNTCFEGGQQRPHGARWAPNYDPLSCITCQRRVTICDPVCPPPSPCH
PVQAPDQCPCVPEKQDVRDLPLGPRSDPGEQCYFDGDRSWRAAGTRWHPVPPFGLIKCAVCTCKGGTGEVHC
EKVQCPLRACAPVRVNPNTDCCQCPVSGAHPLQDPMQADGPRGCRFAGQWFFPESQSWHSPVFPFGEMSCITC
RCGAGVPHCRERDSCSLPLSCGSGKESRCSRCTAHRRPETRTDPELEKEAEGS

シグナルペプチド：

アミノ酸 1-23

N-グリコシル化部位：

アミノ酸 217-221;351-355;365-369;
434-438

チロシンキナーゼリン酸化部位：

アミノ酸 145-153;778-786

N-ミストイル化部位：

アミノ酸 20-26;47-53;50-56;69-75;
73-79;232-238;236-242;390-396;422-428;
473-479;477-483;483-489;489-495;5
73-579;
576-582;580-586;635-641;670-676;7
73-779;
807-813;871-877;905-911

アミド化部位：

アミノ酸 87-91

細胞接着部位：

アミノ酸 165-168

ロシンジッパーパターン：

アミノ酸 315-337

【図 1 1】
【Fig11】

GGGGGAGAAGCGGGCGAGCCCGAGCTCTCCGAGCACCGGGTCGGAAAGCGGACCCGAGCCGCGCAGGAAGCTG
GGACCCGAACCTCGCGGGACCCCGCCACCCCACTACCTGCGCAGGTCACAGACCCCTCGGAACCCGAGAGGC
CCGCGCTCTGAAGGTGACCCCTCGGGAGGAAGCG**AAGCG**CCCTCGCGAGGACGATGGCCCGCCCGCCGCTCGC
CCCGCGCGCATCCTCGCCCTCGCTTGTGGTCTCTGTGACGCTCGGCCCTCAGAGGACCCAGCGCCGCGCCACC
GGCCCGCCCTCGGGTGCCTCGCGGGAGCGGACTGCTTGAACAGCTTTACCGCGGGGTGCTGGCTTCGTGCT
GGACACCAACGCCTCGGTGAGCAACGGAGCTACCTTCCTGGAGTCCCCACCGTCGCGCGGGGTGGAAGCTGCGT
CGCGGCTGCTGACCAACCCAGAACTGCAACTTGGCGCTAGTGGAGCTGCAGCCGACCGCGGGGAGGACGCCAT
CGCCGCTGCTCTCATCACTGCTCTACGAGCAGAACTCTGTGTGCAAGTTCGCGCCACGGGAGGGCTTCAT
CAACTACCTCAGAGGGAAGTGTACCGCTCTACCGCCAGCTGCGGACCCAGGGCTTTGAGGGGTCTGGGATCCC
CAAGGCTGGGAGGATAGACTTGAAGGTACAACCCAGGAACCCCTGGTCTGAAGGATGTGAAAAACACAGA
TTGGCGCTTACTCGGGGTGACACGGATGTACGGGTAGAGAGGAAGACCAACACAGGTGGAACCTGGGGGACT
CAAGGAAGGACCTACCTGTTCCAGCTGACAGTGACTAGCTCAGACACCCAGAGGACACGGCCAACTGACAGT
CACTGTGCTGTCCACAGCAGACAGAAGACTACTGCTTCGCATCCAACAAGGTGGGTGCTGCTCGCCGGGGCTCTTT
CCCCGCTGGTACTATGACCCACGGAGCAGATCTGCAAGAGTTTCGTTTATGAGGGCTGCTTGGGCAACAGAA
CAACTACCTTCGGGAAGAGAGTGCATTCTAGCTTGTGCGGGTGTGCAAGGTGCGGCTTTGAGAGGACGCTCTGG
GGCTCAGGCGACTTTCACCGGCCCCCTCCATGGAAGGGGCCATCCACTGTGCTCGGACCTGTACAGCCAC
CAGTTCGCGCTGACCAATGGCTGCTGACAGTTCCTGGAGTGTGACGACACCCCAACTGCCCCGAGCG
CTCCGAGAGGCTGCGCTGTGAAAAATACAGAGTGGCTTTGACGAGCTCCAGCGCATCCATTCCCCAGTGACAA
AGGGACTGCGTGGACCTGCGACAGACAGGACTCTGCAAGGAGAGCATCCCGCGCTGGTACTACAACCCCTTCAG
CGAACACTGCGCCGCTTTACCTATGTTGTTGTTATGGCAACAAGAACAACTTTGAGGAAGAGCAGCAGTGCCT
CGAGTCTTGTGCGGCATCTCCAAGAGGATGTGTTTGGCTGAGCGGGAAATCCCATTTCCAGGACAGGCTC
TGTGGAGATGGCTGTACAGCTGTTCTGTTGTCATGTCATTGTGTTGTTGTTAGCCATCTGGGTACTGCTTCTT
CAAGAACAGAGAAGGACTTCCACGGACACACACCCACCCACCCACCCCTGCCAGCTCCACTGTCTCCAC
TACCGAGGACAGGAGACTGTTCTATAACACACACCCCGCGCCCTCT**TGAG**CCCTGGGTCTCACCGGCTCTCAC
CTGCGCTGCTTCTGCTTGTCCAAAGGACAGGCTGGGCTGGGAAAACTTTTGAACAGAGACTTCTGCCTGTTTC
CAGGCCCACTGTGCTCAGAGACAGGGCTCCAGCCCTCTTGGAGAAGTCTCAGCTAAGCTCACGCTCTGAGA
AAGCTCAAAAGTTTGGAGGAGCAGAAACCCCTTGGGCGAGAAGTACAGACTAGATGGACCTGCCTGCATAGGA
GTTTGGAGAGTTGGAGTTTGTGTTCTGTTCAAAGCTGCTGTCCTTACCCCATGGGTCTAGGAAGAGGAG
TGGGTGGTGTGACAGCTCGAGGCGCCCAACCTGCTCTCCGAGCTCTCTTCCATGCTGTGTCGCGCCAGGGCTG
GGAGAGAGGACTTCTGTGTATTTGTGTGTGTAAGAGTTGCTTTTGTATTATGCTGTGGATGGGTGA
AGAGAGGGGAAGGCTCTTGGCTCTGCTGCTCTCTCTCTTCCCTTCCGCCAAGATTGAGCTCTGCGCTTG
ATCAGCCCACTGCGCTAGACAGCAGACAGAGCGAGGAGGCTCAGCTGCATTCCCGAGCCCAACCCCA
AGGTTCTCCACATCAGCCCGAGCCACCCACTGGGTATAAAGTGCTTTGTGAAAAAATAAAAAAAAAA
AAAAAA

【図 1 2】
【Fig12】

MAPARTMARARLAPAGIPAVALWLLCTLGLQGTQAGFPFAPPGLPAGADCLNSFTAGVPGFVLDTNASVSNGATF
LESPTVRRGWDCVRACCTQNCNLALVELQPDREGDAIAACFLINCLYEQNFCVAFPREGFINYLTREVYSYR
QLRTHQFSGSGIPKAWAGIDLKVQPEPLVLKDVNTDWRLLRGDTDRVERKDPNQVGLWGLKEGTLPQLT
SSDHPEDTANVTIVLSTKQTEDYCLASNKVGRCRGSFPRWYDTEQICKSFVYGGCLGNKNLYREEECILAC
RGVQGGPLRGSSGAQATFPQGPSMERRHPVCSGTCTQPTQPRCSNGCCIDSFLECDTNPNCPDASDEAAACEKYS
FDELQRIHFPSDKGHCVLDLPDTGLCKESI PRWYNPFSEHCARFTYGGCYGNKNFEEQQCLESCRGISKKDVF
GLRREIPIPTSGVEMAVTVFLVICIVVVVAILGYCFFKNQRKDFHGHHPPTPASSTVSTEDTEHLVYNYHT
TRPL

シグナルペプチド:

アミノ酸 1-35

膜貫通ドメイン:

アミノ酸 466-483

N-グリコシル化部位:

アミノ酸 66-70;235-239;523-527

N-ミストイリ化部位:

アミノ酸 29-35;43-49;161-167;212-218;

281-287;282-288;285-291;310-316;3
13-319;
422-428;423-429;426-432

細胞接着部位:

アミノ酸 193-199

臍臓トリプシンインヒビター(Kunitz)ファミリシグネチャー:

アミノ酸 278-298;419-438

【図 1 3】
【Fig13】

AGTCGACTGCGTCCCTGTACCCGGCGCAGCTGTGTTCTGACCCAGAAATAACTCAGGGTGTCACCGGGCGCTG
GCAGCGCTCCGCACACATTTCTCTGCGCGCCTAAGGGAACCTGTTGGCCGCTGGGCGCCGCGGGGGATCTTGG
CAGTTGGGGGCTCCCTCGGAGCGAGGGCGGAGGGGAGGCGGAGCTGGGGAAGCCAGCTGTAGAG
GCGGGTGCACCCGCTCAGACACAGCTCTGCTCTCGAGGGGACAGATCCAAAGTGGAGGACCTCTGCTGCG
GGGCGCTCAGAGAA**AGCGCGCGCGCTGCTGCTCTCTGCGAGCGCTCTGGCGCGCGCGCGCGCGCG**
CGAACACCCCACTGCCAGCCGCTGCTGCTGCTGCGGGCGCTGCTACAGCCTGCACACAGCTACCATGAA
CGCGCAGCGCGCGAGAGGCTGCTGCTGCTGCGAGGTGGGGCGCTCAGCACCTGCTGCGCGCGCGAGCTGCG
CGCTGCTGCTGCGCTCTCTGCGGGCAGGCGCAGGCGCGGAGGGGCTCCAAGAGCTGCTGTTCTTGGGTGCGACT
GGAGCGCAGCGCTTCCCACTGACCCCTGGAGAACAGGCTTTGCGGGGTTTCTCTGCTGCTCTCTCGCACCCCG
CGGCTCTGAAAGCGACACGCTGCAGTGGTGGAGGAGGCCAACGCTCTGTCACCGCGCGGAGATGCGCGGTACT
CCAGGCCACCGGTGGGTGAGCGCGCAGGCTGGAAAGGAGTGCATGCGACCTGCGCGCGCAACGGTACCTGTG
CAAGTACCAAGTTTGAAGTCTTGTGCTGCTGCGCGCGCGCGGGCGGCTCTAAGTGTAGCTATCGCGCGCGCT
CAGCTGCACAGCGCGCTCTGGAATCAGTCCACCTGGGACCGAGGTGAGTGCCTGCTCGCGGGGACAGCTCCC
GATCTCAGTTACTTGCATCGCGGACGAAATCGGCGCTGCTGGGACAAACTCTCGGCGGATGTGTTGTGCTCCGT
CCCGGGAGGTACCTCGCTGCTGCGAAATGCGCGAGAGCTCCCTAAGTGCCTAGACGACTTGGGAGGGCTTTGGCTG
CGAATGTGCTACGGGCTTCAAGCTGGGGAAGGACGGCGCTCTTGTGTACAGTGGGGAAGGACAGCCGACCT
TGGGGGACCGGGGTGCCACAGGCGCGCGCGCGCTGCAACAGCGCGCTGCGCGAGAGACATGCGCAAT
CAGGCTGACAGAGAGCTGGGAGAGACCACTTGTGCTGCTGCAACAGCAATCAGTAACACTTATCTGAGAT
TCTCGATGGGATCAGACAGACGATGTCTACCTTCAAAATGCTCCCTCAAGCGGAGTCAAGGCCACTATCAC
CCCATCAGGAGCGTGATTTCAGATTTAATTTACGACTTCTCTGCCACTCTCAGGCTTTTGACTCTCTCTC
TGCCTGGTCTCATATTTGTGAGCAGCAGTAGTAGTGTGTTGTTGATCTTGACCATGACAGTACTGGGGCTTGT
CAAGCTCTGCTTTCAGAAAGCCCTCTTCCAGCAGCAAGGAAGGAGTCTATGGGCGCGCGGGCTGGAGAGTGA
TCTTGAGCCCGCTGCTTTGGGCTCCAGTTCTGCACATTCGACAAACAAATGGGGTGAAGTTCGGGACTGTGATCT
CGGGACAGAGCAGAGGTTGCTTGTGCGGAGTCCCTCTTGCTCTAGTGATGCA**TAGG**GAACAGGGGACAA
TGGGCACTCTGTGAACAGTTTTCATTTTGTGATGAACGGGGAACCAAGAGGAACCTACTTGTGTAACGTGACAA
TTTCTGAGAAATCCCCCTTCTCTAAATCCCTTTAATCCACTGAGGAGCTAAATCAGAACTGCACTCTCTTC
CCTGATGATAGAGGAAGTGAAGTGCTTTAGGATGGTGATACTGGGGGACCGGGTGTGCTGGGGAGAGATATT
TCTTATGTTTATTCGAGAAATTTGGAGAGTGATGAACTTTTCAAGCATTGGAAACAAATAGAACACAAATAT
AATTTACATTAATAAATAATTTTACCAAAATGGAAGGAAATGTTCTATGTGTTTACGGCTAGGAGTATATGG
TTCGAAATCCAGGGAAAAATAAAAAATAAAAAATTAAAGGATTGTTGAT

【図 1 4】
【Fig14】

MRPAFALCLLWQALWPGPGGGEHPTADRAGCSASGACYSLLHHATHKQAAEEACILRGALSTVVRAGAFELRAVLA
LLRAGFGPGGGSKOLLFWVALERRSHCTLENEPLRAGFSWLSSDPGLESDTLQWVEEPQRCSTARRCAVLQNTG
OVEPAGWKEMRCHLRANGYLCKYQFVLCPAPRPGAASNLRYAPFQLHSAALDFSPPGTEVSALCQGLPISVT
CIADEIGARWDKLSGDLVPCPCGRYLRAKGCALPNCLDOLGFAECATGFLGKDGRCVTSGEQPTLGGTG
VPTRRPATATSPVPQRTWPIRWDEKLGETPLVEQDNSTVSIPEIPRWGSQSTMTSLQMSLQAESKATITPSGS
VISKFNSTSSATPQAFDSSAVVFIFVSTAVVVLVLTMTVLGLVKLFHSPSSQPRKESMGPPGLESDEPEPA
ALGSSSAHCTNNGVKVGDCLDRDRAEGALLAESPLGSSDA

シグナルペプチド:

アミノ酸 1-16

膜貫通ドメイン:

アミノ酸 397-418

N-グリコシル化部位:

アミノ酸 189-193;381-385

グリコサミノグリカン接着部位:

アミノ酸 289-293

cAMP- 及び cGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位:

アミノ酸 98-102;434-438

N-ミストイリ化部位:

アミノ酸 30-36;35-41;58-64;59-65;
121-127;151-157;185-191;209-215;2
67-273;
350-356;374-380;453-459;463-469;477-483

アスパラギン酸及びアスパラギンヒドロキシル化部位:

アミノ酸 262-274

【図 15】
【Fig15】

CGCTCGCCCCGTCGCCCTCGCCTCCCGCAGAGTCCCTCGCGGCAGCAGATGTGTGGGGTCAGCCACCGGC
GGGGAATAGGCTGAAATTCGCGGCGCTCAGGACACTGCTGGCCCTGATCCGGTCTCTGGTGGCCCTGGGCACTAC
CACATAGCAATGACATTCGGGAGCAGCCTTTGAACCGGGCATTTGCTGCTGTCAAGGAGATGCAATCCGAGAT
CTGGCCACGATGAGGCTGGCGTACTCCCTCATGAAGTCTCTCACGGGTCCCATGAGTGAATCAAAAATGTGGG
CTGTGCTTTGTGTGAACAGCAAGAGACAGGACCAAGCCGCTCTGTGTATGCTGTGGTGGCGAGGCGCATCCGCTGC
CTCTTTTACACACATGATAGCTTATATAGTATTAGGATACATATTAATAAATGCACCATGTGGACAGAGTC
GGTGGGAGCAAGACAGAGAGGGCCTTCTGTACTCGCGCCTTTCTTTTCATGGACCAATGGCATGGACCCA
TGCTGGCATCTTCTTAAACACAAATACAGTTTCTGTGGGATGTGCTCAATCTCAGATGTACATAGCTCAGGT
TGTTTTTGTAGCCATTTTGTCTTACAGTCACCTGGAATCCGGGAGCCCTGCTCATCCGATCCTCTCTTGTGA
CATGGGCGCACTTGTGCGCTGACACCCCTGTGCTGGGCTACTACAAGAACATTCACGACATCATCCCTGACAG
AAGTGGCCCGAGCTGGGGGAGATGCAACAATAAGAAAGATGCTGAGCTTCTGGTGGCCTTTGGCTCTAATCTCT
GGCCACACAGAGAATCAGTCGGCCTATTGTCAACCTCTTTGTTTCCCGGACCTTGGTGGCAGTTCTGACGCCAC
AGAGGCACTGGCGATTTTGACAGCCACATACCTCTGGGTACATGCCATACGGCTGGTTGACGGAATCCGCTGC
TGTGTATCTCTGTTTCGACAGAATAACCCAGCAACAACTGGTGAGCACGAGCAACAGTCACGGCAGGCCCA
CATCAAGAAGTTCACCTTCTGCTGTCATGGCTCTGTGACTCACGCTCTGTTTCGTGATGTTTGGGACACCAACGT
GTCTGAGAAATCTTGATAGACATCATCGAGTGGACCTTGGCTTTGAGAACATCTGTGTTGTTCTTTGGCGAT
CTTCTCTCTTCTTCCAGCTTCAAGTCACAGTGAAGGCGCATCTCACGGGTGGCTGATGACATGAAGAAACCTT
CTCTCTCTTCCCGCAGCTCTGCTGTGGGATCATGCTCTCATCGCACGCTCTGGTCTTACCTACCTCTGGGGGT
GCAGGTCGACAGCTGGGCGTGGGCTCCCTCTCGCGGGGCTTTGTGGGAGAAATCCACATGTGTCGCCATCTGCTGC
GTGCTATGCTTACCGGAAGCAGAAAAGAAGATGGAGAATGAGTCGGCCACGGAGGGGAAGACTCTGTCCATGAC
AGACATGCTCCGACAGAGGAGGTGACAGACATCTGGAATGAGAGGAGGAATGAATAAGGACAGGGACGGCA
TGGGCACTCGAGGACGGCTCAGTCAGGATGACACTTGGGCATCATCTCTTCCCTCTCCCATCTGATTTTGTCTCC
TTTTTTTTGTTTGTGTTTGGTAATGAAGAGGCTTGATTTAAAGGTTTCTGTGTAATCTCTAGCATACTGGGT
ATGCTCACACTGACGGGGGACCTAGTGAATGGCTTTACTGTGTGATGTGTAAGAAACAAACGAAACACTGACTT
CATACCCCTGCTCACGAAACCCAAAGACACAGCTGCCTCACGGTTGACGTTGTGTCTCTCTCCCTGGACAA
TCTCTCTTGAACCAAGGACTGACGCTGTGCCATCGCGCTCTGGTACCCCTGCACAGCAGGCCACAGACTCTC
CTGCTCCCCCTCATGCTCTTAAGAATCAACAGGTTAAAACCTCGGCTTCCTTTGATTTGCTTCCAGTCACATGG
CCGTACAAGAGATGGAGCCCGGTGGCTCTTAATTTCCCTTCTGCCACGGAGTTGCAAAACATCTACTCCAC
ACATGAGAGGCGGGTGGCACGCTGCAGCCCGGAGTCCCCGTTTACACTGAGGAACGGAGACTTGTGACCACAG
CAGGCTGACACATGGACAGAAATCTCCCTAGAAAGGTTTGGTTTGAATGCCCGGGGCGAGCAAACTGACATGG
TTGAATGATAGCAATTTACATCTGCGTTTCTTATGATCTGACGAAGCTCTGACTCTCACCCACCGTGTATATA
CATGAGTAACTCTTCTTAATTTCTCAAAAAGCGACTCTCCAGATTCCAGACCTTCCGCGATGACTTTTCTCTGAA
GGCTGTCTTTCCCTCGCCTTCTGGAAGTTCGCAATTAGAGCGAGTCAACATGGAGCATCTTAATTTGCAATTTA
GTTTTTACAGTGAATCAAGCTTTAAGTCTCATCCAGCATCTTAATGCCAGGTTGCTGTAGGTAATCTTTTGAAG
TAGATATATCTGCTGTTCTGCTATCTTATGCTATAACTCTGCGGTACAGGTAATGAGATGTAATACGGTACT
TCCCTCCCAACCATACGATAAAGCAAGACATTTTATAACGATACAGAGTCACTATGTGGTCTCTCCCTGAAATA
ACGCAATCGAAATCCATGAGTGCAGTATATTTTCTAAGTTTGGAAAGCAGGTTTCTCTTTAAAAAAATTA
TAGACACGGTCACTAAATGATTTAGTCAGAAATCTTAGACTGAAAGAACCTAAACAAAAAATATTTAAAGA
TATAAATATAGCTGATATATGTTATGTAAATTTATTTAGGCTATATACATTTCTCTATTTTCGCATTTTCAATAA
AATGCTCTTAATACAAAAA

【図 16】
【Fig16】

NVKFPALTHYWPLIRFLVPLGITNIAIDFGEQALNRGIAAVKEDAVEMLASYGLAYSLMKFFTGPMSDFKNVGLV
FVNSKRDRTKAVLCMVVAGIAAVFHTLIAYSDLGYIINKLHHVDESVGSKTRRAFPLYLAAPFPMDAMWTHAG
ILLKHKYSFLVGCASISDVIAQVVFVAILLHSHLECREPLLIPLISLYMGALVRCTTCLGYKNIHDIIPDRSG
PELGGDATIRKMLSFWWPLALILATQRI SRPIVNLVSRDLGGSSAATEAVAILTATYPVGHMPYGLWTEIRAVY
PAFDKNNPSNKLVSNTVNTAAHIKKTFFVCMALSLTLCFVMFWTPNVSEKILIDIIIGVDFAFELCVVPLRIFS
FFPVVPTVRAHLTGWMLTKTFVLAPSSVLRIIIVLIASLVPLPYLGVHGATLGVGSLLAGFVGESTMVAIAACY
VYRKQKKKMNESATEGDSAMTDMPPTEVTDIVEMREENE

膜貫通ドメイン：

アミノ酸 86-105;162-178;327-345;
359-374;403-423

N-グリコシル化部位：

アミノ酸 347-351;461-465

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位：
アミノ酸 325-329

N-ミリスチル化部位：

アミノ酸 53-59;94-100;229-235;
267-273;268-274;358-364;422-428;
425-431;431-437【図 17】
【Fig17】

CCCCGCGTCCGCGGACGCTGGGAAGGCGAGAATGGAGACTCCAAGCTGCCTCCTAGGGCTCTTTGCCCTCATC
CTCTCTGGCAATGCGATTACAGCCCGGAGGCCGACAGCGGAGGACGCTGCCCCAGGCTGGGTGTCCCTGGGC
CGT
GCGGACCCCTGAGGAAGAGCTGAGTCTCACCTTTGCCCTGAGACAGCAGAATCTGGAAAGACTCTCGGAGCTGCTG
CAGGCTGTGCTGGATCCAGCTCTCTCTCAATAAGGAAATACCTGACCTGAGGAATGTGGCTGATCTGGTGAGG
CATCCCCCACTGTGACCTTCACACCGCTGCAAAATGGCTTTGGCAGCGGACCCAGAAATGCCAATCTGTGATC
ACACAGGACTTTCTGACTTCTGGCTGAGCATCCGACAAGCAGAGCTGTCTGCTCCCTGGGGCTGAGTTTCATCAC
TATGTGGGAGGACTACGGAACCCACTTGTGAAGTCCCACTCCTTACAGCTTCCACAGGCTTGGCCCCC
CATGTGGACTTTGTGGGGGACTGCACGTTTCCCCCAACATCATCTCTGAGGCAACGCTCTGAGCCGAGGCTG
ACAGGGACTGTAGGCTGCTCATCTCGGGGTAACCCCTCTGTGATCCGTAAGCGATACAATTTGACCTCACAAGAC
GTGGGCTCTGGCAGCAGCAATAACAGGCAAGCCTGTGCCAGTTCTGTGAGGAGTATTTCCATGACTCAGACCTG
GCTCAGTTTCATGCGCTCTTTGCGGTGGCAATTTTGCACATCAGGCATCAGTAGCCCTGTGGTTGGACAACAGGCG
CGGGGCGGGCGGGGATGAGGCCAGTCTAGATGTGCGAGTACCTGATGAGTGTGCTGGTCCCAACATCTCCACCTGG
GTCTACAGTAGCCCTGGCCGCGATGAGGGAAGGAGGCCCTTCTGCACTGGCTCATGCTGCTCAGTAATGAGTCA
GCCCTGCCACATGTGCATCTGTGAGCTATGGAGATGATGAGGACTCCCTCAGCAGCGCTCATCTTCCAGCGGGTC
AACACTGAGCTCATGAAGGCTGCCGCTCGGGGTCTCACCTCTGCTCTTCCGCTCAGGTGACAGTGGGGCGGGGTG
TGGCTGTGCTCTGGAAGACACAGGTTCCGCCCTTACCTTCCCTGCTCAGGCCCTATGTCAACCAAGTGGGAGGC
ACATCTTCCAGGAACCTTTTCTCATCAACAATGAATTTTGAGTAATCATGCTGTGGCTGTGACCAATGTG
TTCCACGCGCTTCATACAGGAGGAAGCTGTGAAGAATCTCTGAGCTTACGCCCCACTTCCACCACTCCAGT
TACTTCAATGCAAGTGGCGCTGCCATACCAAGATGTGGCTGCACCTTTCTGATGGCTACTGGGTGGTCAGCAACAGA
GTGCCAATTCATGAGGTGTGCGGAACCTCGGCCCTTACTCCAGTGTGGGGGATCTCATCTCTTGAATCAATGAC
CACAGGATCCTTAGTGGCGCGCCCTCTTGGCTTTCTCAACCAAGGCTCTACAGCAGCATGGGGCAGGTCTC
TTTGATGTAACCCGTGGCTGCCATGAGTCTGTCTGGATGAAGAGGTAGAGGCGCAGGGTTTCTGCTCTGGTCTC
GGCTGGATCTCTAACAGGCTGGGGAACCACTTCCAGCTTTGCTGAGAGACTTACTCAACCCCTGACCTT
TTCTATCAGGAGAGATGGCTTGTCCCTGCTGCAAGCTGGCAGTTCAGTCCCTTATTTGCTCCCTTTGGAAGC
CCTGTGAACCTCAACTATTGACTGCTGCAGACAGCTTATCTCCCTAACCTGAAATGCTGTGAGCTTGTGACTG
ACTTCCAAACCTTACATGCTCCATCATACTCAGGCTTCCCTACTCTGCTTGAATTTCTCAATATTCATATGCTGTA
ACTAGCATTTTGAATGCCCTTCCCTCCGATCTCATCTTTCTTTTCAATCAGGCTTTTCCAAAGGGTTGTA
TACAGACTCTGTGCACTATTTCATTTGATATTCAATCCCCAATTCACTGCAAGGAGACTCTACTGTGACCGGTTT
ACTCTTTTCTACCTCGACATCTCAGAAACATGGCCTCCAGTGCATACCTCTCAATCTTTGCTTTATGGCTTCTC
ATCATAFTGGCCACTCCCTCTCTTACTTACTGCTCCAGGCTTCACTCTGACTACTCTTGTCTCTCTCTCTCTCT
CATCAATTTCTGCTCTCATGGAATGCTGACTTCAATGCTCCATTTGAGATTTTGTGCTCTCTCAGTTTACT
CATTTGCCCTGGAACAAATCACTGACATCTACAACCAATACCATCTCACTAAATAAGACTTTCTATCCAATAAT
GATTGATACCTCAATGTAAAAA

【図 18】
【Fig18】

MGLQACLLGLFALILSGKCSYSEPEPQRRRLPPGWVSLGRADPEEELSLTFALRQONVERLSSELVQVSDPSSPQ
YGRYLTLLENVADLVRPSPLTLHTVQKWLAAAGAQKCHSVITQDPLTCWLSIRQABELLLPGAETHHYVGGPTETHV
VRSPHPYQLPQALAPHVDVFGGLHRFPPTSSLRQRPPEPQVTGTVGLHLGVTSPVIRKRYNLTSQDVGSGTSSNNSQ
ACAQFLEQYFHDSDLAQFMRLFGGNFAHQASVARVVGQGGGRGAGIEASLDVQYLMASAGANISTWVYSSPGRHEG
QEPFLQWMLLLSNESALPHVHTVSYGDDDESLSSAYIQRVNTLMKAAARGTLTLLFASGDSGAGCWSVGRHQFR
PTFPASSPYVTVGGTSFQEPFLITNEIVDYISGGGFSNVFPRPSYQEEAVTKFLSSPHLPSSYFNASGRAYP
DVAALSDGYVWVNSRVPIFWVSGTSASTPVFGGILSLINEHRLSGRFPFLGNFLRYQQHGAGLFDVTRGCHES
CLDEEVEGQGCSPGPNWDPVTGWGTPTSQLC

シグナルペプチド：

アミノ酸 1-16

N-グリコシル化部位：

アミノ酸 210-214;222-226;286-290;
313-317;443-447

グリコサミ/グリカン接着部位：

アミノ酸 361-365;408-412;538-542

N-ミリスチル化部位：

アミノ酸 2-8;107-113;195-201;199-205;
217-223;219-225;248-254;270-276;2
84-290;
409-415;410-416;473-479;482-488;5
21-527;
533-539;549-555

【図 19】
【Fig19】

GCAGTATTGAGTTTACTTCCCTCCTCTTTTAGTGGGAAGACAGACCATAATCCCAGTGTGAGTGAAATGATTTGT
TTCAITTTATTACCGTTTGGGCTGGGGTTAGTTCGGACACCTTCACAGTTGAAGACAGGACAGAAAGGATTTGGA
AGACAGAGCAATCTCTTTGGGAGATCTGTGCTTGGGAAGCAGCGGGCTTGTCTGTCTTTGGCTCAITTGACCC
CAGCTTCTCTGTTAAACTGAAAGCCTTACTACTGGCTGTGTGCCCATCAATTCATTGATCCCTTGAGGCTGTGCC
CTTGGGGACCCACCTTGGCAGGGCCTTACCAC**CTAGC**ACTGAGCTCCCTCTTGGCTCTGTCTGGCGCCAGCGCTTC
CCCTCATCTTAGGGCTGTCTCTGGGTGCAGCCTGAGCCTCCTGCGGGTTTCCTGGATCCAGGGGAGGAGAGAG
AT
CCCTGTGTGAGGCTGTAGGGGAGCGAGGAGGGCCACAGAATCCAGATTTCGAGAGCTCGGCTAGACCCAAAGTGAT
GAAGACTTCAAACCCCGGATTGTCCCTACTACAGGGGACCCCAACAGCCCTACAAGAAGTGCTCAGGACTCGG
TACATCTCCAGACAGAGCTGGGCTCCCGTGAGCGGTGTCTGGTGGCTGTCTGACCTCCCGAGCTACACTGTCCACT
TTGGCGCTGGCTGTGAACCTACGGTGGCCATCACTTCCCTCGGTACTCTACTTCACTGGCGACGGGGGGGGC
CGGGCTCCAGCAGGGATGCAGGTGGTGTCTCATGGGGATGAGCGGGCCCGCTGGCTCATGTGACAGACCCCTGGCG
CACCTTCACACACACTTTGGGGCGACTACGACTGGTTCTTCATCATGCAGGATGACACATATGTGACGGCCCCC
CGCTTGGCAGCCCTTGCTGGCCACCTCAGCATCAACCAAGACCTGTACTTAGCGCCGGCAGAGGAGTTTATTGGC
GCAGGGCAGCAGCGCGGTACTGTCTAGGGGGCTTGGCTACCTGTTGTCAAGGAGTCTCTGCTTCGCTCTGGCG
CCACATCTCGGATGGCTGCCAGGAGACATTTCTCAGTGCCCGTCTGACGAGCTGGCTTGGACCGTGCCTCATTTGAC
TCTCTGGGGCTCGGCTGTGTCTCACAGCACAGGGGCGCAGTATCGCTCATTTGAACCTGGCCAAAATAGGGGAC
CTTGAGAGAAGAGGGGAGCTCGGCTTCTGATGCTTCCGCTGCACCCCTGTCTCCGAGAGGTACCTCATGTAC
CGGCTCCACAACCGCTTACGGCTCTGCGATTGTGAGCGGGCTTACAGTGAATAGAACCACTCGAGGCTACAGATC
CGGAACCTGACCTGTCTGACCCCGAAGGGAGGCGAGGGCTGAGCTGGGCCCTTGGCTCCCTGCTCCTTTTACAC
CCACACTCTCCCTTTGAGGTGTCTGGCTGGGCTGAGCTACTTCACAGCAGCAGCACCTTCTCTGTGCGAGATGGGGCT
CCCCATGCGCCTACAGGGGGCTAGCAGGGCGGACGTGGGTGATGCGTTTGAGAGCTCGGCTGGAGACCTCAAT
CGGCGCTATCAGCCCGCGCTGCGCTTCACAGAGCAGCAGCTGTCAACGGCTATCGGGCTTTCGACCCAGCAGCG
GGCATGGATACACCTTGGACCTGCTTGGAAATGTGTACACAGCGTGGGACCGGGCGGGCCCTGGCTTCGACGG
GTGAGCTGTGCGGCCTGAGCGGGGTGGAATTCCTACCTATGCCCTATGTCTCACTGAGGCCACCCGAGTGCAG
TGGTGTGCGCACTCTGCTGGTGAAGCTGTGCGAGCCCGGCTTTCCTCGAGGCGTTTTCGAGCCAAATGTCCTG
GAGCCACGAGAATCATGTGCTACCCCTGTTGCTGGTCTACGGGCCACGAGAAGGTGGCGCTGGAGCTCCAGAC
CCATTCTTGGGGTGAAGGCTGAGCGAGCGGAGTTAGAGCGACGCTACCCCTGGGACGAGGCTGGCTGGCTCGCT
GTGCGAGCAGAGGCGCTTCCCAGGTGCGACTCATGGACGTGGTCTCGAAGAAGCACCTGTGGACACTCTCTCT
TCTCTTCCAGCCGTGTGGACCAAGCTTGGGCGCGAAGCTCTCAACCGCTGTGCTGAATGCCACTCTTGGCTGG
CAGGCTTCTTTCAGTCCATTTCCAGAGATTTCAATCTGCGCTGTACACACAGAGTACACCCCGAGGCGCCCG
GGGCTGGCCCTGACCCCCCTCCCTCTCTGTGTCTGACCCCTCCCGGGGGCTCTTATAGGGGGAGATTTGAC
CGCAGGCTTCTGCGGAGGGCTGTCTTCTACAACGCTGACTACTGGCGCCGAGCCCGCTGCGAGTGAACTG
CGAGCCGAGGAAGAGGAGGAAGCCCTGGAGGGGCTGGAGGTGATGGAATGTTTCTCTCGGTCTTCAGGGCTCCAC
CTCTTTCGGGCTGAGCGCAGGGCTGGTGCAGAACTTCTCCTGCGAGACTGCGAGCCACCGGCTCAGTGAAGAA
CTCTACACCGCTGCGCGCTCAGCAACCTGGAGGGGCTAGGGGGCCGTGCGCAGCTGCTATGGCTCTCTTTGAG
CAGGAGAGGGCAATAGCACT**TAG**CGCCCTGGGGGCCCTAACCTCATTAACCTTCTCTGCTCCCTCAGCCCGC
AGGAAGGGCAAGCGAAGATGGTGACAGATAGAGAATTGTGCTGATTTTTTAAATATGAAAATGTTATTAAAC
ATGTCTTCTGCC

【図 20】
【Fig20】

MRSSLLALLRPAFLILGLSLGCSLSLLRVSWIQEGEDPCVEAVGERGGPQNFDSRRARDQSDDFKPRIVPY
YRDPNKPYKKVLRTRYIQTELGSRRERLLVAVLTSRATLSLAVAVNRTVAHHFPRLLYFTGQRGARAPAGMQVVS
BGDERFAWLMSSETLRHLTHFGADYDNFFIMQDDTYVQAPRLAALAGHLSINQDLYLGRAEEFIGAGEQARYCHG
FGYLLSRSLLLRLPHLDGRCGLILSARPDWLGRCLIDSLGVGCVSQHGGQYRSFELAKNRDPEKEGSSAFL
SAFAVHPVSEGLMYRLHKRFSALELERAYSEIRQLQAQIRNLTVLTPEGEAGLSWVGLPAPPTPHSRFEVLWG
DYFTBQHTFSCADGAPKCPLOGASRADVGDALETALEQLNRRYQRLRFQRQLLNGYRRFDPARGMEYTLDLLL
ECVTQRGHRRLARRVSLRLPLSRVEILPMPYVTEATRVQLVPLLVAEAAAAFAFLEAFANVLEPREHALLTL
LLVYGPREGGRGAPDPFLGVKAAAAELERRYPTRLAWLAVRAEAPSQVRLMDVVSXKHPVDLFLFTVWTRFG
PEVLNRCRMNAISGWQAFPPVHFQEFNPALSPQRSPPGAGPDPSPFGADPSRGAPIGRFDQASABGCFY
NADYLAARARLAGELAGQEERALEGLEVMDFLRFSGHLHFAVEPLGVQKFLSRDCSPRLSEELYHRCRLSNL
EGLGGRAGLAMALFEQEANST

シグナルペプチド：

アミノ酸 1-15

膜貫通ドメイン：

アミノ酸 489-510

N-グリコシル化部位：

アミノ酸 121-125; 342-346

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 319-323; 464-468

チロシンキナーゼリン酸化部位：

アミノ酸 736-743

N-ミリスチル化部位：

アミノ酸 19-25; 23-29; 136-142; 397-403;
441-447; 544-550; 558-564; 651-657; 6
57-663;
672-678

原核生物膜リポタンパク脂質結合部位：

アミノ酸 14-25

細胞接着部位：

アミノ酸 247-250

【図 21】
【Fig21】

CGGGGCCCGGAGTCCGAGACCTGTCCAGGAGCTCCAGCTCAGCTGACCTGTCTACTGCCTCCCGCCGCTCTG
CCCGCGCC**ATG**AGCCAGCGGGTGCCTCGGCTCTCCGTGCGCGCGCGGCTGGCGCTGGGCTCAGCGCGCTGGCG
CGCGCTTCGCCACTGGCTCTTCTTGGGGAGCGGGTGGCCCGCATGGCGAGCGCGGAGAGCAGCTGCTGCTTC
CCCCGAGGACAGCGCGCTCAGCGAGTATTTCTGAGCGCTCTCATGGGGAGCCCGCGGCTCGCAAGCGCTGA
GGCTGCTACCCCTGGAGCAGCGCCCGAGGGGATTTCTATGATGACCTGCGAGCAGCGCCAGCTCTTGGCCAACTGG
CGCGCTCATCCAGGCGAAGAAGCGGCTGGA**CTT**CGGCGCTACCTCCGCGCTACCTCCGCGCTGGCGCTGGCG
CGCTCGCCCGGACGGCGCGTGGTGACCTGCGAGGTGGAGCGCAGCCCGCGAGCTGGGACGGCCCTGTGGA
GGCAGCGCGAGGCGGAGCACAAAGATCGACCTCCGCGCTGAAGCCCGCTTGGAGACCTGGACGAGCTGCTGGCGG
CGGCGAGGCGCGGACCTTCGACCTGGCGCTGGTGGATCGGCGAAGGAGAACTGCTCCGCTACTACGAGCGCT
GCCTTCAGCTGCTGCAACCGGAGGACCTCTCGCGCTCTCAGAGTCTTGGCGCGGGAAGGTGCTGCAACCTC
GAAAGGGGACGTGGCGGCCGAGTGTGTGCGAACT**TAAG**GAAACGCATCCGCGGGACCTCAGGCTCTACATCA
GCCTCTGCCCTGGCGGATGGA**CT**CACTTGGCTTCAAGATCT**TAG**GGCTGGCGCTAGTGAGTGGGCTCGAGG
GAGGGTGTGCTGGGAAGCCCGAGGAATTGACCTGAGTTTAAATTCGAAAATAAAGTGGGCTGGGACACAAAA
AAAAAAAAAAAA

【図 22】
【Fig22】

MTQPVPRLSVPAALALGSAALGAFAATGLFLGRRRCFPWRGRREQCILLPPEDSRLWQYLLSRSMRHPALRSRLRL
TLEQPGQDSMHTCEQALLANLARIQAQKALDLGTPTYGSALALALALPADGRVVTCEVDAGFPFELGRPLWRQA
EAHRIDLRKPALETDLAAGEAGTFDVAVVDADKENCASAYYERCLQLLRPGGILAVLRVLWRGKVLQFPFK
DVAECVRNLNERIRRDVRVYISLLPLDGLTLAFKI

シグナルペプチド：

アミノ酸 1-25

膜貫通ドメイン：

アミノ酸 8-30; 109-130

N-グリコシル化部位：

アミノ酸 190 -194

チロシンキナーゼリン酸化部位：

アミノ酸 238-247

N-ミリスチル化部位：

アミノ酸 22-28; 28-34; 110-116; 205-211;
255-261

アミド化部位：

アミノ酸 31-35; 39-43

【図 23】
【Fig23】

CGGGCCCGCTCGACCGGGCCCTGCGGGCGCGGGGCTGAAGCGGAACACGACGGGCGAGAGACAGGAGCGGG
AAGCCCTTGGGCGCCCTGCGAGGGCT**ATG**GAGCAGCGCGCGCGGGCTGCGCGGCGGTGGCGCGCGGCTCCTC
CTGGTGTCTGTGGGGCCCGCGGCCACGGCGGCACTCGTAGCCCCAGGTGTGACTGTGCCGGTGA**CTT**CCACAAG
AAGATTGGCTCTTTTGTTCAGAGGCTGCCAGCGGGGCACTACCTGAAGGCCCTTGACGGAGCCCTGCGCG
AACTCCACCTTGCTTGTGTGTCCCCAAGACACTTCTTGGCTGGGAGAACCACTAATTTGTAAGTGTGCCCG
TGCCAGGGCTGTGATGAGCAGGGCTTCCAGGTGGCGCTGGAGAACTGTTACAGAGTGGCGGACACCGCGTGTGC
TGTAAGCGAGGTGGTTGTGGAGTGCCAGGTGAGCAATGTGTGACAGCTTCACTTCTACCTGCCAACCAATGC
CTAGACTCGGGGGCCCTGCACCGCCACACACGGCTACTCTGTCTCCCGCAGAGATACTGACTGTGGGACCTGCCTG
CCTGGCTTCTATGAACATGGCGATGGCTGCGTGTCTCGCCACGAGCACCTTGGGGAGCTGTCCAGAGCGCTGT
CGCGCTGTCTGTGGCTGGAGGAGATGTTCTGGGTCCAGTGTCTTGGCTGGCTTGTGCTCCCGCTCTGCTT
GGGGCCACCTCGACCTACACATACCGCCACTGTGGCTCACAAGCCCTCGTTACTGAGATGAAGCTGGGATG
GAGGCTTACGCCACCCACCGGCCACCCATCTGTCACTTGGACAGCGCCACACCTTCTAGACCTCTCTGAC
AGCAGTGAGAAGATCTGCACCGTCCAGTTGTGGGTAAACAGCTGGACCCCTGGCTACCCCGAGACCCAGGAGCGG
CTCTGCGCCGAGGTGACATGGTCTTGGGACAGTTGGCCAGCAGAGCTTGGCGCCGCTGTGCGCCGCTGCTGCTG
TGCCAGAGTCCCGCAGCGGCTCGCAGCCTATGATGCTGAGCGGCGCCCGGAGCTTACGAGCTGATGAGCAGG
GTCCAGCGCGGCTGAGAGAGTGTGTCGCGACGCTGGGGCTGGCGGAGCAGAGATCCAGCCCTGGAGGGTG
GAGATCGCGCTTCCGAGACAGCAGTACGAGATGCTCAAGCGCTGGCGGACAGCAGCCCGCGGCGCTCGGA
GCCCTTACCGCGCCCTGGAGCGATGGGGCTGGACGGCTGCGTGAAGACTTGGCGAGCGCTGACAGCGCGC
CCG
TGACACGGCGCCACTTGCCACCTAGGCGCTCTGGTGGCCCTTGCAAGAAGCCCTAAGTACGTTTACTTATGCGTG
TAGACATTTTATGTCACTTATTAAGCCGTGGCAGCGCCCTGCTAGCAGCAGCAGCGGCCACCCCTGCTGCG
C
CCCTATGCTGCCACCAAGCGGAAGACAGCAACGAATGTCGAGAGGGGGTGAAGACATTTCTCAACTTCTCGG
CCGGAGTTTGGCTGAGATCGCGGTATTAATCTGTGAAAGAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCGAC
CGCGCGCG

【図 2 4】
【Fig24】

MEQRPRGCAVAALLLVLLGARAQGGTRSPRDCAGDPHKKIGLFCCRCGPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQ
DTFLAWENHHHSRCARQACDEQASQVALENCSSAVADTRCGCKPGWFVTCQVSQCVSSSPFYCQPCLDGALHRH
TRLLOSRRDTDCRCLPCFFYEHGDDGCVSCPTSTLGSCEPRCAAVCGWRQMFVWQVLLAGLVVLLGATLTYTYR
HCWPHKPLVTADAEAGMEALTPPPATHLSPDLSAHTLLAPFDSSEKIQCTVGLVGNSTWTPGYFETQRAICPQVTSWSW
DQLPSRALGAAAPTLSPFSPAGSPAMMLQPGQLYVVDMDVAPARRWKEFVRTLGLREABIEAVEVEIGRFRDQQ
YEMLRNRWQQQFAGLGAVYAALERMGLDGCVEDLSRLQRGP

シグナルペプチド： アミノ酸 1-24
膜貫通ドメイン： アミノ酸 199-219
N-グリコシル化部位： アミノ酸 67-71;106-110
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 157-161

チロシンキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 370-377
N-ミリスチル化部位： アミノ酸 44-50;50-56;66-72;116-122;
217-223;355-361;391-397;401-407
原核生物膜リポタンパク脂質結合部位： アミノ酸 177-188

【図 2 5】
【Fig25】

GTCATGCCAGCTGCCTGCTCTGTGCTGCCTCTGGGCCCTGGCAATGGTGACCCGGCCTGCCTCAGCGGCCCCCATG
GGCGGGCCAGAACTGGCACAGCATGAGGAGCTGACCTGCTCTTCATGGGACCTGCAGCTGGCGCAGGCCCTC
AACCGTGTGTACAGGACACAGGAGGAGCGCTGACAAAGGCCAGGAACAGCCTGGGTCTCTATGGCCGCACAATA
GAACCTCTCGGGCAGGAGGTGACGGCGGGCGGGATGACGCCAGGAACCTCGGGCAAGCCTGTGGAGACTCAG
ATGGAGGAGGATATTCTGACAGCTGCAGGCAGAGGCCACAGCTGAGGTGCTGGGGGAGGTGGCCCAAGGCACAGAAG
GTGCTACGGGACAGCTGCAGCGGCTAGAAGTCCAGCTGAGGAGCGCCTGGCTGGGCCCTGCCTACCGAGAGATTT
GAGGTCTTAAAGGCTCACGCTGACAAGCAGAGCCACATCCTATGGGCCCTCACAGGCCACGTGCAGCGGCAGAGG
CGGAGATGGTGACACAGCAGCATCGGCTGCGACAGATCCAGGAGAGACTCCACACAGCGGGCGCTCCACAGCCGGA
ATCTGCCTGGATGGAACTGAGGACCAATCATGCTGCAAGGAAACATTTCCACGCCCGCTGAGGCCCTGTGTCASGG
AGGAGCTGCGTGTCTACTGGGATCAGCCAGGGCGCCGGGCCCACTCTGAGCAGACAGGACAGAGACAGCCAGG
CGGGACAAAGGCAGAGGATCTAGCCCATTTGGGAGCGGCTGGAGGAAGGACATGTACCTTTTCATGCCTACACA
CCCTCATTTAAGCAGAGCTCGTGCATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図 2 9】
【Fig29】

GGAGCGCTGCTGGAACCCGAGCCGGAGCCGGAGGCCACAGCGGGGAGGGTGGCCTGGCGGCTGGAGCCGGACGTG
TCCGGGGCTGCCCCGAGACCGGGGCAGCAGGTGCTCCGGGGGCCACCAATGCTGGTGACTGCCTACCTTGCTTT
TGTAGGCTCTCTGGCTCCTGCCTGGGGCTGGAATGTCAAGATGCCGGGCTAAACCCCTTGAAGGGCCTGCAG
CAATCCCTCCTTCTCGGTTTCAACTGGAATCTTATCAGGTCTACTTCTGGCCCTGGCAGCTGATTGGCTTCA
GGCCCCCTACCTCTATAAACTCTACCAAGCATTACTACTTCTGGAAGGTCAAATGGCCATCTCTATGTCTGTGG
CCTTGCTCTACAGCTCCTCTTTGGCCTAGTGGCTCTCTCCCTTGCGATTGGCTGGGTGCGAAGAATCTGTGTGT
CCTCTCTCCCTGACTTACTCACTATGCTGCTTAACCAAACTCTCTCAAGACTACTTTGTGCTGCTAGTGGGCGG
AGCACTTGTGGGCTGTGCACAGCCCTCTCTCTCAGCCTTCGAGGCTTGCTATATCTCATGAGCAGCTGGAAGC
GCATGACTTCCCTGCTGAGTGGATCCCACTACCTTTGCTCGAGCTGCCTTCTGGAACCATGTGCTGGCTGTAGT
GGCAGGTGTGGCAGCTGAGGCTGTAGCCAGCTGGATAGGCTGGGGCCTGTAGCGCCCTTTGTGGCTGCCATCCC
TCTCTGGCTCTGGCAGGGCCCTTGCCCTTGGAACTGGGGGAGAACTATGACCGGCAGCTGCCTTCTCAAG
GACCTGTGTGGAGGCTGCGGCTGCTCTGTCGAGACCGCGGTGCTGCTGCTGGGCACCATACAAGCTCTATT
TGAGAGTGTCTATTCTATCTTTGTCTCTCTGTCGACACCTGTGCTGGACCCACAGGGGCCCTCTGGGCATTAT
CTTCTCCAGCTTCTATGGCAGCCAGCCTGCTTGCTCTTCCCTGTACCGTATCGCCACCTCCAAGAGGTACCACT
TCAGGCCATGACACTGCTGTCCCTTGCTGTGCTCATCGTCTCTCTCTCTCATGTGACTTTCTCTACCCAG
CCAGGCCAGGAGAGTCCGCTGGAGTCTTATAGCCTTTCTACTATTGAGTTGGCTTTGTGATTATACITTTCC
CAGCATGAGCTTCTACGGAGAAAGGTGATCCCTGAGCAGAGCAGGCTGGTGTACTCAACTGGTTCGGGTACC
TCTGCACTCACTGGCTTGCCTAGGGCTCCTGTCTCCTCATGACAGTGATCGAAAAACAGGCACTCGGAATATGTT
CAGCATTTGCTCTGCTGTCTATGGTGATGGCTCTGCTGGCAGTGGTGGGACTCTTCAACCGTGTGAAGCATGATGC
TGAGCTGGGGTACCTTCACTTACTGAGGAGCCCTATGCCCTGAGCTGGAACCCACTCCAGGACAAAGATAGCT
GGGACAGACTCTTGAATTCAGCTATCCGGGATTTACAGATCTCTGTGACTGCACTTGTGACTGTCCCTGTGG
TTTCTCTCGCAATCTTTGTGTTTGGGAGACATGATGGGGGTGATGCACTGGAAGAAAGGTGCCAAAAGTTCC
CTCTGTGTTACTCCATTATGAAAAATAACACTTTTAAATGATCAAAAAAAAAAAAA

【図 2 6】
【Fig26】

MPVPALCLLWALAMVTRPASAAPFMGGPELAQHEELTLFPHGTQLGQALNGVYRTTEGRLLTKARNSLGLYGRTE
LLGQEVSRGRDAAQELRASLLETQMEEDILQLQAEATAEVLGEVAQAQKVLRDVSQRLEVLQRLSAGLGPAYREFE
VLKAHADKQSHILWALTGHVQRQRREMVQAQHRRLRQIERLHTAALPA

シグナルペプチド： アミノ酸 1-21
N-ミリスチル化部位： アミノ酸 46-52;51-57;78-84

【図 2 7】
【Fig27】

GCGAGGACCGGGTATAAGAAACCTCGTGGCCTTGCCCCGGGCAGCCGAGGTTCCCCGCGGCCCGAGCCCCCGC
GCC
ATGAAGCTCGCCGCCCTCCTGGGGCTCTGCTGGCCCTGTGCTGCAGCTCCGCTGCTGCTTTCTTAGTGGGCTCG
GCCAAGCTGTGGCCAGCCTGTGCTGCTGGCTGGAGCTCGCGCGCGAGGCCGGGGCCGGGACCTGGCCAAACCCC
CTCGGCACCCCTCAACCCGCTGAAGCTCTGCTGAGCAGCTGGGCATCCCGTGAACCACTCATAGAGGGCTCC
CAGAAGTGTGTGCTGAGCTGGTGGTCCCCAGGCCGTGGGGCCGTGAAGGCCCTGAAGGCCCTGCTGGGGCCCTG
ACAGTGTTTGGGTTAGCCGAGACTGGAGCATCTACACTGAGGACAAGACGCTGCCCAACCCGAGGGGCTGAAAA
CCCCCGCGCGGGGAGGACCGTCCATCCCTTCCCCCGCCCTCTCAATAAACCTGGTTAAGAGCAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図 2 8】
【Fig28】

MKLAALLGLCVLSCSSAAAFVLSAKPVAQPVAALESAAEAGAGTIANPLGTINPLKLLSSLGIPVNHLIEGS
QKCVAEILGPQAVGAVKALKALLGALTVFG

シグナルペプチド： アミノ酸 1-18
N-ミリスチル化部位： アミノ酸 8-14;65-71;74-80;88-94
原核生物膜リポタンパク脂質結合部位： アミノ酸 5-16

【図 3 0】
【Fig30】

MLVTAFLAVGLLASCLGLELSRCRAKPPGRACSNFSFLRFLQDFYQVYFLAALDWLQAPYLYKLYQHYYFLG
QIAILYVCLASTVLFLGLVASSLVLDWLRKNSCVLFLSLTYSLCCLTKLSQDYFVLLVGRALGGLSTALLFSAFE
WYIHEHVERHDFPAEWIPATFARAAFWNHVLAVVAGVAAEAVASWIGLGPVAFVAAIPLLALAGALALRNWGEN
YDRQRAFSRCTCAGGLRCLLSDRRVLLGLTIQALFESVIFVFWLWTPVLPDHPGAPLGIIFSSFMAASLLGSSLYR
IATSKRYHLQPMHLLSLAVLIVVFLFMLTFTSTPGQESPVSFIEAPLLIELACGLYFSPMSFLRRKVIPTTEQA
GVLNWFVRLPHLSLACLGLLVLDHSDRKTGTRNMFSCSAVMHMAALLAVVGLFTVVRHDAELRVSPTEEPYAPEL

シグナルペプチド： アミノ酸 1-18
膜貫通ドメイン： アミノ酸 41-55;75-94;127-143;191-213;
249-270;278-299;314-330;343-359;379-394
410-430
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 104-108
N-ミリスチル化部位： アミノ酸 11-17;18-24;84-90;92-98;
137-143;138-144;238-244;253-259;2
78-284;
282-288
アミド化部位： アミノ酸 102-106
原核生物膜リポタンパク脂質結合部位： アミノ酸 6-17

【図 3 6】
【Fig36】

MGSWALLWPFLFTGLLVRPFGTMAQAQYQSVNKKDIFEVEENTNVTEPLVDIHVPEGQEVTLGALSTPFAFRIQG
NQLFLNVTPDYEEKSLLEAQLLCQSGGTLVTQLRVFVSVLVDVNDNAPEFPFKTEIRVEEDTKVNSTVIPETQLQ
AEDRDKDDILFYTLQEMTAGASDYFSLVSVNRPALRLDRPLDYERPNMTFWLLVRDTPGENVEFSHTATATLVL
NVVPADLRPPWFLPCTFSDGYVCIAQYHGAVPTGHILPSPLVLRPGPIYAECDGRGINQPIIYSIFRGNVNGTF
IIHPDSGNLTVARSVFSPMTFLLLVKGQADLARISVTQVTEAVAAGSPFRFPQSLYRGTVARGAGAGVVVD
AAAPSQPLRIQAQDFEFSDLNSAITYRITNHSFRMEJGVEVLTVTTLAQAGAFVAEVANTVTSCATTVYIEIQ
VSEQEPSTEAAGTGTGFWTSTPSEVRBPPEPSQGPSTTSSGGGTGPHPPSGTTLRPPTSSTPGGPPGAENSTSHQ
PATFGGDTAQTPKPTGSOPIPPPGVGTSTSHQPATPSGGTAQTPEPTGTSQPMPPSMGTSTSHQPATPGGTAQTPE
AGTSPMPMPMGMTSTSHQPTTPGGTAQTPEPTGTSQPMPLSKSTPSSGGGSPSEDKRFSVVDMAALGGVLAGLLLL
ALLGLAVLVHKKYGPRLKCCSGKAPEPQPGQFNDQAFLPDHNKANWAPVPSPTHDPKPAEAPMPAEPAPPGPASP
GAPEPFAAARAGGSTPAVRSILTKERRPEGGYKAVWFGEDTGTEDVVLVNAPTLDVDGASDSGSGDEGEAGRG
GGPYDAPGGDSYI

シグナルペプチド：	アミノ酸	1-25
膜貫通ドメイン：	アミノ酸	663-686
N-グリコシル化部位：	アミノ酸	44-48; 140-144; 198-202; 297-301; 308-312; 405-409; 520-524
グリコサミノグリカン接着部位：	アミノ酸	490-494; 647-651; 813-817
cAMP- 及び cGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位：	アミノ酸	655-659
チロシンキナーゼリン酸化部位：	アミノ酸	154-163; 776-783
N-ミリスチル化部位：	アミノ酸	57-63; 102-108; 255-261; 294-300; 366-372; 426-432; 441-447; 5 13-519; 517-523; 530-536; 548-554; 550-556; 5 81-587; 592-598; 610-616; 612-618; 623-629; 6 48-654; 666-672; 667-673; 762-768; 763-769; 7 80-786; 809-815; 821-827; 833-839
カドヘリン細胞外繊維返しドメインシグネチャー：	アミノ酸	112-123

【図 3 7】
【Fig37】

CTCTGCACTAGGCTCTCAGCCAGGGATGATGCGCTGCTGCCGCCGCCGCTGCTGCTGCCGCCAACCCCCATG
CCGTAGGCCCGTGTGCTGTGCTGCCCTCTGCTTTTACCTCCCTGGCAGCAGCTCAGCGGGCCAAACCGAT
TGACACCATATATACAGGGGCTTCCGCCAGTGCTCTCATCCGTCTGGGGACAGCATGGGCCCGGAGGCGAGCTGG
AGACCATCTCAGGCTTTGGAATGACTTCCATGCTGTGCTCTCAGGTCTCTCAGGCTGTCCGAGGAGGCGAG
CTGCAGTGTGGGAATCACTACAGCAAGAAGCTCGCCAGGCCCCCGTCCGAATAACTTGACACACTCTGTGCGGTG
CC
CCGGTGCAATGTTCCGGGAGCGCGGCACAGGCTCCGAACCAACAGGAGACGCTGCGGGCTACAGCGCCTGCACCTC
CCCATGGGCCCTGGCCCCCACTGCTGGCGGCTGCTTGGCTCTTGCCCTACCTTCCTGAGGCCCTTGGCCCTAGCTT
GTGGGTTGGGTAGCAGCGCCGTACCTCCAGCCCTGCTCTGCGGCTGGTGTGTCAGGCTCTGCAGAGCGCAGCA
GGGCTTTTCATTAAAGGATTTTATATTTGTA

【図 3 8】
【Fig38】

シグナルペプチド：	アミノ酸	1-35
膜貫通ドメイン：	アミノ酸	141-157
N-ミリスチル化部位：	アミノ酸	127-133
原核生物膜リポタンパク脂質結合部位：	アミノ酸	77-88

【図 3 9】
【Fig39】

CAGCGCTGACTGCGCCGCGGAGAAAGCCAGTGGGAACCCAGACCCATAGGAGACCCGCGTCCCGCTCGGCGCTGG
CAGGCCCGCGCTATGAGATTTCCTCTGGGCCCTCTCTTTGGGTCTGTGCTGCAGTCTGGCCGCTGCTGATCGCC
ACACCGCTCTCTGGAAACAGTTCAAATCCCAAGTTCGGGAATGAGGAGCTACACCATACATGTGCAGCTGAATGACT
ACGTGGACATCATCTGTCCCGCACTATGAAGATCACTCTGTGGCAGACGCTGCCATGGAGCAGTACATACCTGTACC
TGGTGGAGCATGAGGATACCACTGTGCCAGCCCCAGTCCAAAGGACAAGTCCGCTGGCAGTGCACACCGGCCCA
GTGCCAAGCATGGCCCGGAGGAAGCTGTCTGAGAAGTTCCAGCGCTTACACCTTTACACCTGGGCAAGGAGTTC
AAGAAGGACACAGCTACTACTACATCTCAAACCCATCCACAGCATGAAGACCGCTGCTTGAGGTTGAAGGTGA
CTGTCACTGGCAAAATCACTACAGTCTCAGGCCCATGACAATCCACAGGAGAAGAGACTTGACAGCAGATGACC
CAGAGGTGCGGGTTCTACATAGCATCGGTACAGTGTGCCACCGCTCTTCCCACTTGCTTGGACTGTGCTGC
TCCTTCCACTTCTGCTGCTGCAAAACCCGCTGAAGTGTGTGCCACACCTGGCCTTAAAGAGGGAAGCGCTGAAGA
GAGGACAGGCACTCAAACCTGTCTTGGGCCACTTTCAGAGCCCCAGCCCTGGGAACCACTCCCAACACAGG
CATAAGCATACCACTAGCAGCCTCAAACGGGTCAATATTAAGGTTTTCACCGGAAGGAGGCCAACAGCCCGGA
CAGTGCCATCCCCACCTTCACTCGGAGGGATGGAGAAAGAGTGGAGACAGTCTTTCACCACCATTCCTGCTT
TAAGCCAAAGAAACAGCTGTGCAGGCATGGTCCCTTAAGGCACAGTGGGAGCTGAGCTGGAAGGGCCACGCTGG
ATGGGCAAAAGCTGTGCAAGAGTGCCTTTCAGGAGAGAGCCAGGATGCCAGATGAAGTGTGAGGAGAAAGC
AAGAAACAGTTCTTCTGCTGGAAGCCAGCTACAGGAGAGGACAGTCTGTGGGTGAGCCAGCATCTCCAGCA
GACCTCATCTGTGGAGCTGCCACAGAGAAGTTGTAGCCAGGTACTGCATCTCTCCCACTCTCGGGGACAGCTC
CCAGAGCTGTGCCAGCAGGGGGGCTGTGCCAACCTGTCTTATAGAGTGTAGTCTAAGGCGAGTGGCCATGTGTA
CAITCTGCCTAGAGTGTAGCTAAAGGGCAGGCCCCAGCTGTATAGTATCTGTATATAAGTTGCTGTGTGCTGT
CTGTATTTCTACAACCTGGAGTTTTTTTATACAATGTCTTCTGTCTCAAAATAAGCAATGTGTTTTTCGG

【図 4 1】
【Fig41】

AGCAAAATGGTGTGGCCGAAGCTGCCTCTCTGGTGGCATAGCTAAGACCAAGCTGCACGCGAGTAAAAACACAGTTT
GTTTTCATGACACAACAGGCAGAATGTGTACAGGATGTGACGTGGGGAACCAAGGAAGAGGACAGCTTGAGGAT
CATTTATTAAGGGACTCCATCCCAAGAGGTTTCCAGCCAGAGGCAAGCTGTAGCCAGAAAGAAAGATGAGAGAT
CACTCGAATAATAGAACAGAACTGCTGAAATATTGAACACAGATCTAGATCAAATGAAGGAACATATTCAGGAT
GAAGCATAAATAAGGCCAGGCGGTGGTGGCTCATGCTTGGAAATCTCAGCTCTTTGGGAGGCCGAGGCTATTCTCC
ATCTCTCTGGGCTCCAGTGTCTCTCACGCTCGGCCACCCAAAGTGTGGGATTATAGAAGTGAACCACTGCGCTCC
GGCTATTGAAGGTTTTTAATCTTCAGAGTTTCGACTTTATCAACAACACTTAGAAGCCACCAAGAAATGCGAGA
TGATCTCTTAATAGAATACAGAAAGATGGCACTCACTGCATTTATAGAATTTTGAGACTCCATGAAATGCGAGTT
TTCAGACACAACACTCTGGAGAGTCAAGATACAAAATTAATCACTGATTCATGTAGGAGAAATTAACAGGCCCTTC
AAGGAGCTGTGCAAAAGGAATTAACAATATCTGTTGGATCAGACACATCAGAGCAGAGAAAGCGATGGTGATG
GCTCATGTTAGTGTGCTGCCCAAGGAGGAGCAAGCTTGAGAGCTACCCCTTTTGCTCATCTCACTATTAATGCCACCG
ACATCCCATCTGCTTCCATAAAGTAGTCTGTCTCTTGGTACCATGATCGGGTGGGCCAAGATCTCCAAACA
TGACTTTTACGAATGGAAACTAATAGTTAATCAGGATGGCTTTTATACCTGTATGCCAACATTTGCTTTCGAC
ATCATGAAACTTCAGGAGACCTAGCTACAGAGTATCTTCAACTAATGGTGTACGTCACTAAACACAGCATCAAAA
TCCCAAGTCTCATACCTGTATGAAAGGAGGAAGCACCAAGTATTGGTCAGGGAATCTGAAATTCATTTTATT
CCGATAACGTTGGTGATTTTTTAAGTTACGGTCTGGAGAGGAAATCAGCATCAGGTTCTCAACCCCTCCTTAC
TGGATCCGATCAGGATGCAACATACTTTGGGGCTTTTAAAGTTTCAGATATAGATTCAGGCCCCAGTTTTTGGAG
TGTTATGTATTTCTGGATGTTTGGAAACATTTTAAACAAAGCCAAAGAAAGTGTATATAGGTGTGTGAGACT
ACTAAGAGGATGCGCCCAACGCTACACGACTCAGTATCCATGCTCTTGACCTTGAGAGAACACGCTATTAC
AGCCAGTGGGAGATGTTAGACTCATGTGTGTACACAATGGTTTTTAAATTTGTATGAAATTCCTAGAAATTA
ACCAGATTGGAGCAATTACGGGTTGACCTTATGAGAACTGCATGTGGGCTATGGGAGGGGTGTGTCCTCGGTCA
TGTGCCCTTCGACGTGAAGTGGAGAGGGTGTCACTTAGCGCAATTGAAGGATCATCTGAAGGGGCAAAATCTTT
TTGAATTTGTACATCATGCTGGAACCTGCAAAAATACTTTTTCTAATGAGGAGAGAAAAATATATGATTTTTAT
ATATATCTAAAGTTATATTTTCAGATGTAATGTTTTCTTGGCAAGTATCTAAATATATATCTGCTCATGATAT
TTGATTCAAAATTTTAAATATGCTTGTGCTGAGCATATTAATGTTTTAAATGTACAGCATATTTAACGGT
GCATTTTGTAAATTCCTGGGGAACACTTGACAGTCAAGGAGGGAATAAATAATGTGTTTCTCAATATCAATGCA
GTATATTTCTTCTGTTCTTTTAAAGTATAAGATTTTTTCAGACTGTCAAGCCTGTGCAAAAATTTAAATGGAT
GCCTTGAATAAAGCAGGATGTGGCCACAGTGCTCTCAAAATTAGAAACTATTAATGACTTTAGAAGCTGA
CATTTGCCAAAAAGGATACATAATGGGCCACTGAAATCTGTCAAGATAGTTATATAATTTGTGAACAGGTGTTTT
TCCACAAGTGGCGCAAAATGTACCTTTTTTTTTTTTCAAAATAGAAAAGTATTAGTGGTTTATCAGCAAAAA
GTCCAAATTTAATTTAGTAAATGTTATTTTATCTGTACAAATAAAACATTCGCTTTGAATGTTATTTTTTGGT
ACAAAAATAAATTTATATGNAACCTGGAAAAAAGGAAAAAAGGAAAAAAGGAAAAAAGGAAAAAAGGAAAAA

【図 4 0】
【Fig40】

MEFLWAPLLGLCCSLAAADRHTVFNSSNPFRNEDYTHVQLNDYVDIICPHYEDHSADAAMEQYILYLVEHEE
YQLCQPPQSKDQVRWQCNRPASAKHGPEKLEKQRPFTPTPLGKEFKEGHSYIISKPIHQHEDCLRLKVTVSGKI
THSPQAHNDNPQEKRLAADDPEVRVLHSIGHSAPRLPFLAWTVLLPLLLQTP

シグナル配列：	アミノ酸	1-17
N-グリコシル化部位：	アミノ酸	26-30
チロシンキナーゼリン酸化部位：	アミノ酸	118-127
N-ミリスチル化部位：	アミノ酸	10-16

【図 4 2】
【Fig42】

MDPNRISGEDTHCIYRILRLHENADFQDTTLESQDTKILPDSCRRIKQAFQGVAKQLQHVSGQHIREAKAMVD
GSLWDLAKRSKLEAQFPAHLTINATDIPSGSHKVSLSWSWHDGWAKISNMTFSGNKLVLNQDGFYYLIYANICFR
HHETSGDLATEYVLQLMVYVTKTSIKRPSSTLMKGGSTKRWGSGEFHFSYINVGGFPLKSGEISIEVSNP
LSDPDQATYFAGFVRDID

N-グリコシル化部位：	アミノ酸	98-102; 125-129
-------------	------	-----------------

【図 4 3】
【Fig43】

ACCAGAACGACATAACAAGGGCAGGCTGACTGCAAGGCTGGGACTGGGAGGCAGAGCGCCGCCAAGGGGGCT
CGGTTAAACACTGGTGGTTCATCACTCCAAGACGAAGGCAAGGAAAGCTGTTGGCCCTGGGTACAAGCAATTC
CTCGTCAGCAACATGCTCTAGCAGAACGCTATGGATCTGGAGGCTGTTCTGGGACAAAGCCACCTGTACCGG
GAGGACCAAGACCTCCCCGCGCGGCTCCGCTGCTCAACTGGCTGGACGCGCAGAGCGGGCTGGCTCGGCC
CCC
GTGTCGGGGGGCGGCAATCAAGTTACTGCGCAAAACCGGACGAGGACCGCGCGGGCCCTGGTGTACTGTCACT
GCGAGGCGCGGCTCCCTGAGAAACGGCCTTGGGAGGACCTGCGCTGTCCAGAGACCACCTCCACGGCCCTGCCA
GCCCTTACGACAGAAATCCAGGAAGCGCTGTAAGGGCCAGGTGCGAGATGAGGTGCGAGGTGTTGCTCCTGCCAAC
GCCCTGCCCGCTCGGAGTGAGGCGGCGAGGTGTGCGAGCAGTGATTGGGATCAGCGAGCGGTGCGGATGAATCC
AAGGAGAAAAAGGACCTGGGAACCTCTGGGCTACGTGCTGGGCTTACCATGATGGTGATCATTCATGCCATCGGA
GCTGGCATCATCTTGGGCTACTCCTACAAGAGGGGGAGGATTGAAAGAACAGCATGATCAGAAAGATGTGAG
AGGGAGATGACGGAATCACTCTGCCCTTGTCTGCTTCAACCAACCCACCTGTGAGATTGTGGAATGAGAAGACT
GTCTGTGCTCCACACGACAGACTCCAGTTGACCTCAGGAGGGCACCACCCCTTTATGGGCCAGGCGGGGACT
CCTGGGGCGTGAAGCCCCCAGTGGGAGGAGCCCATGACAGACACTGGTGAGGACAGGCCACCCCTCTACAGCT
AGGAGGAATACCACTTTGTGTTCTGGTTAAACCCCTACCACCTCC

【図 4 4】
【Fig44】

MLLAWVQAFVLSNMLLAEAYGSGGCFWDNGLYREDQTSAPGLRLCLNWLDAQSGLASAPVSGAGNSHYCRNPDE
DPRGFWCVSYSGEAGVPEKRPEDLRCPETTSQALPAFTTEIQEASEGPGADEVQVFAPANALPARSEAAAPQVI
GISQRVRRMSKEKKDLGTLGYVLGITMMVIIAIGAGIILGYSYKRGKDLKEQHDQKVCEREMQRIITLPLSAFTN
PTCEIVDEKTVVHTSQTPVDPQEGTTLPMQAQTPGA

シグナル配列：	アミノ酸 1-21
膜貫通ドメイン：	アミノ酸 171-189
N-グリコシル化部位：	アミノ酸 66-70
グリコサミノグリカン接着部位：	アミノ酸 62-66
N-ミリスチル化部位：	アミノ酸 21-27;187-193
クリングドメインシグネチャー：	アミノ酸 69-75

【図 4 6】
【Fig46】

MYAGTRCLLALLLPQVLGGGAAGLVPELGRKFAAAASSGRPSQPSDEVLSFEFLRLLSMFLKQRPTSPSRDAV
PYMYLDLYRRHSQPGSPAPDRLRLERAASRANTVRSFHHESELELPETSGKTRRRFFNLSSIPTEEFITSAEL
QVFRQMQDALGNSSFHRRINIYEIIPKATANSKFPVTSLLDTRLVNQNASRWESFDVTPAVMRWTAQGHANHG
FVVEVAHLEEKQGVSKRHVRISRLHQDEHSWSQIRPLLVTFGHDGKHPLHKREKRQAKHKQRKRLKSSCKRHP
LYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECFFPLADHLNSTHNAIVQTLVNSVNSKIPKACCVPTLEISMSLYLD
ENKVVLLKNQDMVVEGCGCR

シグナル配列：	アミノ酸 1-19
N-グリコシル化部位：	アミノ酸 135-139;163-167;164-168; 200-204;338-342
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 84-88
N-ミリスチル化部位：	アミノ酸 19-25;162-168
アミド化部位：	アミノ酸 28-32
TGF-ベータファミリーシグネチャー：	アミノ酸 314-330

【図 4 7】
【Fig47】

AGTCCTGCCAGCTCTTGGATCAGTCTGCTGGCCAGGAGCCCGGTGGAGCCAGGGGTGACCTTGGAGCCAGCC
TGCCCCGAGGAGGCCCGGCTCAGAGCCATGCCAGGTGTCTGTGATAGGGCCCTGACTTCCTCTCCCGCTCTGA
AGACCAGGTGCTGAGGCTGCTTGGGCACTCAGTGGCTCTGAAGTGCACGGCTTGGGTAGTCTCTGGGCCCCA
CTGCTCCCTGCGCTTCAGTCCAGTGGCTGAAAGACGGGCTTCCATTGGGAAATTGGGGGCCACTACAGCTTCCACGA
GTACTCTCTGGGTCAAGGCCAACCTGTCAAGAGTGTCTTGTCCAAGTGTCTCGGGGTCAACGTGACCAAGCATGA
AGTCTATGGGGCTTCACTGTCTCATCCAGAACAATCAGCTTCTCTCTTCTCAGTCTTCAAGAGCTTGGCCCTAC
AA
GCCAGTGGGTGCGGTGCTGGGCTCCCTCTGCTGCTGCTGGCCCTGCTGCTGGCCGCGCTGCTCTATGTCAAGT
CGGCTCTCAAGCTGTGCTCTGTTACAGGACCGCTATGGGAGGTGGAGATAAACGACGGGAAGCTCTACGACG
CCTACGCTCTCTACAGCGACTGCCCCGAGGACCGCAAGTCTGTAACCTTATCCTAAAGCCGCGACTGGAGCGCG
GTGCGGGCTTACAGCTCTCTCTGGAGCAGCGCGACTTCTGCGCGCGCTGAGCCCTCCGCGCAGCTCTTGGTGA
ACCTGAGCGCTGCGACGCTCATCTGTTGCTTCTCGGACGCTTCTGAGCGCGCTGCTGAGCGCCACAGCT
TCCGGGAGGGCTGTGTCGGCTGTGAGGCTCACCCGACAGACCATCTTCTATCACTCTGAGGGCCAGAGGGCGG
ACCCGCGCACCCGCGGCTCCGCTGTGCGCCAGCACCGCGACCTGGTGACCTTGTGCTCTGAGGGCCCGGCT
CCGTGACTCTCTCTCGATTTTGGAAAGAAGTGCAGCTGGCGCTGCCCGGAAGGTGCGGTACAGGCCGGTGG
AAGGAGACCCCAAGACGCTGACAGGACGACAAGGACCCATGTGTGATTTCTGAGGCGGAGTCCCTGAGGGCG
GGGCGCTTGACTCAGAGGTGACCCGACCTTGAGGGCGACCTGGGTATGCCCGCCAGCCCTCCCACTCCCAAGCTG
GAGAAGCTCAGCACAGGGCGGAGTGGGGCAGGACAGGGGCAAGGGCTGAGGGGGCTCTAGGTTGTTGAGGACT
CTTCCCGGACCGGAGGCCCTTGACGCGCTCTGCGCTGGAGGTGCTCGGCTCTGGTCTGCGCTGGGAATCTCC
GGGCTCTACAGGGCATCACAGAGGGGCTGAGCAGGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCT
GGGCTCTCAGGGCTCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCT
CACACCAAGTGGGCTCTGGGAGAGAGCGGAGCAGCGAAGTGGAGCTCTCGGATCTCGGCTCGCGAACTAC
AG
TGCCCGCACAGACTTCTACTGCTGGTGTCCAAGGAGGATGATGTAGCTCCCAACCCAGAGTGCAGGATCA

【図 4 5】
【Fig45】

GTCTCTTGAACAGAGTTTTTTCATGTGGAGCTCTTTCATGGAGCTGTCCCCGCTGCTCTTGAAGCGGACTGC
GGTCTCTTAAAGGTCGACCAAGTGGTGGCGGGGACCCGCTGTCTTACGCTTGTCTGTCTCCAGGCTCTCTGGG
CGGCGGGCTGGCTGCTTCCGAGCTGGGCGGCGAGAACTTCCGCGCGGCTGCTGCGGCGCCCTCATCCCA
GCCCTCTGACGAGGTCTGAGCCAGTTCGAGTTGCGGCTGCTCAGCATGTTCCGGCTGAAACAGAGACCCACCC
CAGCAGGACCGCTGGTGGCCCCCTACATCTGAGACCTGTATCGCAGGCACTCGGCTCAGCGGGCTCACCCG
CCAGACCCAGCGGTGGAGAGGCGAGCGCGAGCCAACTGTGCGCAGCTTCCACCATGAAGAATCTTTGGA
AGAACTACCAGAAACGAGTGGGAAACCAACCCGAGATTCTTCTTAAATTTAAGTCTATCCCCACGGAGGAGTT
TATCACTCTCAGCAGAGCTTCAGGTTTTCCGAGAACAGATGCAAGATGCTTTAGGAAACAAATAGCAGTTTCCATCA
CCGAATTAATATTTATGAAATCATAAACCTGCAACAGCCAACTCGAAATTCGCCGTGACCATCTTTTGGACAC
CAGGTTGGTGAATCAGAATGCAAGCAGGTGGGAAAGTTTGTAGTCAACCCCGCTGTGATCGGCTGGAGTGCACA
GGGACACGCCAACCATGGATTTCGTGGTGAAGTGGCCACTTGGAGGAGAAACAAAGTGTCTCAAGAGACATGT
TAGGATAAGAGGCTTTTGCACCAAGATGAACACAGCTGGTCACAGATAAGGCCAATGTGATGTAATCTTTGGCCA
TGATGGAAAAGGGGATCCTCTCCACAAAAGAGAAAAACGTCAGGCCAACACAAACAGCGGAAACGCTTAAGTC
CACTGTGAAGAGACCCCTTTGTACGTGGACTTCAGTGACGTGGGTGGGAATGACTGGATTGGGCTCCCCCGG
GTATCAGCCCTTTTACTGCCACGGAGAAATGCCCTTTTCTCTGGGTGATCATCTGAATCCCAATATATGTCAT
TGTTACAGCTTGTGCTCACTCTGTAACTTAAGATTCTTAAGGATGCTGTGTGCCGACAGAACTCAGTGCTAT
CTC
GATGCTGTACCTTGACGAGAAATGAAAAGGTTGTATTAAAGAACTATCAGGACATGTTGTGGAGGTTGTGGGTG
TCGCTAGTACAGCAAAATTAATACATAAATATATATATATATATATCTAGAAAAAGAAAAAACAACAA
ACAAAAAACCACCCAGTGCACCTTAATATTTCCCAATGAAGACTTTATTTATGGAATGGAATGGAAGAAA
AAACAGCTATTTTGAATAATATTTATATCTACGAAAAGAGTTGGGAAAAAATAATTTTAACTCAGAGAAATTA
TTCTTTAAAGATTAAAAATGTATTAGTTGTACATTTTATATGGGTTCAACCCAGCACATGAAGTATAATGGTC
AGA
TTTATTTTGTATTTATTACTATTATAACCACCTTTTATAGAAAAAATAGCTAATTTGTATTTATATGTAATCAA
AAGAAGTATCGGTTTGTACATAATTTCCAAAAATGTAGTTGTTTTCAGTTGTGTGATTAAAGTGAAGAAAGT
CTACATGGAAGGTTACTCTGGCAAGTGCTTAGCACGTTTGCTTTTTTGCAGTGCTACTGTTGAGTTCACAAGTT
CAAGTCCAGAAAAAAGTGGATAATCCACTCTGCTGACTTTTCAAGATTAATATATATTCAATTTCTCAGGAAT
GCTCAGAGTGAATTTGCCAATCCATGAGAAATTTACATCTTTATAGGTGGAATATTTGGATAAGAACAGACAT
GCTGATCTATTATAGAACTCTCTCTGCTGCTTTATGATGAGAAAGATAAAGCAGGATCCATAGAAATATTT
AGGAAAACGATGACCTGCAGGAAAGTGAATGATGGTTGTGTTCTTTCTTCTTAATTTAGTGATCCCTTCAAA
GGGCTGATCTGGCCAAAGTATTCAAATAAACGTAAGATTTCCTCAAT

【図 4 8】
【Fig48】

HPGVCDRAPDVLSPESDQVLRPALGSSVALNCTANWVSGPHCSLPSVQWLKDGLPLGIGHYSLHEYSWVKANLS
EVLVSVLGVNVTSEVYGAFPTCSIQHSFSSPTLQKAGPTSHVAVALASLVLIALALLLVKRLNVLNLY
QDAYGEVEINDKLYDAYVYSVSDCPEDRKFNPIKPLQERRRGYKFLDRLDLPRAPESADLLVNLSCRRLI
VVLSDAFI.SRAMCSHSFREGLCRLLELTRPIPTFEGQRDRPAHPLRLRLRHRHLVLTLLWRPGSVTPSSDFW
KEVQLALPRVRYRVEGDPQTGLQDDKDPMLILLRGVPEGRALDSEVDPDPGDLGMPAQPHSPTGEAQHRAEW
GQAQGTGGGALGVLEDSSRHREPLHLGCPGGARPSVCLGTSWASQAITAGGEGQPLAVLGLQGCGGWPPQASRSP
HPRCPGACFWRAISSTAHQWGLAGREPEQRSGRLGSRLAKLQCPHRLLLPGVQG

膜貫通ドメイン：	アミノ酸 120-140
N-グリコシル化部位：	アミノ酸 31-35;73-77;86-90;102-106; 217-221
N-ミリスチル化部位：	アミノ酸 25-31;53-59;59-65;84-90; 94-100;376-382;380-386;384-390;388-394; 401-407;406-412;414-420;425-431;4 29-435; 435-441;437-443;485-491
原核生物膜リポタンパク脂質結合部位：	アミノ酸 430-441
ロイシンジッパーパターン：	アミノ酸 123-145

【図 49】
[Fig49]

CTGGGCCAGCTCCCCGAGAGGTGGTCGGATCCTCTGGGGCTGCTCGGTGCGATGCGCTGTGCCACTGACGTCCAGG
CA**TGA**GGTGGTTCCTGCGCTGGAGCGCTGGCAGCAGTGCACGACGACGCGCCAGCAGCTTCTGGCCACGCGCCT
CTTCCAGCCCTTAGACCATGGACTTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCTCACGCCCCCAATTTGCGAA
GTGGCCAGTGGATGGCCCGCATCCCCACCCGCTGCCCGCTGGGGGTGAGCCTCATCACAGATGGCTGTGAGTG
CTGAAGATGTGGCGTCAGCAGCTTGGGACAACTGCACGGAGGCTGCCATCTGTGACCCCCACCGGGGCGCTCTA
C
TGTGACTACACGGGGGACCGCCGAGGTACGCCAATAGGAGTGTGTGCACAGTGCGTGGGTGGGGCTGCGTCTGTG
GATGGGCTGCGCTACACAAAGCGCCAGTCCCTTCAGGCTAACTGCAAGTACAACTGCACCTGCATCGACGCGCGG
GTGGGCTGCACACCAGCTGTGCTCCGAGTGCGCCCGCCGCTCTCTGGTGCCCCACCCGCGCGCGGTGACATA
CTGGCCGCACTGCTGTGAGCAGTGGGTATGTGAGGACGACGCCAAGGAGCCACGCAAGCCGCAACCCGCTGCACAC
GAGCCTTCCGATGCTGTGGGTGGGTGGGACATGGCACAGGAACCTGCATAGCCTACACAAAGCCCTGGAGCCCT
TGCTCCACGAGCTGGCGGCTGGGGGTCTCCACATCGGATCTCCAATGTTAAGGCCAGTGTGGCTGAGCAAGAG
AGCGCCTCTGCAACTTGGCGGCATGCGATGTGGACATCCATACACTCATTAAGGCAGGGAAGAAGTGTCTGGCT
GTGTACCAGCCAGAGGCATCCATGAACCTTCACACTTGGCGGCTGCATCAGCACACGCTCCTATCAACCCAGTAC
TGTGGAGTTTGATGGACAAATAGGTGCTGCATCCCCACAAGCTAAGACTATCGAGCTGTCTTCCAGTGTCTCT
GATGGGCTTGGCTTCTCCGCGAGGTCTCATGGATTAATGCTGCTCTGTAACTGAGCTGTAGGAATCCCAAT
GACATCTTTGCTGACTTGGAAATCTACCTGACTCTTCAGAAATTGCCAACT**TAGG**CAGGCACAAATCTGGGTCT
TGGGGACTAAACCAATGCCTGTGAAGCAGTCAAGCCCTTATGGCCAAATAACTTTTCAACCAATGAGCCTTAGTTACC
CTGATCTGAGCCCTTGGCCTCCATTCTGTCTCTAAACATTCAAATGACGCGCTGATGCTGTGCTCAGGCGCCATG
CTATGAGTTTCTCTTGATATCATTCAGCATCTACTCTAAAGAAAAATGCGCTGTCTTAGCTGTCTTCTGGACTAC
ACCCAAAGCCTGATCCAGCCTTTTCAAGTCACTAGAAGTCTGCTGGATCTTGCCATAAATCCCAAGAAAAATGGAATC
AGGTAGACTTTTAAATACATAATTTCTTTTAGATGSCAAACCAAGAGCTCTTTGGGTCCATTCAAGTGAAT
AGATGGAATTTTGAACAAATAGAATAATCTATTATTTGGAGCCTGCCAAGAGGTACGTAAATGGGTAAATTCGACG
TCAGCGACCAAAATATTCCTGATTTCCAAATATGTATGCACCTCAAGGTCTATCAACATTTGCCAAAGTGAATGTA
ATAGTGTCTTAATTTTGAATTTTAAATGGAAAGTGTATCCATTAACCTGGGCATTGTTGAGGTAAAGTTCTCTCT
CACCCCTACACTGTGAAGGATACAGATTAGGTTTGTGCCAGTCAAGAAATAAAATTTGATAAACATTCTCTTTGAT
GGGAAAGACCCCAAGTAAATCTCCAGAGACAGGGAAAGGTCAAGCCATTTCAGAAAGGACAAATGACTCTCACAC
CTGAATCAGCTGTGACTGGCAGGGCTTGGGCGAGTTGGCCAGGCTCTCTCTTGAATCTTCTCTGCTGCTGCTCT
TGGGTTCTATAGGAATTTGTGAAGGCTCTGACTTGGCCTGTCTGGCCCTGAGAGTGGTGGCCCTGGGAACCTCTCT
TACTCTTACAGAGCCTTGAGAGCAGCCAGTGCACACCTGACAGCCCACTGAAATGACCAAGACAGGTTCAAGT
AGGGGTGTGGGTCAACCAAGAGTGGTGCCCTTGGTAGCAGCTGGGGTGACCTCTAGAGCTGGAGGCTGTGG
GACTCCAGGGGCGCCGTGTTCAGGACACATCTATTGCAGAGACTCATTTTACAGCCTTTTCTGCTTCTGCTGACCAA
ATGGCCAGTTTCTGTTAGGAAGATGGAGGTTTACAGTTGTTTAGAAAACAGAAATAGACTTAATAAGGTTTAA
AGCTGAAGAGGTTGAAGCTAAAGGAAAGGTTGTTGTTAATGAATATCAGGCTATTATTGTATTAGGAAA
ATATAATATTACTTGTAGAATTTCTTTAATTAGGGCTTTTCTGTGCCAGACATTTGCTCTCAGTGTCTTGCATG
TATTAGCTCACTGAATCTTTCAGACAAATGTTGAGAAGTTCCCATTTATTATTCTTACAAATGTGAAGACGG
AAGCTCATAGAGGTGAGAAAACTCAACAGAGTCAACCCAGTTGGTGAAGCTGGGAAAGTTAGGATTCAGATCGAAAT
TGAGCTGCTTTATAACCCATATTTTCCGCTGTTTATAGAGGCTCAAAATGTGTGAGAAAGAAACATTTGCA
ATAAATGGCTGATTTTTT

【図 50】
[Fig50]

MRWFLFWTLAAVAAAASTVLATALSPAPTTMDFTTFAPLEDTSRRPQFCWPCCEPPSPRRCPLGVSLITDGCEC
CKMCAQQLGDNCTEAAICDPHRLGYCDYSGDRPRYAIGVCAQVVGVCVLDGVRYNNGQSFQPNCKYNCTCIDGA
VGCTPLCLRVPRPRLWCPHPRRVSIPGHCCCEQWVCEDDAKRPRKTAPRDTGAFDAVGEVEAWHNCIAVTSWPSP
CSTSCGLGVSTRISNVNAQCWPEQESRLCNLRPCDVIDHTLIKAGKKCLAVYQPEASMNFTLAGICSTRSYQPKY
CGVCMNDNCCIPYKSKRTIDVSFQCFDGLGFSRQVLWINACFCNLSCRNPNDIFADLESYPDFSEIAN

シグナル配列：	アミノ酸 1-17
膜貫通ドメイン：	アミノ酸 110-126
N-グリコシル化部位：	アミノ酸 86-90;143-147;284-288; 343-347
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 171-175
N-ミリスチル化部位：	アミノ酸 72-78;127-133;149-155; 201-207;231-237;289-295;327-333
アミド化部位：	アミノ酸 269-273
原核生物膜リポタンパク脂質結合部位：	アミノ酸 113-124
フォン・ウィルブランドCドメイン：	アミノ酸 130-147
トロノボスポンジン1：	アミノ酸 223-238
CT(C-末端)モジュール：	アミノ酸 301-313
1GF結合タンパク質 (プロサイトより低い緊縮性)	アミノ酸 72-81

【図 51】
[Fig51]

CAGACGAGATA**ATGG**CAAGCATGGCTGCCGTGCTCACTGGGCTCTGGCTCTCTTTTCAAGCTTTTTCGGCCACCC
AGGCACGGAAAGGCTTTCTGGGACTACTTCAGCCAGACACAGCGGGGACAAAGCGAGGGTGGAGCAGATCCATCAGC
AGAAGATGGCTCCGCGACCCCGGACCCCTGAAGAGACAGCCTTGAGCAAGACCTCAACAATATGAACAAGTTCCTGG
AAAGACTCAGGCTCTGAGTGGGAGCGAGGCTCTCGGCTCCACAGGACCCGGTGGCATCGGGCGGCGAGCTGC
AGGAGGAGTTGGAGGAGGTGAAGGCTCGCTTCAGGCCCTACATGGCAGAGGCGCACGAGCTGGTGGGTGGAATT
TGGAGGGCTTGGCGAGCAACTGAAGCCCTACAGCATGGATCTGATGGAGCAGGTGGCCCTGCGCGTGCAGGAGC
TGCAGGAGCAGTTGCGCGTGGTGGGGGAAGACCAAGGCCAGTTGCTGGGGGGCGTGGACAGGCTTGGGCTT
TGCTCAGAGGACTGCAGAGCGCGCTGGTGACACACACCGGCCCTTCAAAGAGCTCTTCACACCATACCGCCGAGA
GCTGCTGAGGCGCATCGCGCGCCACGTCGAGGAGCTGCACCCAGTGTGGCTCCGACACGCCCCCGCACGCCCGCG
CGCGCTCAGTCCGCTGCGTGCAGTGCTCTCCCGGAAGCTCAGCTCAAGGCCAAGGCCCTGCACGCAACGATCC
AGCAGAACT**TAG**ACGCTGCGCGAAGAGCTCAGCAGAGCCTTTGAGGCACTGGGACTGAGGAAGGGGCGCGCC
CGGACCCCTGATGCTCTCCGAGGAGGTGCGCCAGCGACTTCAGGCTTTCGCGCAGGACACCTACCTCGAGATAG
CTGCCCTTCACTCGGCCATCGACAGGAGACTGAGGAGGTCAGCAGCAGCTGGCGCCACCTCCACAGGSCACA
GTGCTTTCGCCCCAGAGTTTCAACAAACAGACAGTGGCAAGGTTCTGAGCAAGCTGCAGGCCCTCTGGATGACC
TGTGGAAAGCACTCAACGCTTCTATGACCCAGGCGCACAGCATCTGGGGAGCCCTCAGGATCTACTCTGCC
CAGGCCATTTCCAGCTTCTTGTCTGGGAGCCCTTGGCTCTGAGCCTTACGATGGTTGAGTCTTGAAGTGGC
CTGTTGGGTGGAAGGTGGAAGGCTCTGTGCAGGACAGGAGGCGCACAAAGGGGCTGTGCTCTCTGCATATCCA
GCCCTCTGCGACTCCCCAATCTGGATGCATTACATTACCAGGCTTTGCAAAAAA
AAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図 52】
[Fig52]

MASMAAVLTWALALLSAPFATQARKGFWDYFSQTSGDGRVEQIHQQKMAREPATLKDSLEQDLNNMNFLEKLR
PLSGSEAPRLPQDPVGMRRQLQELEEYKARLQPYMAEAHELWGNLEGLRQQLKPYTMDLMEQVALRVQELQEQ
LRVVGEDTRQALLGGVDEAWALLQGLQSRVHHTGRPKELPHYAESLVSIGIRHVQELHRSVAPHAPASPARLS
RCVQVLSRKLLTKAKALHARIQONLDQRELSRAFGTGTTEGAGPDP

【図 53】
[Fig53]

CGCCGCGCGCGCTGCTGGGCGGGGCGAGGATGCGGGCGAGCGCTCGGCGGGCAGGCTCGCTCCCTCCGG
CAGGCTCTTAACCTTCCCGCTACGTCGCCGTTGCGCCGCGGGGCGCCCGCTCTCCCGCGGCCCTCGGGTCTG
GGTCTCTCAGGAGCGCCAGGCGCTGCCCGCTGTGCCCTCCGCGCTCGCCGCGCGCCCGCGCTCCCGCGCTGC
GCCAGCGCCCCCGCGCCGCGCCAGTCTCTGGGCGGT**CTAG**CTGCCCCCTTGGCTCTGTCGGCGCCCTGTGCTGT
GCCCGCGGGCGCGGGCGAGCCTGGGGGACGAAGCCATTCACCTGCCCGCCCTGCTCTCGAGGAGAAAGCTGGCGCG
TGCCGCCCCCCGTGGGCTGCGAGGAGCTGGTGGCAGAGCGGGCTGCGGCTGTTGCGCCACTTGGCGCTGGGCG
TTGGGGATGCCCTGCGGGGTGTACACCCCGCTTGGGCTCGGGCTCGCGCTGTACCCCGCCGAGGGGTGGAG
AAGCCCCGTGCACACACTGATGCACGGGCAAGGCGTGTGCATGGAGCTGGCGGAGATCGAGGCCATCCAGGAAAG
CTGCAGCCCTCTGCAGAGGACGAGGCTGACACCCCAACACAGCTTCAGCCCTGTAGCGCCATGACCGCAGG
TGCTTGCAGAGACACTTCGCCAAAATTGCAGACCGGACACAGGTGGGGCAAGATGAAGTCAATGGGGCGCC
CGGAGGATGCCCGGCTGTGCCCAAGGCTCTGCCAGAGCGAGCTGCACCGGGCGCTGGAGCGGCTGGCGCT
TCACAGAGCGCGACCCACGAGGACCTCTACATCATCCCCATCCCCAACTCGCAGCCGCAACGGCAACTTCCACCCC
AAGCAGTGTCACCCAGCTCTGGATGGGAGCGTGGCAAGTGTGCTGGTGTGGACCGGAAGACGGGGGTGAAGCTT
CGGGGGGGCTGGAGCCAAAGGGGGAGCTGGACTGCCACACAGCTGGCTGGACAGCTTTTGAGAG**TG**AGGCTGCCA
CGAGGCCAGGAGCTCAGGCTCCCTGTACTCTCTGTGCTCTGGAGGCTGCAGAGCTGACCCAGAGTGGAGCTCTGA
GTCTGTAGTCTGTCTGTCTGCTGCGGCGCAGAAAGTTTCCCTCAAAATGCGCTGTGCAGCTGTGCTGCTGCT
GTGTTGTTGTTGTCAGATGGGTGTCCTTGGGGTAAGCCAGAGCCTGGGCTTCTCTTTTGGTGTACACAG
CCCAAGAGGACTGAGACTGGCACTAGCCCAAGAGGCTGAGCCCTGTGTTTCCAGATCGATCTCTGGATTCA
CTCACTCACTCACTTCTCACTCACTCAGCCACCTAAAAACATTTACTGACCATGTACTACTGTGCCAGCTCTAGT
TTTCAAGCTAGCAGAGGCTGGGAGCTTAAAGGAGCTGAGAGACATCTTAAAGAGAGTTCAA
GCTCTGGGAGTAGAAAAATCTATTCCAGAGTCAAGAGGAGAGACATGTACTTGACCATGCTCTTCTCTC
TCAAGTATGCAAGAGGCTGGGAGCTTAAAGGAGCTGGGGTAGAGATGAGTAAATGGTCAAGAGGCTCCAGACC
ACTCCCAAGCTCAGACTTGCCAGGCTCCCTTCTCTTCTTCCCAAGGCTCTTCTTTAGGTCTGGTTGTTGCAC
CATCTGCTTGGTTGGTGGCAGCTGAGAGCCTGTCTGTGGGAGAGCGAAGGGGCTCAAGGAGAGCTTGAAGCAC
AG
AGGGCTAGGGAGGTGGGGTACATTTCTCTGAGCAGTCAAGGTGGGAAGAAAGATGCAAGAGTGAGCTGAATGTG
CCTAATGGAGAAGACCCAGTGTAGGGGATGAGGGGCTTCTGGGTCTGTTTCCCTACCCCAATTTGTGGTGCACA
GCCATGAAGTCAACCGGATGAACCTATCTTCCAGTGGCTCGCTCCCTGTAGCTCTGCTCCCTCTCATATCTC
CTTCCCTCAACCTTCCCTCCCAACCTCCCTACTCCCTGGGCACTCTTGGCTTGTGACTGATGGAGAGAGACT
TAGGAACCTACAGGTGGCCATGATGCTTTTCTTTCTTTTCTTTTAAACAAACAGAAACAAACAAACAA
TGTCAAA

シグナル配列：	アミノ酸 1-23
グリコサミングリカン接着部位：	アミノ酸 200-204
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 233 -237
N-ミリスチル化部位：	アミノ酸 165-171;265-271

【図 69】
【Fig69】【図 70】
【Fig70】

CCCAAAGAGGTGAGGAGCCGGCAGCGGGGGCGGCTGTAACGTGTAGGAAGGCTGCAGAGTGGCGACGTCTACGCC
GTAGGTTGGAGGCTGTGGGGGGTGGCCGGGCGCCAGCTCCAGGCCGAGAAAGTGACCTGCGGTGGAGGTTCCCTC
CTCGCTGCTGGAGAACGGAGGAGAAGGTGCTGGCCGGGTGAAAGTGCCCTCCCTCTGCTTGACGGGGCTGAGGG
GCCCCAAGCTTAGGGGCTCCGTAGTCGCCCGGCCCTCCGTGAAGCCCAGGTCTAGAGATATGACCCCGAGAGTGC
CCATCTCCGGCCCCGGGCTGGGGCTCCCTGAGTGGATCGGTGCTGGCAGAGGCGGAGTAGTGTTCAGCATG
GTGCTGAGCATCCACGAACCGGTATGGGACCGATCTCGTGGTGCCTGGCCCTGCGAGTGCAGGCCTTCTAC
GTCCAATACAAGTGGGACCGGCTGCTACAGCAGGGAAGCCCGCTTCCAGTTCGGAATGTCGCGCAACAGTGGC
CTATTGCCCGCTCCATGGTTCATGCTTTGCTTGGACTAGTCATGAAGGAGCGGTGCCAGACTGCTGGGAACCG
TTCTTTGAGCGTTTGGCATTGTGGTGGCAGCCACTGGCATGGCAGTGGCCCTCTTCTCATCAGTGTGGCGCTC
GGCATCACTCGCCAGTGCCAACCAACACTTGTGTCATCTTGGGCTTGGCTGGAGGTGTTATCATTTATATCATG
AAGCACTCGTTGAGCGTGGGGAGGTGATCGAAGTCCTGGAACTCTTCTGATCTTCGTTTATCTCAACATGATC
CTGCTGTACCTGCTGCCCGCTGCTTCACCCCTGGTGAGGCACTGCTGGTATTGGGTGGCATTAGCTTTGTCCTC
AACAGCTCATCAAGCGCTCTCTGACACTGGTGGAAAGTCAGGGGGGACCCAGTGGACTTCTCTGCTGGTGGTG
GTAGTAGGGATGGTACTCATGGCAATTTCTTCAGCACTCTGTTGCTCTTCATGGACTCAGGCACCTGGGCCCTCC
TCCATCTTTTCCACTCATGACCTGTGTGCTGAGCCCTTGGTCTGCTCCTACCCCTGGCTGCACCGGCTCATCCGC
AGGAATCCCTGCTCTGGCTTCTTCAGTTTCTCTTCCAGACAGACACCCGATCATCTCCTAGCTATTGGCTCT
CTGCTGGCCACCTTGGCTGCTGCTGGTGTGCTTACCAAGATGCCAAGCGGTATCTTCCGAGTCCAGAAGCAC
CAGGCCCCACCATCGCCCGAAGATTTCCACCTCATTTGTGTAGCCACCTACATCCAGGTATCATCTTTGAC
CGGCCACTGCTATGTAGCCGCCACTGTATGCCCTGGCGGTCTTCATCTTCTGGAGTATGCGCTACTTCCGC
ATCAAGCTTTGGGTCACTACTACGGAGCTTCCCTGTCCTTTTCTGGATGAACGAGACAGTGGACCACTATT
CTGACACACATCTACTGCTCCTGGGATGTCTCTTCCATCTGGTGTATCCCAAGACCTGCACACAGAAGGT
AGCTGGGAGGAGCCAGGCCCTCGTCCCTATGCCGGTGTCTGGCTGTGGGTGTGGGTGATACGTGGCCCTCC
ATCTTCGGTAGCACCATGGGGGAGATCCGCTGGCCTGGAACCAAAAGACTTTTGGGGGACCATGACATCTATA
TTTGGCGAGATCATTTCTGTAGCTCTGATCTTAATCTTTGACAGTGGAGTGGACCTAAACTACAGTTATGCTTGG
ATTTTGGGGTCCATAGCACTGTGTCCCTCTGGAAGCATACACTACACAGATAGACAATCTCTTCTGCTCTC
TACCTCCTGATATTGCTGATGGCTTACTGCTGTACAGTGCAGCAGTGCAGGAGGAAACAGACATGGGAGGGT
GAACAGTCCCCACAGCAGCAGCTACTTGGGCATGAAGAGCCAAGGTGTGAAAAGCAGATTTGATTTTTCAGTTG
ATTACAGATTAAAAATAAAAGCAAGCTCTCTAGTCTCA

MTRECPSPAPGPGAPLSGSVLAEEAAVFAVVLISHATVWDYRISWCAVALAVQAFVVOYKWDRLLOQGSVQFQFRM
SANSGLLPASWVMPLGLVMKERCQTAGNPFERFGIVVAATGMAVALFSSVVALGITRFPVPTNTCVILGLAGGV
IIVYMKHSLSVGEVIEVLVLLIFVYLNMLLYLLPRCTPGEALLVLGGISFVLNQLKRSRLTLVESQGDVPVF
FLVSVVVMVLMGIFPSTLFVFMDSGTWASSIFPHLMTCVLSLVVLPNLHRIIRNPPLWLQFLFQTDTRIYL
LAYWSLLATLACLVLYQNAKRSSSESKKHQAPTIAKYFHLIVVATYIPGIIIFDRPLLYVAATVCLAVFIFLEY
VRYFRIKPLGHTLRSLFLFLDERDSGPLILTHIYLLGMSLPWLIPRPCTQKSLGGARALVPYAGVLAVGVG
DTVASIFGSTMGEIRWPGTKKTFEGTMTSIFAQIISVALILIFDSGVDLNYSAWILGSISTVSLLEYTTQIDN
LLLPLYLLILLMA

シグナルペプチド：

アミノ酸 1-36

膜貫通ドメイン：

アミノ酸 77-95;111-133;161-184;
225-248;255-273;299-314;348-373;406-421
435-456;480-497

N-グリコシル化部位：

アミノ酸 500-504

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 321-325

N-ミリスチル化部位：

アミノ酸 13-19;18-24;80-86;111-117;
118-124;145-151;238-244;251-257;4
30-436;
433-439;448-454;458-464;468-474;4
75-481;
496-502;508-514

原核生物膜リポタンパク脂質結合部位：

アミノ酸 302-313

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
C 0 7 K 14/72	A 6 1 P 43/00 1 0 5	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/32	C 0 7 K 14/72	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 16/32	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02 C	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/574 A	
	C 1 2 N 5/00 A	

- (31)優先権主張番号 PCT/US99/12252
(32)優先日 平成11年6月2日(1999.6.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/140,650
(32)優先日 平成11年6月22日(1999.6.22)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/140,653
(32)優先日 平成11年6月22日(1999.6.22)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/144,758
(32)優先日 平成11年7月20日(1999.7.20)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/145,698
(32)優先日 平成11年7月26日(1999.7.26)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/146,222
(32)優先日 平成11年7月28日(1999.7.28)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/149,395
(32)優先日 平成11年8月17日(1999.8.17)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/151,689
(32)優先日 平成11年8月31日(1999.8.31)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 PCT/US99/20111
(32)優先日 平成11年9月1日(1999.9.1)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 PCT/US99/21090

- (32)優先日 平成11年9月15日(1999.9.15)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 PCT/US99/28313
 (32)優先日 平成11年11月30日(1999.11.30)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 PCT/US99/28301
 (32)優先日 平成11年12月1日(1999.12.1)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 PCT/US99/28634
 (32)優先日 平成11年12月1日(1999.12.1)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 PCT/US00/00219
 (32)優先日 平成12年1月5日(2000.1.5)
 (33)優先権主張国 米国(US)

- (72)発明者 ゴッダード, オードリー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94131, サン フランシスコ, コンゴ ストリート 110
 (72)発明者 ゴドウスキー, ポール, ジェー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリングゲーム, イーストン ドライブ 2627
 (72)発明者 ガーニー, オースティン, エル.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002, ベルモント, デビー レーン 1
 (72)発明者 ヒラン, ケネス, ジェー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94114, サン フランシスコ, セワード ストリート 64
 (72)発明者 マースターズ, スコット, エー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, チェリー ストリート 990
 (72)発明者 パン, ジェームス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002, ベルモント, コロネット ブールバード 2705
 (72)発明者 ピッティ, ロバート, エム.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94530, エル セリト, リバティール ストリート 1110
 (72)発明者 ロイ, マーガレット, アン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94123, サン フランシスコ, ウェブスター ストリート 2960, 4号室
 (72)発明者 スミス, ヴィクトリア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリングゲーム, ドゥワイト ロード 19
 (72)発明者 ストーン, ドナ, エム.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94005, ブリスベン, シエラ ポイント ロード 684
 (72)発明者 ワタナベ, コリン, ケー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94556, モラガ, コーリス ドライブ 128
 (72)発明者 ウッド, ウィリアム, アイ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, ヒルズバロ, サウスダウン コート 35

Fターム(参考) 2G045 AA26 AA40 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA78
 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA12 BA36 BA45 CA04 CA05 CA09 CA11 CA12 DA02
 DA03 DA06 DA12 EA02 HA14 HA17

4B063	QA13	QA18	QQ08	QQ43	QQ52	QQ79	QR32	QR35	QR48	QR55
	QR62	QR77	QS25	QS33	QS34	QX02	QX07			
4B064	AG27	AG31	BH09	CA10	CA19	CA20	CC24	CE12	DA01	DA14
4B065	AA26X	AA80X	AA90X	AA91X	AA93X	AA93Y	AB01	CA24	CA44	CA46
4C084	AA17	AA19	NA14	ZB212	ZB262					
4C085	AA13	AA14	AA16	BB01	BB11	BB31	BB41	BB43	CC02	CC22
	CC23	GG02								
4C086	AA01	AA02	AA03	EA16	MA01	MA04	NA14	ZB21	ZB26	
4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	BA41	CA41	DA76	DA86	EA28
	EA51	FA74	GA26							