

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-507234

(P2004-507234A)

(43) 公表日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(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 38/00	A 6 1 P 7/02	4 B O 2 4
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 9/10	4 B O 6 4
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 17/02	4 B O 6 5
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 19/10	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 165 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-516322 (P2002-516322)	(71) 出願人	591123609 イミュネックス・コーポレーション IMMUNEX CORPORATION アメリカ合衆国ワシントン州98101, シアトル, ユニバーシティ・ストリート 5 1
(86) (22) 出願日	平成13年7月27日 (2001.7.27)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月28日 (2003.1.28)	(74) 代理人	100076691 弁理士 増井 忠次
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/023734	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(87) 国際公開番号	W02002/010406	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(87) 国際公開日	平成14年2月7日 (2002.2.7)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/221,838		
(32) 優先日	平成12年7月28日 (2000.7.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 メタロプロテインナーゼーディスインテグリンポリペプチドとその製造及び使用の方法

(57) 【要約】

新規のディスインテグリンポリペプチド、そのようなポリペプチドをつくる方法、並びにディスインテグリン関連の障害及び状態を治療し、メタロプロテインナーゼーディスインテグリンポリペプチド活性を変調する剤を同定するためにそれらを使用する方法、が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) ～ (u) からなる群から選択される配列を含んでなる実質的に精製されたポリペプチド；

- (a) 配列番号 3 ～ 4 及び 6 ～ 27；
- (b) ディスインテグリン活性を有する配列番号 6 の断片；
- (c) ディスインテグリン活性を有する配列番号 8 の断片；
- (d) ディスインテグリン活性を有する配列番号 14 の断片；
- (e) メタロプロテイナーゼ活性を有する配列番号 24 の断片；
- (f) ディスインテグリン活性を有する配列番号 24 の断片；
- (g) ほぼ残基 43 ないし 148 の配列番号 6；
- (h) ほぼ残基 1 ないし 366 の配列番号 8；
- (i) ほぼ残基 38 ないし 366 の配列番号 8；
- (j) ほぼ残基 1 ないし 622 の配列番号 14；
- (k) ほぼ残基 84 ないし 622 の配列番号 14；
- (l) ほぼ残基 299 ないし 622 の配列番号 14；
- (m) ほぼ残基 1 ないし 701 の配列番号 21；
- (n) ほぼ残基 1 ないし 277 の配列番号 24；
- (o) ほぼ残基 278 ないし 435 の配列番号 24；
- (p) ほぼ残基 1 ないし 332 の配列番号 25；
- (q) ほぼ残基 1 ないし 627 の配列番号 25；
- (r) ほぼ残基 1 ないし 215 の配列番号 26；
- (s) ほぼ残基 118 ないし 215 の配列番号 26；
- (t) ほぼ残基 224 ないし 383 の配列番号 26；及び
- (u) ほぼ残基 29 ないし 574 の配列番号 27。

10

20

【請求項 2】

ディスインテグリン活性を有する、請求項 1 に記載の実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 3】

メタロプロテイナーゼ活性を有する、請求項 1 に記載の実質的に精製されたポリペプチド。

30

【請求項 4】

配列番号 3 ～ 4、6 ～ 11、13 ～ 18、20、又は 23 ～ 27 に示されるような配列に少なくとも 97% 相同である配列を含んでなる実質的に精製されたポリペプチドであって、メタロプロテイナーゼ若しくはディスインテグリン活性を有する、前記ポリペプチド。

【請求項 5】

第二のポリペプチドへ連結し、第二のポリペプチドは、ロイシンジッパーポリペプチド、Fc ポリペプチド、又はペプチドリンカー部分である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のポリペプチドをコードしている単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

40

【請求項 8】

請求項 6 に記載のポリヌクレオチドを含んでなる組換え宿主細胞。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の宿主細胞をポリペプチドの発現を促進する条件の下で培養することを含んでなる、ポリペプチドを産生するための方法。

【請求項 10】

請求項 8 に記載の宿主細胞をポリペプチドの発現を促進する条件の下で培養することによって産生されるポリペプチド。

【請求項 11】

50

請求項 1 に記載のポリペプチドへ特異的に結合する実質的に精製された抗体。

【請求項 1 2】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 1 に記載の抗体。

【請求項 1 3】

抗体がヒト若しくはヒト化抗体である、請求項 1 1 に記載の抗体。

【請求項 1 4】

請求項 1 に記載のポリペプチドの阻害剤若しくは結合剤を設計する方法であって、該ポリペプチドの三次元構造を決定する工程、この三次元構造について基質若しくはリガンドの結合部位を分析する工程、該ポリペプチドと相互作用することが予測される分子を設計する工程、そして該分子の阻害若しくは結合活性を決定する工程を含んでなる、前記方法。 10

【請求項 1 5】

ポリペプチドの活性を変調する剤を同定するための方法であって：

(a) 剤を請求項 1 に記載のポリペプチドと、該剤と該ポリペプチドが相互作用するような条件の下で接触させること；そして

(b) 該剤の存在下での該ポリペプチドの活性を対照と比較して決定することを含んでなり、ここで活性の変化は、該ポリペプチドの活性を変調する剤の示標となる、前記方法。

【請求項 1 6】

活性が、ディスインテグリン活性、細胞接着活性、血管新生活性、メタロプロテイナーゼ活性、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

ポリペプチドがディスインテグリン活性を有する、請求項 1 5 に記載の方法。 20

【請求項 1 8】

剤が、抗体、小分子、ペプチド、及びペプチド模擬体 (peptidomimetic) からなる群から選択される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 9】

細胞若しくは哺乳動物において血管新生を変調するための方法であって、該細胞若しくは哺乳動物へ請求項 1 に記載のポリペプチドを、ディスインテグリン活性を変調するのに有効な量で接触させるか又は投与することを含んでなる、前記方法。

【請求項 2 0】

細胞が *in vitro* で接触される、請求項 1 9 に記載の方法。 30

【請求項 2 1】

細胞が *in vivo* で接触される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

内皮細胞を請求項 1 に記載のポリペプチドと接触させることを含んでなる、内皮細胞遊走を変調するための方法。

【請求項 2 3】

インテグリンを発現する細胞若しくは哺乳動物へ、ディスインテグリン活性を有する請求項 2 に記載のポリペプチドの有効量を接触させるか又は投与することを含んでなる、インテグリンのリガンドへの結合を阻害する方法。

【請求項 2 4】

哺乳動物が、眼科障害；悪性及び転移性の状態；炎症性疾患；骨粗鬆症と加速された骨吸収により仲介される他の状態；再狭窄；不適切な血小板の活性化、動員、又は凝集；血栓症；及び組織修復若しくは創傷治癒を必要とする状態からなる群から選択される状態を患っている、請求項 2 3 に記載の方法。 40

【請求項 2 5】

ポリペプチドが多量体の形態である、請求項 1 9 若しくは 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

多量体が、二量体又は三量体である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

多量体が、Fc ポリペプチド、ロイシンジッパー、又はペプチドリンカーを含む、請求項 50

25に記載の方法。

【請求項28】

請求項1に記載の1つ以上のポリペプチドのセットを表すデータセット；

コンピュータ；及び

コンピュータ上の実行可能フォーマットにおいてポリペプチドを分析するためのコンピュータアルゴリズム

を含んでなる、ポリペプチド又はポリヌクレオチドを分析するためのシステム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、35 U. S. C. 119条に基づいて、2000年7月28日出願の米国暫定特許出願第60/221, 838号の利益を主張し、その開示内容は参照により本明細書に組込まれる。

【0002】

発明の分野

本発明は、ヒトメタロプロテイナーゼーディスインテグリンポリペプチドファミリーへの相同性を有するポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びその製造及び使用の方法に関する。

【0003】

背景技術

メタロプロテイナーゼーディスインテグリンポリペプチドは、本明細書でADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase domain; ディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼのドメイン) ポリペプチド又は「ADAMs」とも呼ばれ、多ドメイン性I型膜ポリペプチドの関連群である。ADAMファミリーのポリペプチドのあるメンバーは、例えば、生殖組織又は筋肉細胞を含む、ある細胞型で高度に発現される。さらに、ADAMファミリーのポリペプチドのメンバーは、発生を通して一般に恒常的に発現される。

【0004】

今日、数多くのADAM遺伝子が同定されており、ファーチリン (fertilin) α 及び β (インテグリン仲介性の結合と卵子及び精子の融合に関わり、PH-30 α 及び β として以前知られていた)、精巣上体先端タンパク質 (epididymal apical protein) I、シリテスチン (cyrtestin)、MDC (ヒト乳癌における腫瘍サプレッサの候補物)、メルトリン (meltrin) - α (筋管形成のプロセスにおける筋芽細胞の融合を仲介する)、MS2 (マクロファージ表面抗原)、及びメタルギジン (metargidin) を含む。さらに、トロンボスポンジン (TSP) モチーフのあるディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼドメインを含有する、ADAMTS-1と命名された新たなADAMファミリー遺伝子が、様々な炎症プロセス、並びに癌悪液質の進展と密接に関連していることが示された (Kuno, K. et al., J. Biol. Chem. 272: 556-562 (1997))。ショウジョウバエ (*Drosophila*) にある新たなADAMのメンバーは、kuzbanian 遺伝子 (「KUZ」) と呼ばれ、ショウジョウバエの神経発生に関与していることが見出された (Rooke, J. et al., Science 273: 1227-1231 (1996年8月))。

【0005】

典型的なADAMファミリーポリペプチドは、プロー、メタロプロテイナーゼ様ー、ディスインテグリン様ー、システインリッチ、上皮増殖因子様リピートの膜貫通及び細胞質ドメインからなる細胞表面ポリペプチドである。あるADAMsでは、メタロプロテイナーゼドメインが、増殖因子、接着タンパク質、及び炎症性因子の放出のような、タンパク質プロセッシング機能に関与すると考えられている。ディスインテグリンドメインは、血小板凝集、腫瘍細胞又は好中球の遊走、及び血管新生のような、インテグリン仲介性細胞接着

10

20

30

40

50

(細胞と細胞、細胞とマトリックスの接着) 相互作用においてある役割を果たす可能性がある。ADAMファミリーのポリペプチドのこのような活性は、メタロプロテイナーゼ及びインテグリンの基質との相互作用を通じて行われる可能性が高く、メタロプロテイナーゼの基質はADAMファミリーのポリペプチドのメタロプロテイナーゼ触媒ドメインへ結合し、そして、インテグリンはディスインテグリンドメインに結合する。増殖因子、接着タンパク質、及び炎症性因子の放出のようなタンパク質プロセッシング機能と細胞接着の仲介におけるその推定される役割のために、ADAMファミリーのポリペプチドは、炎症、癌、アレルギー、生殖系及び血管系の状態 (condition) に関連していると推定されている。ADAMポリペプチドファミリーの特徴及び活性は、Black, R. A. and White, J. M., 1998, Curr. Opin. in Cell Biol. 10: 654-659; 及び Schlondorff, J. and Blobel, C. P., 1999, J. Cell Sci. 112: 3603-3617 にさらに記載されていて、これらは参照により本明細書に組込まれる。

10

【0006】

発明の概要

本明細書に初めて提供されるのは、メタロプロテイナーゼ-ディスインテグリン (MPD) ポリペプチド及びADAM (「ディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ」) ポリペプチドファミリーへの相同性を有するポリペプチド配列と、ADAMファミリーのポリペプチドに含まれる機能性ドメイン、並びにそれらの製造の方法と使用の方法である。

【0007】

本発明は、配列番号3~4及び6~27; ディスインテグリン活性を有する配列番号6の断片; ディスインテグリン活性を有する配列番号8の断片; ディスインテグリン活性を有する配列番号14の断片; メタロプロテイナーゼ活性を有する配列番号24の断片; ディスインテグリン活性を有する配列番号24の断片; ほぼ残基43ないし148の配列番号6; ほぼ残基1ないし366の配列番号8; ほぼ残基38ないし366の配列番号8; ほぼ残基1ないし622の配列番号14; ほぼ残基84ないし622の配列番号14; ほぼ残基299ないし622の配列番号14; ほぼ残基1ないし701の配列番号21; ほぼ残基1ないし277の配列番号24; ほぼ残基278ないし435の配列番号24; ほぼ残基1ないし332の配列番号25; ほぼ残基1ないし627の配列番号25; ほぼ残基1ないし215の配列番号26; ほぼ残基118ないし215の配列番号26; ほぼ残基224ないし383の配列番号26; 及び、ほぼ残基29ないし574の配列番号27からなる群から選択される配列を含んでなる、実質的に精製されたポリペプチドを提供する。

20

30

【0008】

本発明はまた、配列番号3~4、6~11、13~18、20、又は23~27に示されるような配列に、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも97%相同である配列を含んでなる実質的に精製されたポリペプチドを提供し、ここでこのポリペプチドは、メタロプロテイナーゼ若しくはディスインテグリン活性を有する。

【0009】

さらに本発明は、上記に示されるような、第二のポリペプチドへ連結したポリペプチドを提供し、ここで第二のポリペプチドは、ロイシンジッパーポリペプチド、Fcポリペプチド、又はペプチドリンカー部分である。

40

【0010】

さらに本発明には、上記に示されるようなポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、並びにそのポリヌクレオチドを含んでなるベクター、及び本発明のポリヌクレオチドを含んでなる組換え宿主細胞が含まれる。

【0011】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含有する宿主細胞をポリペプチドの発現を促進する条件の下で培養することを含んでなる、ポリペプチドを産生するための方法を提供

50

する。

【0012】

さらに本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含む宿主細胞をポリペプチドの発現を促進する条件の下で培養することによって産生されるポリペプチドを提供する。

【0013】

本発明は、上記に示されるようなポリペプチドへ特異的に結合する実質的に精製された抗体を提供する。1つの態様では、抗体がモノクローナル抗体である。もう1つの態様では、抗体がヒト若しくはヒト化抗体である。

【0014】

本発明によりまた提供されるのは、上記又は本明細書に示されるポリペプチドの阻害剤若しくは結合剤を設計する方法であって、この方法は、該ポリペプチドの三次元構造を決定し、この三次元構造について基質若しくはリガンドの結合部位を分析し、該ポリペプチドと相互作用することが予測される分子を設計し、そして、及び該分子の阻害若しくは結合活性を決定する、ことを含んでなる。 10

【0015】

さらに本発明は、本明細書に示されるポリペプチドの活性を変調する (modulate) 剤 (agent) を同定するための方法を提供し、この方法は、剤を該ポリペプチドと、剤とポリペプチドが相互作用するような条件の下で接触させ；そして、該剤の存在下での該ポリペプチドの活性を対照 (例、剤の不在下でのポリペプチド) と比較して決定する、ことを含んでなり、ここで活性の変化は、該ポリペプチドの活性を変調する剤の示標となる。1つの態様では、ポリペプチドの活性が、ディスインテグリン活性、細胞接着活性、血管新生活性、メタロプロテイナーゼ活性、及びそれらの組合せ (例、メタロプロテイナーゼ及びディスインテグリン活性) からなる群から選択される。もう1つの態様では、剤が、抗体、小分子、ペプチド、及びペプチド模擬体 (peptidomimetic) からなる群から選択される。 20

【0016】

本発明はまた、細胞若しくは哺乳動物において血管新生を変調するための方法を提供し、この方法は、該細胞若しくは哺乳動物へ、ディスインテグリン活性を変調するのに有効な量で本明細書に示される本発明のポリペプチドを接触させるか又は投与することを含んでなる。細胞は、in vitro 若しくは in vivo で接触され得る。 30

【0017】

本発明によりまた提供されるのは、本明細書に示される本発明のポリペプチドに内皮細胞を接触させることを含んでなる、内皮細胞遊走を変調するための方法である。

【0018】

本発明は、インテグリンを発現する細胞若しくは哺乳動物へ、ディスインテグリン活性を有するポリペプチドの有効量を接触させるか又は投与することを含んでなる、インテグリンのリガンドへの結合を阻害する方法を提供する。1つの態様では、哺乳動物が、眼科障害；悪性及び転移性の状態；炎症性疾患；骨粗鬆症と加速された骨吸収により仲介される他の状態；再狭窄；不適切な血小板の活性化、動員 (recruitment)、又は凝集；血栓症；及び組織修復若しくは創傷治癒を必要とする状態からなる群から選択される状態に罹患している。 40

【0019】

本発明のポリペプチドと本発明の方法には、多量体 (例、二量体又は三量体) の形態であるポリペプチドが含まれる。この多量体は、Fcポリペプチド、ロイシンジッパー、又はペプチドリンカーを含み得る。

【0020】

さらに本発明は、本明細書に示される1つ以上のポリペプチドのセットを表すデータセット；コンピュータ；及び、コンピュータ上の実行可能フォーマットにおいてポリペプチドを分析するためのコンピュータアルゴリズム、を含んでなる、本発明のポリペプチド若しくはポリヌクレオチドを分析するためのシステムを提供する。 50

【0021】

発明の詳細な説明

本発明は、メタロプロテイナーゼ及び／又はディスインテグリン活性を有するか又は有すると推定されるポリペプチドを提供する。これらメタロプロテイナーゼ様／ディスインテグリン様(MPD)ポリペプチドは、インテグリン関連性、及びメタロプロテイナーゼ関連性の疾患の治療及び診断における使用、並びに、診断薬及び関連治療薬の開発における使用を見出す。

【0022】

マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)は、細胞外マトリックスの主要成分をすべて分解し、組織再構築と発生及び炎症に関連した修復において主要な役割を担う、構造的に類似した亜鉛依存性酵素のファミリーを構成する(Matresian, Trends Genet. 6: 121-125, 1990; 及び Woessner, FASEB J. 5: 2145-2154, 1991)。MMPには、コラゲナーゼ、ゲラチナーゼA及びB、ストロメライシン、マトリライシン、メタロエラスターゼ、及び膜型マトリックスメタロプロテイナーゼが含まれる。MMPの過剰発現及び活性化は、関節炎、癌、及び多発性硬化症のような広範囲の疾患に関連づけられている。MMPは、典型的には、後期腫瘍細胞の侵襲及び転移に関連した基底膜の破壊に関わると示唆されてきたが、1つのMMPメンバーであるマトリライシンは、初期のヒト結直腸腫瘍において発現されることが示された(Wilson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1402-1407, 1997)。MMPの異常発現は、腫瘍侵襲性(Mignatti and Rifkin, Cell 47: 487-498, 1986; 及び Khokha et al., Science 243: 947-950, 1989)、関節炎(Dean et al., J. Clin. Invest. 84: 678-685, 1989; 及び McCachren, Arthritis Rheum. 34: 1085-1093, 1991)、及びアテローム性硬化症(Henney et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8154-8158, 1991)を含む破壊プロセスの一因となり得る。本明細書で同定されるメタロプロテイナーゼは、例えば、炎症性疾患及び障害の病理発生の一因となる候補タンパク質である。従って、本明細書に提供されるメタロプロテイナーゼポリペプチドは、炎症性障害を治療するために、そして、in silico 及び in vitro の両方での阻害剤の開発の供給源として使用され得る。本明細書に提供されるメタロプロテイナーゼへの阻害剤は、例えば炎症を含む、過剰なプロテイナーゼ活性に関連した疾患及び障害を改善し得る。

【0023】

ADAMファミリータンパク質のディスインテグリンドメインは、血小板凝集、接着、腫瘍細胞若しくは好中球の遊走、及び血管新生のような、インテグリン仲介性の細胞-細胞、及び細胞-マトリックス相互作用の防止に機能する。コントロスタチン(controstatin)のような、以前に記載された(Trikha et al., Cancer Research 54: 4993-4998, 1994)ディスインテグリンは、ヒト転移性メラノーマ(M24細胞)の、I型コラーゲン、ビトロネクチン、及びフィブロネクチンへの細胞接着を阻害するために使用されたことがあるが、ラミニンへはない。さらに、コントロスタチンは、マウス転移モデルにおけるM24細胞の肺コロニー形成を阻害する。

【0024】

ほとんどのメタロプロテイナーゼ-ディスインテグリンポリペプチドの構造には、シグナルドメイン、メタロプロテイナーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインが含まれる。例えば、ADAMファミリーのポリペプチドの様々なメンバーに共通の典型的な構造要素には、NからCの順に、シグナル配列、プロドメイン、メタロプロテイナーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、システイン-リッチドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインが含まれる。メタロプロテイナーゼド

メイン／モチーフの内部にはある重要な残基（例、H E x G H x x G x x H Dモチーフ（配列番号28））が存在するので、そのようなきわめて保存された残基の置換は、このポリペプチドの機能の変化若しくは欠乏に結びつく可能性がある。配列番号28の保存されたメタロプロテイナーゼ活性部位配列を有するADAMには、ADAM1、8～10、12～13、15～17、19～21、24～26、28、及び30が含まれる。また、メタロプロテイナーゼ触媒ドメインは、ジスルフィド結合による機能性ポリペプチド構造の形成に必要とされ得る4つの保存されたシステインを含有する。ディスインテグリン及びシステインリッチの領域には、31の高度に保存されたシステインが存在するが、ADAMファミリーのポリペプチドのほとんどすべてにこれら31のシステインがある。当業者が理解されるように、ポリペプチド内部にあるこれらの領域の境界は近似していて、そのようなドメインの正確な境界（その目的のために利用可能なコンピュータ・プログラムを使用することによって予測することが可能である）は、ADAMポリペプチドファミリー内部のメンバーごとに異なる可能性がある。

10

20

30

40

50

【0025】

ADAMファミリーのポリペプチドは、適度なほどによく保存され、ヒトのファミリーメンバーはお互いに類似していて、マウス、ラット、さらにはキイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）や線虫（*Caenorhabditis elegans*）のような他の種由来のADAMファミリーメンバーに類似している（例えば、Yamamoto et al., Immunol. Today, 20（6）：278, 1999；さらなる情報については、以下のインターネット・ウェブサイト（www）を参照のこと：gene.ucl.ac.uk/users/hester/metallo.html；uta.fi/~loikka/ADAMs/HADAMs.html；及びpeople.Virginia.EDU/~jag6n/Table_of_the_ADAMs.html）。しかしながら、ADAMポリペプチドファミリーのサブファミリーは、配列類似性と関連する生物学的活性を基に定義可能である。1つのそのようなサブファミリーは、ADAM10及びADAM17/TACEのポリペプチドを含み、これは、これまでに同定されたADAMポリペプチドファミリー内の他のメンバーと比較すると、お互いに対してより高い配列類似性を示す。ADAM10及び17は、ディスインテグリン-システインリッチ領域において、他のADAM間のこの領域には31の保存されたシステインがあるのと対照的に、21のシステインを有する。従って、ADAMは、20～31の保存システイン（例えば、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、又は31の保存システイン）を有する可能性がある。ADAM17/TACEとADAM-10はまた、「シェダーゼ（shed dases）」であり、それらは他の膜タンパク質の細胞外ドメインを切断して放出すると考えられている。もう1つのサブファミリーの主要機能はインテグリン又は他のタンパク質へ結合することであるかもしれない。例えば、ADAM-2は、プロセッシングを受けてプロドメインとメタロプロテイナーゼ触媒ドメインの両方を除去し、ディスインテグリンドメインを曝露することで、そのコグネイトへそれが結合することが可能になる。定義され得るもう1つのサブファミリーは、精巣特異的であると思われるADAMである；これらのタンパク質には、ADAM2～3、16、18、20～21、24～26、及び29～30が含まれ、ADAM5及び6は、特に精巣特異的である。

【0026】

ADAMファミリーのポリペプチドは、例えば、泌尿生殖組織（例、腎臓組織と生殖組織）、神経組織、及び筋肉組織を含む多くの細胞型で発現されている。ADAMポリペプチドへの結合パートナーには、少なくとも一部はインテグリンとの相互作用を介して内皮細胞へ結合し、そしてT細胞へ結合するいくつかのADAMファミリーポリペプチドのディスインテグリン-システインリッチドメインにより示されるように、例えば、内皮細胞とT細胞により発現されるものがある。ADAMファミリーのポリペプチドのメンバーとその結合パートナーとの相互作用は、生殖組織、神経組織、及び筋肉細胞を含む細胞型と、結合パートナーを発現する内皮細胞及びT細胞との相互作用に仲介することに関わる可能

性がある。

【0027】

あるADAMファミリーポリペプチドのディスインテグリンドメインは、細胞表面インテグリンのような結合パートナーと相互作用し得る（例えば、同時係属中の国際特許出願PCT/US01/05701号を参照のこと、この開示内容はそのまま参照により本明細書に組込まれる）。1つ以上の結合パートナーへ結合することによって、ディスインテグリンドメインのポリペプチドは、ADAMポリペプチドのその結合パートナーへの結合により仲介される生物学的活性（例、血管新生）を阻害し得る。あるADAMファミリーポリペプチドはディスインテグリンドメインを介してインテグリン結合活性を示すので、ディスインテグリン活性の変調は、接着（例えば、精子の卵子への結合におけるADAM1及び2の役割と、糸球体及び尿細管（glomerular and tubular）の上皮細胞の、腎組織の基底層との相互作用におけるADAM9の役割）を変調するであろう。ADAMファミリーのポリペプチドの個別メンバーとこれらポリペプチドの断片及び他の誘導体が上記の活性を示す程度は、ディスインテグリン-Fc構築物による内皮細胞遊走の阻害、等のような標準アッセイ法により決定され得る。ADAMポリペプチドとその結合パートナーとの結合を検出するか又は測定するのに特に適したアッセイは、FACS分析である。ADAMファミリーポリペプチドの生物学的活性及びパートナー結合特性を評価するための追加のアッセイは以下に記載する。本発明ではメタロプロテイナーゼドメインを欠失する本発明のポリペプチドが考慮され、他のADAMファミリーポリペプチドのメタロプロテイナーゼ活性に関して優性ネガティブとして作用する可能性がある（例えば、『ヒトディスインテグリンタンパク質（A HUMAN DISINTEGRIN PROTEIN）』と題する、国際公開WO／、2001年7月27日出願、を参照のこと。この開示内容はそのまま参照により本明細書に組込まれる）。

【0028】

ADAMファミリーのポリペプチドは、共通の特徴として、ディスインテグリン活性を介したインテグリン関連性相互作用、及び／又はメタロプロテイナーゼ活性を介したタンパク分解を共有する、炎症、癌、アレルギー、生殖、神経障害及び疾患、血管新生、及び血管系の疾患若しくは状態（condition）に関与している。ADAMポリペプチドの生物学的活性が関与していることが知られているか又はその可能性がある、炎症、癌、アレルギー、生殖、神経障害及び疾患、血管新生、及び血管系の状態の例は、慢性関節リウマチ、敗血症ショック、糸球体疾患、急性腎不全、アルツハイマー病、及び不適正な骨吸収である。ADAMファミリーのポリペプチドのメンバーとその基質、リガンド、受容体、結合パートナー、又は他の相互作用ポリペプチドとの相互作用を遮断するか又は阻害することは本発明の1つの側面であり、ADAMポリペプチド活性の阻害剤若しくは変調因子の使用により上記の疾患及び状態を治療する、変調する、又は改善するための方法を提供する。1つの態様では、ADAMファミリーのポリペプチドのメンバーとそのコグネイト（cognate）との相互作用が、ADAMファミリーポリペプチド又はそのコグネイトを含有するサンプルをMPDポリペプチド若しくは抗MPD抗体と接触させることによって影響を受ける。

【0029】

非常に低いディスインテグリン活性が関与するある種の状態では、これらの状態を治療するか又は改善する方法は、例えば、ディスインテグリン活性を有するMPDポリペプチドの量若しくは活性を、そのようなポリペプチド又はその活性断片若しくは融合ポリペプチドを提供することか、又は内因性若しくは外因性MPDポリペプチドを活性化する剤を提供することによって高めることを含む。MPDポリペプチドのさらなる使用には、炎症、癌、アレルギー、生殖、神経障害、及び血管系疾患の診断試薬；インテグリンポリペプチドと受精プロセス、インテグリンの精製及びプロセッシング、及び／又は内皮細胞若しくはT細胞の研究についての研究用試薬；又は治療剤を細胞へデリバリーするための担体／標的指向ポリペプチドとしての使用が含まれる。

【0030】

本明細書で使用されるように、「タンパク質」と「ポリペプチド」は、長さや翻訳後の修飾（例、グリコシル化、又はリン酸化）にかかわらず、アミノ酸の鎖を意味し、天然タンパク質、合成若しくは組換えのポリペプチド及びペプチド、並びに、例えば、M P D アミノ酸配列の全部若しくは一部を含む第一部分と、異なるヌクレオチド配列の全部若しくは一部によりコードされる第二部分とのハイブリッドからなる組換え分子が含まれる。典型的には、タンパク質又はポリペプチドは、通常それが天然に存在することに由来する他の成分から実質的に純粋である。「実質的に純粋」若しくは「精製された」という用語は、ポリペプチドへ言及される場合、それが天然では結合しているタンパク質及び天然に存在する有機分子から少なくとも30%フリーであるポリペプチドを意味する。好ましくは、本発明の実質的に純粋なポリペプチドは、重量にして、少なくとも35～50%；好ましくは60～70%；より好ましくは少なくとも75%～90%；そして最も好ましくは少なくとも99%、他の天然に存在する分子から精製されている。本発明の実質的に純粋なポリペプチドは、例えば、天然源からの抽出によるか、このポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドの発現によるか、又はこのポリペプチドを化学合成することによって得ることができる。純度は、適正な方法、例えば、クロマトグラフィー、PAGE、又はHPLC分析により測定され得る。

10

【0031】

本明細書で使用されるように、「M P D ポリペプチド」は、図1に示されるようなアミノ酸配列を含有するか又は含むポリペプチド；図1に示される配列へ実質的な相同性又は実質的な同一性を有するポリペプチド；上記配列の断片；及び上記の保守的変異体を意味する。本発明は、配列番号1～27に示されるような配列を含んでなるM P D ポリペプチドを提供する。

20

【0032】

ディスインテグリン活性に関連した配列を含んでなるM P D ポリペプチドには、配列番号6；ほぼ残基43ないし148の配列番号6；ほぼ残基1ないし366の配列番号8；ほぼ残基38ないし366の配列番号8；配列番号11；配列番号13；ほぼ残基1ないし622の配列番号14；ほぼ残基84ないし622の配列番号14；ほぼ残基299ないし622の配列番号14；配列番号16；ほぼ残基1ないし701の配列番号21；配列番号23；配列番号24；ほぼ残基278ないし435の配列番号24；ほぼ残基1ないし627の配列番号25；配列番号26；及びほぼ残基224ないし383の配列番号26が含まれ、本明細書では「M P D ディスインテグリンポリペプチド」（M P D d i s）と呼ぶ。本明細書で使用されるように、「ほぼ～ないし」や「ほぼ～の」という用語は、そのような参照された配列の残基の間にある配列を包含すると理解される。例えば、「ほぼ43ないし148の」は、44～148、45～148、46～148、等；及び、43～147、43～146、等を意味する。

30

【0033】

メタロプロテイナーゼ活性に関連した配列を含んでなるM P D ポリペプチドには、ほぼ残基1ないし622の配列番号14；ほぼ残基84ないし622の配列番号14；配列番号18；ほぼ残基1ないし701の配列番号21；配列番号22；配列番号24；ほぼ残基1ないし277の配列番号24；ほぼ残基1ないし332の配列番号25；ほぼ残基1ないし627の配列番号25；ほぼ残基1ないし215の配列番号26；ほぼ残基118ないし215の配列番号26；及び配列番号26が含まれ、本明細書では、「M P D メタロプロテイナーゼポリペプチド」と呼ぶ。

40

【0034】

M P D ポリペプチドは、A D A M ファミリーのメンバーと関連メタロプロテイナーゼ／ディスインテグリンポリペプチドに対して高度の相同性を有することが示されているので、A D A M ポリペプチド、ディスインテグリンポリペプチド、又はメタロプロテイナーゼポリペプチドの予測される機能若しくは活性を有する。従って、本発明は、配列番号1～26、及び27からなる群から選択される配列を含んでなるM P D ポリペプチドを提供する。1つの態様では、M P D ポリペプチドが、ディスインテグリン活性、メタロプロテイナー

50

ーゼ活性、又はその組合せを有する。本発明のポリペプチドが所望のディスインテグリン活性若しくはメタロプロテイナーゼ活性を有するかどうかを決定する方法は、本明細書の以下に記載の方法によりこのポリペプチドをアッセイすることによって達成され得る。

【0035】

A D A Mとマトリックスメタロプロテイナーゼ (M M P) では、例えば、H E x G H x x G x x H Dモチーフ (配列番号28) を含む、多数の保存配列が同定されている。さらに、潜在的な保存モチーフには、L N I x (I / V) (A / V) L V G L E (V / I) W Tモチーフ (配列番号29) が含まれる。例えば、配列番号4~5、10、14、21~22、及び25~26は、それぞれ、残基208ないし219、15ないし26、229ないし240、555ないし566、3ないし14、269ないし280、及び154ないし165に、配列H E x G H x x G x x H D (配列番号28) を含む。配列番号24は、保存されたH E x G H x x G x x H Dモチーフへの実質的な同一性を有する配列を含む。従って、配列番号4、5、10、14、21、22、24、25、又は26を含んでなるポリペプチドは、メタロプロテイナーゼ活性を有すると予測される。配列番号4、8、10、14、18~19、21、及び25は、L N I x (I / V) (A / V) L V G L E (V / I) W Tモチーフとの同一性を有する配列を含むので、配列番号4、8、10、14、18~19、21、又は25を含んでなるポリペプチドはメタロプロテイナーゼ活性を有すると予測される。本発明はまた、T M D C I I I、T M D C I V A、及びT M D C I V Cを含む、精巢メタロプロテイナーゼ様、ディスインテグリン様、システインリッチ (T M D C) タンパクファミリーへ高度の相同性を有する配列番号2、3、7、9、17、20、及び27を提供する。表1は、本発明の代表的なポリペプチドの、T M D Cタンパクファミリーメンバーとの相対同一性を示す。従って、本明細書では、メタロプロテイナーゼ活性、及び/又はディスインテグリン活性を有する、配列番号2、3、7、9、17、20、又は27に示されるような配列を含んでなるポリペプチド、及びその断片が提供される。

【0036】

【表1】

表1

配列	相同性	TMCファミリーメンバー
配列番号2	99%	TMDCIII
配列番号3	91%	TMDCIVC
配列番号7	85%	TMDCIVA
配列番号9	48%	TMDCIVA
配列番号17	53%	TMDCIVA
配列番号20	90%	TMDCIV
配列番号27	89%	TMDCIVA

【0037】

T M D Cファミリーメンバーへの相同性を有する上記の配列に加えて、本発明はまた、A D A M (ディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ) ファミリーのタンパク質への相同性を有するポリペプチドを提供する。そのようなポリペプチドには、メタロプロテイナーゼドメインが含まれる。好ましくは、配列番号4、10、14、21、25、及び26を含んでなるポリペプチドのメタロプロテイナーゼドメインは、ほぼ配列番号4の65ないし274；配列番号10の24ないし235；配列番号14の85ないし290；配列番号21の202ないし411；配列番号25の123ないし332；及び配列番号26の118ないし215のアミノ酸残基からの配列を含む。当業者は、それぞれのメタロプロテイナーゼドメインのN末端及びC末端残基が近似であり、このドメインの一端からの約1~10のアミノ酸の変動は本発明の範囲から逸脱しないと理解するであろう。例えば、このドメインの一端へアミノ酸を加えても、この分子の活性は変化しない可能性がある。そのような修飾の効果は、本明細書に記載の方法を使用してアッセイされ得る。配列番号2~5、7~10、14、17~19、21~22、及び24~27に示されるような

配列を含んでなるポリペプチドも、メタロプロテイナーゼ活性に加えてディスインテグリン活性を有する可能性がある。

【0038】

ディスインテグリンドメインは、典型的には、配列CGN (G/K) x (L/V) (E/D) x (G/N) EECDCG (配列番号30) (以後、「CGN-GEEC」モチーフ) を有する保存モチーフを含有するとして特徴づけられる。本発明は、CGN (G/K) x (L/V) (E/D) x (G/N) EECDCG (配列番号30) への実質的な同一性のあるモチーフを有するとして特徴づけられるディスインテグリン活性を有するポリペプチドを提供する。例えば、配列番号4、10、14、21、及び24～26はCGN-GEECモチーフを含有するので、配列番号4、10、14、21、24、25又は26を含んでなるポリペプチドは、ディスインテグリン活性を有すると予測される。配列番号11は残基43ないし57に推定CGN-GEEC配列を有するので、配列番号11を含んでなるポリペプチドはディスインテグリン活性を有すると予測される。さらに、ADAMファミリーのタンパク質は、そのディスインテグリン及びシステイン-リッチドメインに数多くの保存システイン残基を有することで特徴づけられる。例えば、配列番号6、8、12、13、16、及び23は、数多くのADAMファミリーメンバー (例、ADAM9 (受託番号: NP 003807、これは参照により本明細書に組込まれる)) と並列させると、そのようなADAMファミリーメンバーのディスインテグリンドメインにある保存システイン残基が同じ位置に並ぶ。従って、本発明はまた、ディスインテグリン活性を有する、配列番号6、8、12、13、16、及び23に示されるような配列を含んでなるポリペプチドを提供する。

10

20

【0039】

表2は、本発明のいくつかのポリペプチドのドメインを特徴づける相対的なドメイン及び残基の要約を提供する。そのような活性に対応する相対的なドメイン及び残基は、類似分子及びコンピュータアルゴリズムに基づいた推定物であり、従って、例えば、材料の供給源、使用される細胞型、使用される発現系、等を含む多数の要因に依存して、わずかに変化する可能性がある。そのような要因は当業者に明らかであり、正しく評価される。

【0040】

【表2】

表2

配列 (配列 番号)	予測されるメタロプロ テイナーゼドメインの残 基:	予測されるディスイ ンテグリンドメイン の残基:	予測される膜 貫通ドメイン の残基:	予測される細 胞質ドメイン の残基:
4	65ないし274	283ないし564	565ないし585	586ないし686
5	1ないし46			
6		1又は43ないし148		
8		1又は38ないし366		
10	1,24又は118ないし235	244ないし528	529ないし539	540ないし751
11		1ないし126		
12		1ないし121		
13		1ないし66		
14	85ないし290	299ないし622	623ないし642	643ないし660
16		1ないし60		
18	1ないし56			
19	1ないし56			
21	30又は202ないし411	420ないし710	711ないし725	726ないし812
22	1ないし38			
24	1ないし277	278ないし435		
25	123ないし332	343ないし627	628ないし645	646ないし811
26	118ないし215	224ないし383		

30

40

【0041】

さらに本発明は、配列番号15を含んでなるメタロプロテイナーゼ及び／又はディスイン

50

テグリン活性を有するポリペプチドを提供する。例えば、配列番号15は、ADAM9に対して、ADAM9のメタロプロテイナーゼドメインの直後とディスインテグリンドメインの前で相同性を有する。

【0042】

本発明のポリペプチドにはまた、図1に示される配列に対して十分であるか又は実質的な程度の同一性若しくは類似性を有するアミノ酸配列が含まれる。実質的に同一な配列は、当業者により、MPDポリペプチドと共通の構造ドメインを有する、及び／又は生物学的活性を有すると同定され得る。類似性若しくは同一性を決定する方法は、例えば、BLAST、FASTA、等のようなコンピュータアルゴリズムを利用し得る。

【0043】

2つの核酸若しくはポリペプチドの関連において「実質的に同一」という語句は、比較ウィンドウ全体で最大の対応があるように並列され、例えば、配列比較アルゴリズムによるか、又はマニュアル並列や目視検査により測定される場合に、少なくとも50%、60%、好ましくは80%、又は85%、より好ましくは90~95%、そして最も好ましくは96%、97%、98%、又は99%のヌクレオチド若しくはアミノ酸残基の同一性を有する配列を意味する。この定義はまた、試験配列が参照配列への実質的な同一性を有する場合に実質的な配列若しくはサブ配列相補性を有する、試験配列の相補体にも言及される。本明細書で使用される「比較ウィンドウ」には、20~1800、通常は約50~200、より通常は約70~150からなる群から選択される、任意数の連続位置の断片への言及が含まれ、ここでは、2つの配列を最適に並列した後で、ある配列が同一数の連続した位置の参照配列へ比較され得る。

【0044】

配列比較のためには、典型的にはある配列が参照配列として機能し、それに対して試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験及び参照の配列をコンピュータへ入力し、必要ならばサブ配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムのパラメーターを指定する。デフォルトプログラムパラメーターを使用し得るか、又は他のパラメーターを指定し得る。次いで、配列比較アルゴリズムにより、プログラムパラメーターに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列パーセント同一性が計算される。

【0045】

比較に最適な配列の並列は、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981) の局所相同性アルゴリズムにより、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970) の相同並列アルゴリズムにより、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988) の類似性検索法により、これらアルゴリズム（ウィスコンシン遺伝学ソフトウェア・パッケージ、遺伝学コンピュータ・グループ、575 Science Dr., マジソン、Wis. にある、GAP、BESTFIT、FASTA、及びTFAST）のコンピュータによる実施によるか、又はマニュアル並列及び目視検査により実施し得る。

【0046】

有用なアルゴリズムの1例は、PILEUPである。PILEUPは、進行性な対形成の並列を使用して関連した配列の群から多数の配列並列を創出し、関連性と配列パーセント同一性を示す。PILEUPは、Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35: 351 (1987) の進行的な並列法を簡略化したものを使用し、Higgins & Sharp, CABIOS 5: 151 (1989) に記載の方法に類似している。この多並列法は、2つの最も類似した配列の対形成並列から始め、2つの並列された配列のクラスターを作製する。次いで、このクラスターを、次に最も関連している配列か又は並列配列のクラスターへ並列させる。2つの配列のクラスターを、2つの個別配列の対形成並列の単純な延長により並列する。一連の進行的、対形成並列により最終の並列が達成される。例えば、参照配列を他の試験配列と比較して、以下の変数：デフォルトギャップ加重（3.00）、デフォルトギャップ長加重（0.10）、及び重

10

20

30

40

50

み付けエンドギャップを使用して、配列パーセント同一性の関連比率を決定し得る。

【0047】

配列同一性及び配列類似性の比率を決定するのに適しているもう1つのアルゴリズムの例は、Altschulet al., J. Mol. Biol. 215: 403 (1990) に記載されるようなBLASTアルゴリズムである。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information; www-ncbi.nlm.nih.gov/)を通して公的に利用可能である。このアルゴリズムは、データベース配列にある同一の長さのワードと並列させたときに、ポジティブ値の閾値スコアであるTに適合するか又はそれを満足させる、長さWの短いワードを照会(query)配列中に同定することによって、ハイスコア配列ペア(HSP)を最初に同定することを含む。Tは、近隣ワードスコア閾値と呼ばれる。この最初の近隣ワードのヒットは、それを含有するより長いHSPを見出す検索を開始するためのシードとして機能する。ワードのヒットは、それぞれの配列に沿って、累積並列スコアが増加され得るまで、両方向に拡張される。それぞれの方向でのワードヒットの拡張が中止されるのは：累積並列スコアが量Xによりその最大達成値から低下する；1つ以上のネガティブスコアの残基並列の蓄積により、累積スコアが0以下になる；又は、いずれかの配列の末端に達する場合である。BLASTプログラムでは、デフォルトとして、ワード長(W)11のBLOSUM62スコアリング・マトリックス(Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915, 1989を参照のこと)並列(B)の50、期待値(E)の10、M=5、N=-4、及び両鎖の比較が使用される。BLASTアルゴリズムにより提供される類似性の1つの測定値は、最小確率量(P(N))であり、これは2つのヌクレオチド若しくはアミノ酸配列間の適合が偶然に生じる確率値を提供する。例えば、あるテスト核酸の参照核酸との比較における最小確率量が約0.2未満、より好ましくは約0.01未満、そして最も好ましくは約0.001未満であれば、この核酸は参照核酸に類似しているとみなされる。

10

20

30

40

【0048】

あるいは、2つのアミノ酸又は2つの核酸配列のパーセント同一性は、Devereux et al. (Nucl. Acids Res. 12: 387, 1984)により記載され、ウィスコンシン大学、遺伝学コンピュータ・グループから入手可能な、GAPコンピュータ・プログラム、バージョン6.0を使用して配列情報を比較することによって決定され得る。GAPプログラムの好ましいデフォルト変数には：(1)ヌクレオチドの(同一物について1、非同一物について0の値を含む)単一(unary)比較マトリックスと、Schwartz and Dayhoff 編『ポリペプチドの配列及び構造のアトラス(Atlas of Polypeptide Sequence and Structure)』国立バイオ医学研究財団、353-358頁、1979により記載されるような、Gribnikov and Burgess, Nucl. Acids Res. 14: 6745, 1986の重み付け比較マトリックス；(2)各ギャップについて3.0のペナルティと各ギャップ中の各記号について追加の0.10ペナルティ；及び(3)エンドギャップへのノーペナルティが含まれる。

【0049】

当業者は、コードされる配列中の単一アミノ酸、又は少ないパーセントのアミノ酸を変化させる、付加する、又は欠失させる、核酸配列、ペプチド、又はポリペプチド配列への個々の置換、欠失、又は追加が、この変化が実質的に同一な生物学的活性(例えば、ディスインテグリン及び/又はメタロプロテイナーゼ活性)を有する分子をもたらす、「保守的に修飾された変異体」であることを理解されよう。例えば、あるアミノ酸の、化学的に類似したアミノ酸での置換をもたらす変化は、保守的に修飾された変異体である。機能的に類似したアミノ酸を提供する保守的な置換の表は、当技術分野で知られている。以下の6つの群は、お互いに保守的な置換であるアミノ酸をそれぞれ含有する：1)アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)；2)アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)

50

； 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)； 4) アルギニン (R)、リジン (K)； 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；及び 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W) (例えば、C r e i g h t o n, 『タンパク質 (P r o t e i n s)』 (1984) を参照のこと)。

【0050】

2つのポリヌクレオチド若しくはポリペプチドが実質的に同一であることの1つの明示は、第一のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが、第二のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドに対して産生される抗体と免疫学的に交差反応するということである。2つのポリヌクレオチドが実質的に同一であることのもう1つの明示は、2つの分子又はその相補体がストリンジェント条件の下で互いにハイブリダイズすること 10

【0051】

任意のタイプの変化 (例、アミノ酸の挿入、欠失、又は置換；ポリペプチドのグリコシ化状態の変化；その三次元構造若しくは自己会合状態を変化させるリフォールディング又は異性化；及び、他のポリペプチド若しくは分子とのその会合への変化) により本発明の M P D ポリペプチドから誘導されるポリペプチドも本発明により含まれる。従って、本発明により提供されるポリペプチドには、図1に示されるものに類似したアミノ酸配列により特徴付けられるが、種々の修飾が天然で提供されているか又は意図的に工学処理されているポリペプチドが含まれる。ディスインテグリン活性及び／又はメタロプロテイナーゼ 20 活性を有する、配列番号1～26、又は27に示されるような配列を含んでなるポリペプチドと生物学的活性を共有するポリペプチドが本発明に含まれる。

【0052】

本発明には、インテグリン結合活性、内皮細胞遊走の阻害、及び血管新生の阻害からなる群から選択される少なくとも1つの活性を保持する、様々な形態の M P D ディスインテグリンポリペプチド若しくはドメインの使用が含まれる。M P D ディスインテグリンポリペプチド／ドメイン (M P D d i s) とは、ディスインテグリン活性を有する本発明の M P D ポリペプチドの全部若しくは一部を含んでなるポリペプチドを包含するものである。好ましい態様では、M P D d i s は、(システインーリッチ領域のような) 他のドメインを有するか又は有さない、M P D ディスインテグリンドメインの全部若しくは一部、並びに、限定されないが、(a) 断片、(b) 変異体、(c) 誘導体、(d) 融合ポリペプチド 30、及び (e) 多量体の形態 (マルチマー) を含む、関連した形態を含有する。インテグリン結合、内皮細胞遊走、及び／又は血管新生の阻害を阻害する、これら関連した形態の能力は、以下に例示されるような方法を使用するか又は当技術分野で知られている他のアッセイを使用することによって、i n v i t r o 若しくは i n v i v o で決定され得る。

【0053】

当業者は、本明細書に記載の方法を使用して活性を容易にアッセイし得る。そのような方法は、例えば、A D A M ファミリーのポリペプチドのメンバーにより示される、限定されないが細胞接着を含む、メタロプロテイナーゼ活性、ディスインテグリン活性、又は生物学的活性を測定する。例えば、M P D 活性 (例、メタロプロテイナーゼ活性及び／又はディ 40 スインテグリン活性) を中和する抗 M P D 抗体は、注目するポリペプチドに抗 M P D 抗体を接触させ、この注目するポリペプチドに関連した活性が中和されるかどうかを決定することによって、類似ポリペプチドをアッセイするために使用され得る。さらに、本発明の M P D ポリペプチドへ特異的に結合する抗体が、別の注目するポリペプチドと交差反応することは、この注目するポリペプチドが本発明の M P D ポリペプチドと構造上の特徴 (例、一次、二次、又は三次のタンパク特徴) を共有することを示す。

【0054】

本発明は、完全長で成熟した形態の M P D ポリペプチドを提供する。完全長ポリペプチドとは、最初に翻訳されるポリペプチドの完全な一次アミノ酸配列を有するものである。完全長ポリペプチドのアミノ酸配列は、例えば、c D N A 分子の完全オープンリーディング 50

フレーム（「ORF」）の翻訳により得ることができる。多数のmRNA形態が、選択的スプライシングか又は多数の翻訳開始部位の使用によりその座から産生される場合に、いくつかの完全長ポリペプチドが単一の遺伝子座によりコードしていてもよい。ポリペプチドの「成熟形態」は、あるとすれば、例えば、シグナル配列の切断、又はプロドメインを除去するタンパク分解的な切断のような、翻訳後のプロセッシング工程を受けたポリペプチドを意味する。特定の完全長ポリペプチドの多数の成熟形態が、例えば、シグナル配列の不正確な切断か、又はそのポリペプチドを切断するプロテアーゼの差次的調節により産生され得る。そのようなポリペプチドの成熟形態は、好適な哺乳動物細胞か又は他の宿主細胞における、完全長ポリペプチドをコードするポリペプチドの発現により入手され得る。成熟形態のポリペプチドの配列はまた、シグナル配列又はプロテアーゼ切断部位の同定を介した完全長形態のアミノ酸配列から決定可能であり得る。本発明のMPDポリペプチドにはまた、先端切れであるが生物学的に活性なポリペプチド、例えば、天然に存在する可溶性のポリペプチドを産生し得る、選択的mRNAプロセッシングのような、転写後か又は翻訳後のプロセッシング事象から生じるポリペプチドも含まれる。本発明にまた含まれるのは、ポリペプチドに由来する1つ以上の末端アミノ酸（一般に、1～5の末端アミノ酸）のタンパク分解的な除去による、異なるタイプの宿主細胞における発現時のN若しくはC末端の違いといった、タンパク分解に起因する変異である。

10

【0055】

本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドを発現させるのに適した培養条件の下で、形質転換されたか又は組換えの宿主細胞を培養することによって製造され得る。次いで、生じた発現されたポリペプチドは、ゲル濾過やイオン交換クロマトグラフィーのような、既知の精製法を使用して、そのような培養物から精製され得る。ポリペプチドの精製にはまた、ポリペプチドへ結合する剤を含有するアフィニティーカラム、つまり、コンカナバリンA-アガロース、ヘパリン-t o y o p e a r l（登録商標）、又はC i b a c r o mブルー3GAセファロース（登録商標）のようなアフィニティー樹脂上での1回以上のカラム工程；フェニルエーテル、ブチルエーテル、又はプロピルエーテルのような樹脂を使用する、疎水相互作用クロマトグラフィーを含む1回以上の工程；又はイムノアフィニティークロマトグラフィーも含まれ得る。他のやり方では、本発明のポリペプチドはまた、精製を促進する形態で発現され得る。例えば、それは、例えばマルトース結合ポリペプチド（MBP）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、又はチオレドキシン（TRX）へ結合した融合ポリペプチドとして発現され得る。そのような融合ポリペプチドの発現及び精製のキットは、それぞれ、ニューイングランド・バイオラボ（ベヴァリー、MA）、ファルマシア（ピスカタウェイ、NJ）、及びインビトロゲン（I n V i t r o g e n）から市販されている。ポリペプチドはまたエピトープのタグを付けた後で、そのようなエピトープへ向けられた特異抗体を使用して精製され得る。1つのそのようなエピトープ（「Flag」）は、コダック（ニューヘーヴン、Conn.）から市販されている。最後に、疎水性のRP-HPLC媒体、例えば、ペンダントメチル又は他の脂肪族基を有するシリカゲルを利用する1回以上の逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）工程が、ポリペプチドをさらに精製するために利用され得る。上記精製工程のいくつか又は全部はまた、様々に組合せて利用され、実質的に均質な組換えポリペプチドを提供し得る。このようにして精製されたポリペプチドは他の哺乳動物のポリペプチドから実質的にフリーであり、本発明により、「実質的に精製されたポリペプチド」と定義されるが、そのような精製されたポリペプチドには、MPDポリペプチド、断片、変異体、等へ特異的に結合する抗体が含まれる。本発明のポリペプチドはまた、トランスジェニック動物の産物として、例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する体細胞若しくは生殖細胞により特徴づけられる、トランスジェニックのウシ、ヤギ、ブタ、又はヒツジのミルクの成分として発現される場合がある。

20

30

40

【0056】

発現されるポリペプチドをアフィニティー精製するには、本発明のポリペプチドに対して産生されるモノクローナル抗体のようなアフィニティーカラムを利用することも可能であ

50

る。これらのポリペプチドは、アフィニティーカラムから、慣用技術、例えば高塩の溶出緩衝液中からより低塩の緩衝液を使用して透析するか、又は利用するアフィニティーマトリックスに依存して、pH又は他の要因を変えることによって除去され得るか、又は、本発明から誘導されるポリペプチドのような、アフィニティー部分の天然に存在する基質を使用して競合的に除去され得る。本発明のこの側面では、本発明のポリペプチドへ結合するタンパク質（例、本発明の抗MPD抗体）が、本発明のポリペプチドをその表面上で発現させる細胞を同定し、分離し、又は精製するのに適した固形支持体又は類似の基質へ結合され得る。例えば、本発明の抗MPD抗体の固形支持体表面への付着は、任意の方法により達成され得て、例えば、磁気マイクロスフェアをこれらのポリペプチド結合タンパク質でコートして、磁場によりインキュベーション容器中に固定し得る。そのようなポリペプチド結合タンパク質をその上に有する固相に細胞混合物の懸濁液を接触させる。抗MPD抗体は、本発明のポリペプチド（例、MPDの細胞外ドメイン）をその表面上に有する細胞に結合する。非結合細胞（例、MPDポリペプチドを欠く細胞）は、結合した細胞から洗浄除去される。このアフィニティー結合法は、そのようなポリペプチド発現細胞を溶液から精製する、スクリーニングする、又は分離するのに有用である。ポジティブに選択された細胞を固相から遊離する方法は当技術分野で知られていて、例えば、酵素の使用が含まれる。そのような酵素は、好ましくは、細胞に対して無毒で非損傷性であり、好ましくは、細胞表面結合パートナーを切断するものに向けられる。他のやり方では、本発明のポリペプチド発現細胞を含有することが疑われる細胞の混合物が、最初に、本発明のビオチニル化結合ポリペプチドとインキュベートされる。インキュベーション時間は、典型的には、本発明のポリペプチドへの十分な結合を確実にするために、少なくとも1時間である。次いで、生じた混合物をアビジン被覆ビーズ充填カラムに通し、それにより、アビジンへのビオチンの高アフィニティーにより、細胞のビーズへの結合が提供される。アビジン被覆ビーズの使用は当技術分野で知られている（Berenson, et al., J. Cell. Biochem., 10D: 239, 1986を参照のこと）。未結合材料の洗浄と結合細胞の遊離は、従来法を使用して実施される。

【0057】

本発明のポリペプチドはまた、既知の慣用的な化学合成により生成され得る。本発明のポリペプチドを合成法により構築する方法は、当業者に知られている。合成的に構築されたポリペプチド配列は、天然のポリペプチドと一次、二次又は三次構造、及び／又はコンホメーション特性を共有することによって、生物学的活性を含む生物学的特性をそれと共通して保有する可能性がある。このように、合成されたポリペプチドは、天然の精製されたポリペプチドの生物学的に活性であるか又は免疫学的な代替品として、治療化合物のスクリーニング、及び抗体開発の免疫学的方法に利用され得る。

【0058】

所望される純度の程度は、ポリペプチドの意図される使用に依存する。例えば、ポリペプチドが *in vivo* で投与される場合には、比較的高い程度の純度が所望される。そのような場合、他のポリペプチドに相当するポリペプチドのバンドがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）による分析では検出され得ないように、ポリペプチドが精製される。関連分野の当業者には、差次的グリコシル化、差次的な翻訳後プロセス、等により、このポリペプチドに対応する多数のバンドがSDS-PAGEにより視覚化されることが理解されよう。最も好ましくは、本発明のポリペプチドは、SDS-PAGEによる分析で単一のポリペプチドバンドにより示されるような、実質的な均質性にまで精製される。このポリペプチドバンドは、銀染色、クマッシュブルー染色、又は（ポリペプチドが放射標識されている場合は）オートラジオグラフィーにより視覚化され得る。

【0059】

MPDポリペプチドとこのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの種相同体（species homologue）も本発明により提供される。本明細書で使用されるように、「種相同体」は、ある一定のポリペプチド若しくはポリヌクレオチドの種とは異な

る起源の種であるが、そのポリペプチド若しくはポリヌクレオチドへの有意な配列類似性を有するポリペプチド若しくはポリヌクレオチドのことである。種相同体は、本明細書に提供されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド由来の好適なプローブ若しくはプライマーを作り、所望の種由来の好適な核酸源をスクリーニングすることによって単離され、同定され得る。他のやり方では、相同体は、本発明のMPDの配列（例、核酸若しくはアミノ酸の配列）を利用して、1つ以上の種由来の配列を含有するゲノムデータベースをスクリーニングすることによって同定され得る。そのようなゲノムデータベースは、数多くの種について（例えば、`tigr.org/tdb`; `genetics.wisc.edu`; `stanford.edu/~ball`; `hiv-web.lanl.gov`; `ncbi.nlm.nih.gov`; `ebi.ac.uk`; 及び `pasteur.fr/other/biology` のワールドワイドウェブ（www）上で）容易に利用可能である。本発明にはまた、そのアミノ酸若しくはヌクレオチド配列における違いが遺伝的多型性に起因する、天然に存在するそのようなポリペプチド及びポリヌクレオチドの代替的な形態である、MPDポリペプチドのアリル変異体（`allelic variant`）とそれをコードしている核酸が含まれる。

【0060】

中間配列検索（`Intermediate Sequence Search`）（ISS）は、2つのタンパク質を1つ以上の中間配列により連結させることによって、ごく近縁な相同体だけでなく遠縁の相同体も同定するために使用され得る。ISSは、かつての照会の結果を新たな検索のシーズとして繰り返し使用する。飽和（`saturated`）BLASTは、ISSを実行するパッケージである。タンパク配列から開始して、飽和BLASTは、BLAST検索を実行し、次世代の検索を代表する配列を同定する。この方法は、収束までか、又はある前定義された判定基準が満たされるまで実行される。飽和BLASTは、`bioinformatics.burnham-inst.org/xblast` のワールドワイドウェブ（www）で利用可能である（`Li et al. Bioinformatics 16 (12): 1105, 2000` も参照のこと）。

【0061】

本発明のMPDポリペプチドの断片が本発明に含まれ、線状の形態であるか、又は既知の方法を使用して環状化され得る（例えば、`H. U. Saragovi, et al., Bio/Technology 10, 773 (1992)`; 及び `R. S. McDowell, et al., J. Amer. Chem. Soc. 114: 9245 (1992)` を参照のこと、これらはいずれも参照により本明細書に組込まれる）。本発明のMPDポリペプチドのペプチド断片と、そのような断片をコードするポリヌクレオチドには、MPDポリペプチド若しくはポリヌクレオチドの長さの少なくとも25%（より好ましくは、少なくとも50%、60%、又は70%であり、最も好ましくは少なくとも80%）である、アミノ酸若しくはヌクレオチド配列の長さが含まれる。好ましくは、そのような配列は、重複部分及び同一性を最大化する一方で、配列ギャップを最小化するように並列させるときに、MPDポリペプチド若しくはポリヌクレオチドと少なくとも60%（より好ましくは少なくとも70%～75%、80%～85%、90%～95%、少なくとも97%～97.5%、又は少なくとも99%、そして最も好ましくは少なくとも99.5%）の配列同一性を有する。また本発明に含まれるのは、好ましくは少なくとも8～10、又はより好ましくは少なくとも20、又はなおより好ましくは少なくとも30、又は最も好ましくは少なくとも40の連続したアミノ酸を含んでなるセグメントを含有するか又はコードする、ポリペプチド、ペプチド断片、及び、そのような断片をコードするポリヌクレオチドである。そのようなポリペプチド及び断片はまた、重複部分及び同一性を最大化する一方で、配列ギャップを最小化するように並列させるときに、例えばADAMファミリーポリペプチドのいずれかのそのようなセグメントと少なくとも70%（少なくとも75%、80%～85%、90%～95%、少なくとも97%～97.5%、又は少なくとも99%、そして最も好ましくは少なくとも99.5%）を共有するセグメントを含有し得る。目視検査、数的計算、又はコンピュータアルゴリズムによりパーセント

同一性を計算し得る。

【0062】

本発明はまた、MPDポリペプチドのある断片若しくはドメインを含んでなる、このペプチドの可溶形態を提供する。ディスインテグリン活性を有する可溶性断片は、特に注目される。例えば、（上記に論じられるような）高度に保存されたCGN-GEEC配列から始まるが、膜貫通領域（例えば、表2を参照のこと）を欠くアミノ酸である。膜貫通領域は、公的に利用可能なコンピュータアルゴリズムを使用して同定され得る。他の可溶形態には、残基1ないし43のアミノ酸で始まり148までを含む配列番号6；残基1ないし38のアミノ酸で始まり366までを含む配列番号8；配列番号11；配列番号13；残基1ないし84のアミノ酸で始まり622までを含む配列番号14；残基1ないし299
10
のアミノ酸で始まり622までを含む配列番号14；配列番号16；ほぼ残基1ないし701の配列番号21；配列番号23；残基1ないし278のアミノ酸で始まり435までを含む配列番号24；ほぼ残基1ないし627の配列番号25；及び、残基1ないし224のアミノ酸で始まり383までを含む配列番号26を含んでなるポリペプチドが含まれる。そのようなポリペプチドは、それが発現される細胞から分泌され得る。本発明のポリペプチドの細胞内及び膜貫通ドメインは、そのようなドメインを配列情報から決定するための既知技術に従って同定され得る。例えば、本発明のポリペプチド配列を、既知のドメインを有するADAMファミリーポリペプチドの他のメンバーと並列することにより、本発明のポリペプチドのドメインに関する情報が提供される。当業者は、特定ドメインの配列の範囲内でのわずかな修飾がこの分子の生物学的活性に影響を及ぼすことなくし得る
20
ことを理解されよう。従って、特定ドメインのどの方向でも、同定された配列における1、2、3、4、又は5～10のアミノ酸の変化は、本発明により含まれる。

【0063】

本発明のもう1つの側面では、ポリペプチドは、メタロプロテイナーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、又は細胞質ドメインのような、ADAMポリペプチドドメインの様々な組合せを含み得る。従って、本発明のポリペプチドとポリヌクレオチドには、メタロプロテイナーゼドメインのようなドメインの2つ以上のコピー、ディスインテグリンドメインのようなドメインの2つ以上のドメイン、又はそれぞれのドメインの少なくとも1つを含んでなるか又はコードするものが含まれ、これらのドメインは、そのようなポリペプチド内で任意の順序で提示され得る。また含まれるのは、組換えポリペプチドとそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、ここでこの組換えポリペプチドは、「キメラポリペプチド」若しくは「融合ポリペプチド」であって、第二のポリペプチドへ機能的に連結した、配列番号1～26又は27に示されるようなMPD配列を含む。第二のポリペプチドは、MPDポリペプチドの機能とは無関係であるか又はそれに関連している活性若しくは機能を有する、注目される任意のポリペプチドであり得る。例えば、第二のポリペプチドは、例えば、ADAMポリペプチドの細胞外、細胞質、メタロプロテイナーゼ、又は膜貫通ドメインのような、ADAMファミリーのポリペプチドに関連しているが異なるメンバーのドメインであり得る。「機能的に連結している」という用語は、MPD配列と第二のポリペプチド配列が互いに正しいフレームで融合していることを示すものである。第二のポリペプチドは、図1に示されるようなMPD配列のN末端若しくはC末端
40
へ融合され得る。例えば、1つの態様では、融合ポリペプチドは、MPD配列がGST配列のC末端へ融合している、GST-MPD融合ポリペプチドである。そのような融合ポリペプチドは、組換えMPD配列の精製を促進し得る。もう1つの態様では、融合ポリペプチドは、そのN末端に異種シグナル配列を含んでなるMPD配列である。ある種の宿主細胞（例、哺乳動物宿主細胞）では、MPDポリペプチドの発現及び／又は分泌が異種シグナル配列の使用により増加され得る。もう1つの例として、MPDポリペプチド又はその断片は、細菌で発現されるタンパク質の精製を促進するヘキサヒスチジン・タグか、又は真核細胞で発現されるタンパク質の精製を促進する赤血球凝集素タグへ融合され得る。さらに、融合ポリペプチドは、例えば、米国特許第5,011,912号とHopp et al., Bio/Technology 6: 1204, 1988に記載される、
50

ポリ-His又は抗原同定ペプチドを含み得る。1つのそのようなペプチドはFLAG（登録商標）ペプチドであり、これは、きわめて抗原性があり、特異モノクローナル抗体により不可逆的に結合されるエピトープを提供し、発現される組換えポリペプチドの迅速なアッセイと容易な精製を可能にする。参照により本明細書に組込まれる、米国特許第5,011,912号に記載されるように、4E11と命名されたマウスハイブリドーマは、ある種の二価金属カチオンの存在下で、FLAG（登録商標）ペプチドへ結合するモノクローナル抗体を産生する。4E11ハイブリドーマ細胞系は、受託番号HB9295の下でATCCに寄託されている。FLAG（登録商標）ペプチドへ結合するモノクローナル抗体は、イーストマンコダック社、イメージングシステム部門、ニューヘーヴン、コネティカットから入手可能である。

10

【0064】

本発明に含まれるのは、MPDポリペプチドを含む、オリゴマー又は融合ポリペプチドである。融合パートナーとして使用され得るオリゴマーは、二量体、三量体又はより高次のオリゴマーを含む、共有結合しているか、又は非共有結合している多量体の形態であり得る。本発明の1つの側面では、オリゴマーはポリペプチド成分の結合活性若しくは触媒活性を維持し、それへ二価、三価、等の結合若しくは触媒の部位を提供する。別の態様では、本発明は、ポリペプチドへ融合したペプチド部分間の共有若しくは非共有性の相互作用を介して連結した多数のポリペプチドを含んでなるオリゴマーへ向けられる。そのようなペプチドは、ペプチドリンカー（スパーサー）、又はオリゴマー化を促進する特性を有するペプチドであり得る。ロイシンジッパーと抗体から誘導されるある種のポリペプチドは、以下により詳しく記載されるように、それに付いたポリペプチドのオリゴマー化を促進し得るペプチドの1つである。

20

【0065】

典型的には、リンカーは、ペプチドリンカー部分である。リンカー部分の長さは、MPD配列を含んでなるポリペプチドの生物学的活性を最適化するように選択され、不適当な実験をせずに経験的に決定され得る。リンカー部分は、MPDポリペプチドが基質若しくはリガンドと自由に相互作用することを可能にするほど長くて柔軟であるべきである。好ましいリンカー部分は、約1～30のアミノ酸残基の長さ、好ましくは約2～15のアミノ酸残基のペプチドである。好ましいリンカー部分は、-Gly-Gly-、GGGS（配列番号31）、(GGGS)_n（配列番号32）、GKSSGSGSESKS（配列番号33）、GSTSGSGKSSSEKKG（配列番号34）、GSTSGSGKSSSEGSSTKG（配列番号35）、GSTSGSGKPGSGEGSTKG（配列番号36）、又はEGKSSGSGSESEKEF（配列番号37）である。連結部分については、例えば、Huston, J. S., et al., PNAS 85: 5879 (1988)、Whitlow, M., et al., Protein Engineering 6: 989 (1993)、及びNewton, D. L., et al., Biochemistry 35: 545 (1996)に記載されている。他の好適なペプチドリンカーは、参照により本明細書に組込まれる、米国特許第4,751,180号及び4,935,233号に記載されるものである。所望されるペプチドリンカーをコードするDNA配列は、好適な従来技術を使用して、MPDポリペプチド又はその断片をコードするDNA配列の中に、それと同じリーディングフレームで、挿入され得る。例えば、このリンカーをコードする化学合成されたオリゴヌクレオチドが配列中で連結され得る。特定の態様では、融合ポリペプチドは、ペプチドリンカーにより分離された、2～4の可溶性MPDポリペプチドを含む。

30

40

【0066】

MPDポリペプチドの変異体が膜貫通（membrane-spanning）ドメインを包含するように構築される態様では、それらはI型膜ポリペプチドを形成する。そのような態様では、融合パートナーをMPDポリペプチドのC末端へ連結させることが好ましい。他のやり方では、膜貫通ポリペプチドは、リガンドも知られている既知の細胞外受容体ドメインポリペプチドと融合され得る。次いで、そのような融合ポリペプチドは、結合

50

したMPDポリペプチドにより誘発される細胞内シグナル伝達経路を制御するように操作され得る。細胞膜全体に及ぶポリペプチドはまた、細胞表面受容体のアゴニスト若しくはアンタゴニスト、又は細胞接着分子と融合して、MPDの細胞内効果をさらに変調し得る。本発明のもう1つの側面では、好ましいMPDポリペプチド断片と他の融合ポリペプチドドメインとの間にインターロイキンを位置づけることができる。

【0067】

本発明のMPDポリペプチドにはまた、適正なオルガネラ標的指向シグナル又は局在化宿主タンパク質への融合により、ポリペプチドを特定の細胞部位へ向ける局在化配列が含まれ得る。局在化配列、又はシグナル配列をコードするポリヌクレオチドは、MPDポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの5'末端で連結又は融合され得るので、生じる融合ポリヌクレオチド/ポリペプチドのアミノ末端にシグナルペプチドが位置づけられる。真核生物では、シグナルペプチドは、小胞体を通してポリペプチドを輸送するように機能する。次いで、この分泌タンパク質は、ゴルジ装置を通して分泌小胞へ、そして細胞外スペース、又は外部環境へ輸送される。シグナルペプチドには、タンパク分解酵素の認識部位を含有するプレプロ (pre-pro) ペプチドが含まれる。

10

【0068】

局在化配列は、核-、小胞体-、ペルオキシソーム-、又はミトコンドリアの局在化配列、又は局在化タンパク質であり得る。局在化配列は、例えば、ストライヤー、L. 『生化学 (Biochemistry)』 W. H. フリーマン (1995) の35章「タンパク質の標的指向 (Protein Targeting)」に記載される、標的指向配列で

20

【0069】

もう1つの態様では、本発明のポリペプチド又はその断片は、ポリペプチド結合部位の結合価を増やすことを含む、多種多様な目的のために、免疫グロブリンのような担体分子へ融合され得る。1例として、このポリペプチドの断片は、リンカー配列を介して、免疫グロブリンのFc部分へ融合され得る。ポリペプチドの二価形態では、そのような融合がIgG分子のFc部分へなされ得る。他の免疫グロブリンのアイソタイプもそのような融合物を産生するために使用され得る。例えば、ポリペプチド-IgM融合物ならば、本発明のポリペプチドの十価形態を産生するだろう。1つの態様では、本発明は、Fcポリペプチドドメインと、MPDポリペプチド配列 (残基1ないし43のアミノ酸で始まり148までを含む配列番号6; 残基1ないし38のアミノ酸で始まり366までを含む配列番号8; 配列番号11; 配列番号13; 残基1ないし84のアミノ酸で始まり622までを含む配列番号14; 残基1ないし299のアミノ酸で始まり622までを含む配列番号14; 配列番号16; ほぼ残基1ないし701の配列番号21; 配列番号23; 残基1ないし278のアミノ酸で始まり435までを含む配列番号24; ほぼ残基1ないし627の配列番号25; 及び、残基1ないし224のアミノ酸で始まり383までを含む配列番号26) を有する融合ポリペプチドを提供する。

30

40

【0070】

本明細書で使用される「Fcポリペプチド」という用語には、Fc領域のCHドメインのいずれか又は全部を含んでなる、抗体のFc領域から構成される、ネーティブ及びムテインの形態のポリペプチドが含まれる。二量体化を促進するヒンジ領域を含有する、そのようなポリペプチドの先端切れ形態 (truncated form) も含まれる。好ましいポリペプチドは、ヒトIgG1抗体から誘導されるFcポリペプチドを含む。1つの代替物として、免疫グロブリンから誘導されるポリペプチドを使用して、オリゴマーが製造される。抗体から誘導されたポリペプチドの様々な部分 (Fcドメインを含む) へ融合し

50

たある種の異種ポリペプチドを含んでなる融合ポリペプチドの製造は、例えば、Ashkenazi et al. (PNAS USA 88: 10535, 1991); Byrnet al. (Nature 344: 677, 1990); 及び Hollenbaugh and Aruffo (『免疫グロブリン融合ポリペプチドの構築 (Construction of Immunoglobulin Fusion Polypeptides)』Current Protocols in Immunology, 補遺4、10. 19. 1-10. 19. 11 頁、1992)に記載されている。免疫グロブリンをベースとするオリゴマーの製造及び使用の方法は当技術分野で知られている。本発明の1つの態様は、本発明のポリペプチドを、抗体から誘導されるFcポリペプチドへ融合することによって作成される2つの融合ポリペプチドを含んでなる二量体へ向けられる。ポリペプチド/Fc融合ポリペプチドをコードする融合遺伝子を適正な発現ベクターへ挿入する。ポリペプチド/Fc融合ポリペプチドは、組換え発現ベクターか、又は融合ポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドで形質転換されたか又はトランスフェクトされた宿主細胞において発現され、抗体分子のように組立てられ、そのときに、鎖間ジスルフィド結合がFc部分間で形成され、二価分子を産生する。PCT出願WO93/10151 (参照により本明細書に組込まれる)に記載される、1つの好適なFcポリペプチドは、ヒトIgG1抗体のN末端ヒンジ領域からFc領域のネーティブC末端へ広がる単鎖ポリペプチドである。もう1つの有用なFcポリペプチドは、参照により本明細書に組込まれる米国特許第5,457,035号と Baum et al., (EMBO J. 13: 3992, 1994)に記載されるFcムテインである。このムテインのアミノ酸配列は、アミノ酸19がLeuからAlaへ変化し、アミノ酸20がLeuからGluへ変化し、アミノ酸22がGlyからAlaへ変化していることを除けば、WO93/10151に示される天然Fc配列のそれと同一である。このムテインは、Fc受容体への低下したアフィニティーを示す。Fc部分 (及びそれから形成されるオリゴマー)を含んでなる、上記の融合ポリペプチドは、ポリペプチドA若しくはポリペプチドGのカラムでのアフィニティークロマトグラフィーによる容易な精製の利点を提供する。他の態様では、本発明のポリペプチドは、抗体の重(H)鎖若しくは軽(L)鎖の可変部分で置換され得る。融合ポリペプチドが抗体の重鎖と軽鎖の両方で行われる場合、4つものMPDポリペプチド又はその断片を有するオリゴマーを形成することが可能である。

10

20

30

【0071】

本発明のオリゴマーを製造するためのもう1つの方法は、ロイシンジッパーの使用を伴う。ロイシンジッパードメインとは、それが見出されルポリペプチドのオリゴマー化 (二量体又は三量体)を促進するペプチドである。ロイシンジッパーは、当初いくつかのDNA結合ポリペプチドにおいて同定され (Landschulz et al., Science 240: 1759, 1988)、以来、多種多様な異なるポリペプチドに見出されてきた。ジッパードメインは、しばしば4若しくは5のロイシン残基が他のアミノ酸とともに分散している反復性の七個のリピートを含む。

【0072】

本発明のキメラ若しくは融合ポリペプチドは、標準的な組換えDNA技術により産生され得る。1つの態様では、様々なポリペプチド配列についてコードするポリヌクレオチド断片が、例えば、平滑末端化若しくは付着末端化した末端の連結、適正な末端を提供するための制限酵素消化、付着末端の適宜埋め込み、望まれない結合を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、及び酵素的連結を利用することによって、慣用技術に従ってインフレーションと一緒に連結される。もう1つの態様では、自動化DNA合成機を含む慣用技術により融合遺伝子が合成され得る。他のやり方では、2つの連続遺伝子断片間の相補的な重複部分 (overhangs)を生じるアンカープライマー (これは、その後アニールされて再増幅され得て、キメラ遺伝子配列を産生する)を使用して、遺伝子断片のPCR増幅を行うことができる (例えば、『分子生物学の最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)』Ausubel et al. 編、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ: 1992を参照のこと)。さらに、すで

40

50

に融合部分（例えば、G S T ポリペプチド）をコードする多くの発現ベクターが市販されている。

【0073】

さらに本発明には、関連した天然パターンのグリコシル化を伴うか又は伴わないポリペプチドが含まれる。酵母若しくは哺乳動物の発現系（例、C O S - 1 若しくはC H O 細胞）で発現されるポリペプチドは、発現系の選択に依存して、分子量とグリコシル化のパターンにおいて、天然ポリペプチドに類似しているか、又はそれから有意に異なり得る。大腸菌のような細菌発現系における本発明のポリペプチドの発現は、非グリコシル化分子を提供する。さらに、ある製法では、多数の差次的にグリコシル化されたポリペプチドの分子種が含まれ得る。グリコシル基は、従来法、特にグリコペプチダーゼを利用する方法により除去され得る。

10

【0074】

もう1つの態様では、ポリペプチド若しくはポリヌクレオチドの修飾が既知の技術を使用してなし得る。ポリペプチド配列中での注目すべき修飾には、コード配列中にある選択されたアミノ酸残基の変更、置換（s u b s t i t u t i o n）、置き換え（r e p l a c e m e n t）、挿入、又は欠失が含まれ得る。例えば、1つ以上のシステイン残基が欠失されるか、又は別のアミノ酸に置換されて、分子のコンホメーションを変化させる場合があり、これは、折り畳み又は再生のときに不正確な分子内ジスルフィド結合の形成を防ぐことを伴う可能性がある変化である。そのような変更、置換、置き換え、挿入、又は欠失の技術は当業者に知られている（例えば、米国特許第4, 518, 584号を参照のこと）。もう1つの例として、ポリペプチドの細胞外ドメイン中のN-グリコシル化部位はグリコシル化を排除するように修飾して、哺乳動物及び酵母の発現系において、炭水化物が低減した類似体の発現を可能にしてもよい。真核ポリペプチド中のN-グリコシル化部位は、アミノ酸の三つ組、A s n - X - Y（ここで、Xは、P r oを除く任意のアミノ酸であり、Yは、S e r又はT h rである）により特徴づけられる。これらの三つ組をコードするヌクレオチド配列への適正な置換、追加、又は欠失は、炭水化物残基のA s n側鎖での結合の防止をもたらす。例えば、A s nを異なるアミノ酸に置き換えるように選択される、単一ヌクレオチドの変更は、N-グリコシル化部位を不活性化するのに十分である。他のやり方では、S e r又はT h rを、A l aのような別のアミノ酸に置き換えることができる。ポリペプチド中のN-グリコシル化部位を不活性化するための既知の方法には、参照により本明細書に組込まれる、米国特許第5, 071, 972号とE P 276, 856号に記載されるものが含まれる。

20

30

【0075】

本発明の範囲内にある追加の変異体には、グリコシル基、脂質、リン酸、アセチル基、等のような他の化学部分との共有若しくは集合コンジュゲートを形成することによって、その誘導体を作成するように修飾され得るポリペプチドが含まれる。共有誘導体は、ポリペプチドのアミノ酸側鎖上の官能基、又はそのN末端若しくはC末端へ化学部分を連結させることによって製造され得る。（検出可能な）診断用剤又は治療用剤をそれに付けて含んでなるコンジュゲートが本明細書で考慮される。好ましくは、そのような変更、置換、置き換え、挿入、又は欠失は、ポリペプチドの所望される活性を保持する。

40

【0076】

本発明はまた、M P D ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。「ポリヌクレオチド」という用語は、少なくとも10塩基の長さであるヌクレオチドのポリマー形態を意味する。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、又は両タイプのヌクレオチドの修飾された形態であり得る。この用語には、D N A若しくはR N Aの一本鎖及び二本鎖の形態が含まれる。D N Aには、例えば、c D N A、ゲノムD N A、化学合成されたD N A、P C Rにより増幅されたD N A、及びそれらの組合せが含まれる。本発明のポリヌクレオチドには、完全長の遺伝子とc D N A分子、並びにそれらの断片の組合せが含まれる。本発明のポリヌクレオチドは、ヒトの供給源から選好的に誘導されるが、本発明には、非ヒト種から誘導されるものも含まれる。

50

【0077】

「単離されたポリヌクレオチド」は、それが誘導される生物体の天然に存在するゲノムではそれがすぐ近くに隣接しているコード配列（一方は5'末端にあり、他方は3'末端にある）の両方に必ずしも隣接していないポリヌクレオチドを意味する。従って、この用語には、例えば、ベクター、例えば発現ベクター；自己複製プラスミド若しくはウイルス；又は原核生物若しくは真核生物のゲノムDNAへ組込まれているか、又は他の配列から独立した分離分子（例、cDNA）として存在する組換えポリヌクレオチド分子が含まれる。

【0078】

本発明のMPDポリヌクレオチドは、（1）配列番号1～26又は27に示されるような配列を含んでなるポリペプチド、又はその断片をコードする；（2）（1）へ相補的な配列を有する；（3）中程度～高程度（moderate to highly）にストリンジェントな条件の下で（1）のポリヌクレオチドへ特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチド；及び（4）TがUでもあり得る（1）～（3）のポリヌクレオチド（例、RNA配列）である。本発明にまた含まれるのは、本発明のMPDポリヌクレオチドの相同体である。これらのポリヌクレオチドは、ゲノム若しくはcDNA分子の好適な供給源からの単離、又は利用可能な配列データベースのコンピュータ検索を含む、いくつかの方法で同定され得る。本明細書に記載されるアミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチド若しくはポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド相同体を単離するためのプローブ若しくはプライマーとして、又はデータベース検索のクエリー配列として使用され得る。本発明のアミノ酸配列からの「戻し翻訳（back-translation）」により、縮重オリゴヌクレオチド配列が入手され得る。MPDポリペプチドをコードするDNA配列を単離して増幅するために、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を利用し得る。標的ポリヌクレオチド分子の所望される末端を規定するオリゴヌクレオチドは、5'及び3'のプライマーとして利用される。従って、本発明のポリヌクレオチドの断片は、関連配列を同定若しくは増幅するか、又は本発明のMPDの完全長配列を得るためのプローブ及びプライマーとして有用である。オリゴヌクレオチドは、増幅されたDNA断片の組合せの発現ベクターへの挿入を容易にする、制限エンドヌクレアーゼの認識部位をさらに含有してもよい。PCR技術は当技術分野で知られている（例えば、『PCRプロトコール：方法及び応用の手引き（PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications）』Innis et al. 編、アカデミック・プレス社（1990）を参照のこと）。

【0079】

本発明にはまた、減少したストリンジェンシー条件、より好ましくは中程度にストリンジェントな条件、そして最も好ましくは高程度にストリンジェントな条件の下で、MPDポリヌクレオチドへハイブリダイズするポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドが含まれる。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を及ぼす基本変数と好適な条件を設計するための手引きについては、Sambrook, J., E. F. Fritsch, 及び T. Maniatis（1989, 『分子クローニング：実験マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）』、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、コールドスプリングハーバー、N. Y., 9章及び11章；及び『分子生物学の最新プロトコール（Current Protocols in Molecular Biology）』1995, F. M. Ausubel et al. 編、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ社、2. 10節と6. 3～6. 4節、参照により本明細書に組込まれる）に示されていて、例えば、ポリヌクレオチドの長さ及び／又は塩基組成に基づいて、当技術分野の技術者により容易に決定され得る。中程度ストリンジェント条件を達成する1つのやり方は、5x SSC, 0.5% SDS, 1.0mM EDTA（pH 8.0）を含有する前洗浄溶液、約50%のホルムアミド、6x SSCのハイブリダイゼーション緩衝液、及び約55℃のハイブリダイゼーション温度（又は、約50%のホルムアミドを含有するもののような、他の類似のハイブリダイゼー

ション溶液、約 42℃のハイブリダイゼーション温度)、及び 0.5 x SSC, 0.1% SDS 中、約 60℃の洗浄条件の使用を伴う。一般に、高程度ストリンジェント条件は上記のようなハイブリダイゼーション条件として定義されるが、約 68℃、0.2 x SSC、0.1% SDSでの洗浄である。ハイブリダイゼーション及び洗浄の緩衝液では、SSC (1 x SSCは、0.15M NaClと 15mM クエン酸ナトリウムである)の代わりに SSPE (1 x SSPEは、0.15M NaCl、10mM NaH₂PO₄、及び 1.25mM EDTA, pH 7.4である)を代用し得るが、洗浄は、ハイブリダイゼーションが完了した後で 15 分間実施する。当業者に知られていて、以下にさらに記載されるように (例えば、Sambrook et al., 1989 を参照のこと)、ハイブリダイゼーション反応と二本鎖の安定性を支配する基本原理を適用することによって所望される程度のストリンジェンシーを達成するためには、洗浄温度と洗浄塩濃度を必要に応じて調整し得ることが理解されるべきである。核酸を未知配列の標的ポリヌクレオチドへハイブリダイズさせる場合、ハイブリッドの長さは、ハイブリダイズする核酸のそれであると仮定される。既知配列の核酸がハイブリダイズされる場合、ハイブリッドの長さは、核酸の配列を並列して、最適な配列相補性の領域 (群) を同定することによって決定され得る。50 塩基対未満の長さであることが予測されるハイブリッドのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度 (T_m) より 5~10℃低いものであるべきである (ここで、T_m は、以下の式により決定される)。18 塩基対未満の長さのハイブリッドでは、T_m (℃) = 2 (A+T の塩基数) + 4 (G+C の塩基数)。18 塩基対より多い長さのハイブリッドでは、T_m (℃) = 81.5 + 16.6 (log₁₀ [Na⁺]) + 0.41 (G+C %) - (600/N) {ここで、N はハイブリッド中の塩基数であり、[Na⁺] は、ハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオンの濃度である (1 x SSC の [Na⁺] = 0.165M)}。好ましくは、そのようなハイブリダイズするそれぞれの核酸は、それがハイブリダイズする本発明のポリヌクレオチドの長さの少なくとも 25% (より好ましくは少なくとも 50%、60%、又は 70%、そして最も好ましくは少なくとも 80%) である長さを有し、それがハイブリダイズする本発明のポリヌクレオチドと少なくとも 60% (より好ましくは少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、又は少なくとも 99%、そして最も好ましくは少なくとも 99.5%) の配列同一性を有する。

【0080】

「保守修飾変異体」は、ポリペプチドとポリヌクレオチドの両方に適用される。特定のポリヌクレオチドに関して言えば、保守修飾変異体は、同一であるか又は本質的に同一であるアミノ酸をコードするポリヌクレオチド中にあるコドンの意味する。遺伝暗号の縮重性のために、多数の機能的に同一なポリヌクレオチドがある一定のタンパク質をコードする。例えば、コドン GCA、GCC、GCG、及び GCU は、いずれもアミノ酸のアラニンをコードする。従って、アラニンがあるコドンにより特定されるどの位置でも、このコドンは、コードされるポリペプチドを変化させることなく、記載されるいずれかの対応コドンへ変更され得る。このような変異は「サイレント変異」であり、保守修飾変異の 1 種である。あるポリペプチドをコードする本明細書のあらゆるポリヌクレオチド配列も核酸の可能なサイレント変異を記載する。当業者には、ポリヌクレオチド中の各コドン (但し、通常メチオニンの唯一のコドンである AUG を除く) が、機能的に同一な分子を産生するために修飾されることがわかるだろう。従って、記載される各配列には、ポリヌクレオチドをコードする核酸のそれぞれのサイレント変異が潜在的に含まれている。

【0081】

本発明はまた、Hacia et al., Nature Genetics, 14: 441-447 (1996) に記載されるような「DNA チップ」上で本発明のポリヌクレオチドを分析するための方法論を提供する。例えば、MPD ポリペプチド、断片又はその変異体若しくは突然変異体をコードする配列を含んでなるオリゴヌクレオチドの高密度アレイがこのチップへ適用されて固定化され、ある集団中の配列変異を検出するために使用され得る。試験サンプル中のポリヌクレオチドが固定化オリゴヌクレオチドへハイブリ

ダイズする。標的ポリヌクレオチドの固定化プローブへのハイブリダイゼーションプロフィールを定量化し、参照プロフィールと比較する。生じた遺伝子情報は、分子診断に使用され得る。DNAチップ上のオリゴヌクレオチドの密度は、必要に応じて変更し得る。

【0082】

本発明はまた、本明細書に開示されるポリヌクレオチドへ対応する遺伝子を提供する。「対応する遺伝子」は、転写されて、cDNA分子が誘導されるmRNAを産生するゲノムの領域であり、そのような遺伝子の調節された発現に必要なゲノムの隣接領域が含まれる場合がある。従って、対応遺伝子には、限定されないが、コード配列、5'及び3'非翻訳領域、選択的にスプライスされるエクソン、イントロン、プロモーター、エンハンサー、及びサイレンサー、又はサプレッサーの諸要素が含まれ得る。対応する遺伝子は、本明細書に開示される配列情報を使用して、既知の方法に従って単離され得る。そのような方法には、適正なゲノムライブラリー、又は他のゲノム材料の供給源にある遺伝子を同定及び／又は増幅するために、開示される配列情報から、プローブ若しくはプライマーを製造することが含まれる。

10

【0083】

本発明のポリペプチド及び断片の発現、単離、及び精製は、限定されないが以下の方法を含む、好適な技術により達成され得る。

本発明の単離されたポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドを組換え的に産生するために、Kaufman et al., Nucleic Acids Res. 19: 4485 (1991); 及び Pouwels et al. 『クローニングベクター：実験マニュアル (Cloning Vectors: A Laboratory Manual)』エルセヴィエ、ニューヨーク (1985, 及び補遺) に開示されるpMT2若しくはpED発現ベクターのように、発現調節配列へ機能可能的に連結され得る。多くの好適な発現調節配列が当技術分野で知られている。組換えポリペプチドを発現させる一般的な方法も知られていて、R. Kaufman, Methods in Enzymology 185: 537 (1990) に例示されている。本明細書に定義されるように、「機能可能的に連結している」は、このポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが、調節配列へ機能可能的に連結したベクター又はポリヌクレオチドで形質転換（トランスフェクト）された宿主細胞により発現されるように、本発明の単離されたポリヌクレオチドと発現調節配列がベクター若しくは細胞の内部に位置していることを意味する。

20

30

【0084】

さらに、（天然の又は異種の）適正なシグナルペプチドをコードする配列が発現ベクターへ組込まれ得る。シグナルペプチド若しくはリーダーの選択は、組換えポリペプチドが産生されることになる宿主細胞の型のような要因に依存し得る。哺乳動物の宿主細胞において機能的である異種シグナルペプチドの例には、インターロイキン（IL）-7のシグナル配列（米国特許第4,965,195号を参照のこと）；IL-2受容体のシグナル配列（Cosman et al., Nature 312: 768, 1984を参照のこと）；IL-4受容体シグナルペプチド（EP 367,566を参照のこと）；I型IL-1受容体シグナルペプチド（米国特許第4,968,607号を参照のこと）；及びII型IL-1受容体シグナルペプチド（EP 460,846を参照のこと）が含まれる。意図される宿主細胞中で機能的であるシグナルペプチドは、ポリペプチドの細胞外分泌を促進する。シグナルペプチドは、ポリペプチドが細胞から分泌されると、ポリペプチドから切り離される。ポリペプチド調製物には、このシグナルペプチドの1つ以上の部位での切断から生じる、様々なN末端アミノ酸を有するポリペプチドの混合物が含まれ得る。

40

【0085】

DNAを哺乳動物細胞へ導入するための確立された方法が記載されている（Kaufman, R. J., 『哺乳動物細胞の大量培養 (Large Scale Mammalian Cell Culture)』1990, 15-69頁）。細胞をトランスフェクトするには、リポフェクタミン（Lipofectamine）若しくはリポフェクタミ

50

ンープラス (Lipofectamine-Plus) 脂質試薬 (ギブコ/BRL) のような、市販の試薬を使用する追加のプロトコルが使用され得る (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413, 1987)。さらに、Sambrook, et al. (『分子クローニング：実験マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)』、第2版、1～3巻、コールドスプリングハーバーラトリープレス、1989) にあるような従来法を使用して哺乳動物細胞をトランスフェクトするには、エレクトロポレーションを使用し得る。安定な形質転換体の選択は、例えば、細胞毒性薬への抵抗性のような、当技術分野で知られている方法を使用して実施され得る。Kaufman et al., Meth. in Enzymology 185: 487, 1990 は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 抵抗性のような、いくつかの選択スキームを記載する。DHFR選択に適した株は、DHFRが欠損している、CHOのDX-B11株である (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216, 1980)。DHFR cDNAを発現するプラスミドがDX-B11株へ導入され得て、このプラスミドを含有する細胞だけが適正な選択培地で増殖し得る。発現ベクターへ組込まれ得る他の選択可能マーカーの例には、G418及びヒグロマイシンBのような抗生物質への抵抗性を与えるcDNAが含まれる。これら化合物への抵抗性に基づいて、このベクターを収容する細胞が選択される。

10

【0086】

他のやり方では、相同的組換え、又は「遺伝子標的指向 (gene targeting)」技術により遺伝子産物が入手され得る。そのような技術は、本発明のMPDポリペプチドをコードする内因性遺伝子の発現を誘導するために、(CMVプロモーター、等のような) 外因性転写調節要素をゲノム上の特定のあらかじめ定められた部位へ導入することを利用する。宿主の染色体若しくはゲノムへ組込む位置は、遺伝子の位置及び配列が既知であれば、当業者により容易に決定され得る。好ましい態様では、本発明はまた、増加した量の遺伝子産物を産生するために、増幅可能遺伝子と一緒に外因性転写調節要素を導入することを考慮する。相同的組換え又は遺伝子標的指向の実施については、Schimke, et al. 「哺乳動物体細胞での遺伝子の増幅 (Amplification of Genes in Somatic Mammalian cells)」Method in Enzymology 151: 85 (1987) と Capecchi, et al., 「新しいマウスの遺伝学：遺伝子標的指向によるゲノムの変更 (The New Mouse Genetics: Altering the Genome by Gene Targeting)」TIG 5: 70 (1989) に説明されている。

20

30

【0087】

ポリペプチドの発現に適した宿主細胞には、真核及び原核の細胞が含まれる。哺乳動物宿主細胞には、例えば、サル腎臓細胞のCOS-7系 (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., Cell 23: 175, 1981)、L細胞、C127細胞、3T3細胞 (ATCC CCL 163)、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、ヒーラ細胞、BHK (ATCC CRL 10) 細胞系、アフリカミドリザルの腎臓細胞系CV1 (ATCC CCL 70) から誘導されたCV1/EBNA細胞系 (McMahan et al., EMBO J. 10: 2821, 1991 を参照のこと)、ヒト腎臓293細胞、ヒト表皮A431細胞、ヒトColo205細胞、他の形質転換された霊長類の細胞系、正常2倍体細胞、一次組織、一次外移植片、HL-60、U937、HaK、又はJurkat細胞のin vitro 培養物から誘導された細胞株が含まれる。他のやり方では、酵母のような低級真核性物や細菌のような原核生物においてポリペプチドを産生することが可能であり得る。潜在的に好適な酵母株には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces 株、Candida、又は異種ポリペプチドを発現することが可能な酵母株が含まれる。潜在的に好適な細菌株には、例えば、Escherichia coli、Bacillus subtilis、Salmonella

40

50

a t y p h i m u r i u m、又は異種ポリペプチドを発現することが可能な細菌株が含まれる。ポリペプチドが酵母又は細菌でつくられる場合、機能的なポリペプチドを得るためには、例えば、適正な部位のリン酸化若しくはグリコシル化により、そこで産生されるポリペプチドを修飾することが必要であり得る。そのような共有付加は、既知の化学法若しくは酵素法を使用して達成され得る。ポリペプチドはまた、1つ以上の昆虫発現ベクター中にある好適な調節配列へ本発明のポリヌクレオチドを機能可能的に連結させ、昆虫発現系を利用することによって産生され得る。バキュロウイルス／昆虫細胞発現系の材料及び方法は、参照により本明細書に組込まれる、Summers and Smith, テキサス農業実験本部会報 (Texas Agricultural Experiment Station Bulletin) No. 1555 (1987)、及び Lucko 10
w and Summers, Bio/Technology 6: 47 (1988)
に記載される方法と同様に、例えば、インビトロゲン、サンディエゴ、CA、U. S. A. からのキット形態 (MaxBac (登録商標) キット) で市販されている。本明細書に開示される核酸構築体から誘導されるRNAを使用してポリペプチドを産生するために、無細胞翻訳系も利用され得る。好ましくは、少なくとも1つの発現調節配列へ機能可能的に連結した、本発明の単離されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、「組換え宿主細胞」である。

【0088】

MPDポリペプチドを中和するか、又はMPDポリヌクレオチドの発現 (転写又は翻訳のいずれか) を阻害する任意の方法が、MPDポリペプチドの生物学的活性を減少するため 20
に使用され得る。

【0089】

1つの態様では、例えば、MPD mRNA転写物の翻訳を阻害するか又は妨げるための既知のアンチセンス若しくはリボザイムアプローチ; MPD遺伝子の転写を阻害するための三重らせんアプローチ; 又は、MPD遺伝子又はその内因性プロモーター若しくはエンハンサー要素を不活性化するか又は「ノックアウト」するための標的化相同的組換えを使用して、内因性MPD発現のレベルを減少するためのアンタゴニストが設計され得る。そのようなアンチセンス、リボザイム、及び三重らせんのアンタゴニストは、損なわれていないか、又は適宜、突然変異体のMPD活性のいずれかを減少するか又は阻害するために設計され得る。 30

【0090】

アンチセンスRNA及びDNA分子は、標的化mRNAへハイブリダイズし、ポリペプチドの翻訳を妨げることによってmRNAの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンスアプローチは、MPDポリヌクレオチド配列を有するmRNAへ相補的であるオリゴヌクレオチド (DNA又はRNAのいずれか) の設計を伴う。絶対的な相補性は、好ましいものの、要求されない。メッセージの5'末端、例えば、AUG開始コドンまで、及びそれを含む5'非翻訳配列に相補的であるオリゴヌクレオチドは、翻訳を阻害するのに最も効果的に作用するはずである。アンチセンス核酸は、好ましくは、6〜約50のヌクレオチドの長さ及びオリゴヌクレオチドである。このオリゴヌクレオチドは、DNA、RNA、キメラ混合物、それらの誘導体又は修飾のバージョンであり、一本鎖又は二本鎖 40
であり得る。オリゴヌクレオチドは、例えば、塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格で修飾され得て、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、等を向上させてもよい。オリゴヌクレオチドには、(例えば、宿主細胞受容体を *in vivo* で標的指向するための) ペプチド、又は細胞膜を通過する輸送を促進する剤 (例えば、Lettinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 6553, 1989; Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648, 1987; PCT公開番号 WO88/09810を参照のこと) 、又はハイブリダイゼーション誘導切断剤、又は挿入剤 (例えば、Zon, Pharm. Res. 5: 539, 1988 を参照のこと) のような、他の付帯基が含まれ得る。アンチセンス分子は、例えば、組織若しくは細胞の誘導部位への直接注射により、 50

M P Dポリヌクレオチド配列を有する転写物を *in vivo* で発現する細胞へデリバリーされるか、又は所望される細胞を標的指向するように設計された修飾アンチセンス分子（例えば、標的細胞表面上で発現される受容体若しくは抗原へ特異的に結合するペプチド若しくは抗体へ連結したアンチセンス）は、全身的に投与され得る。好ましいアプローチは、強い *pol I I I* 若しくは *pol I I* プロモーターの制御下にアンチセンスオリゴヌクレオチドが置かれている組換えDNA構築体を活用する。

M P Dポリヌクレオチド配列を有するmRNA転写物を触媒的に切断するように設計されたリボザイム分子は、M P D mRNAの翻訳を妨げる（例えば、P C T国際公開W O 9 0 / 1 1 3 6 4 ; 米国特許第5, 8 2 4, 5 1 9号を参照のこと）。リボザイムは、他の一本鎖RNAを特異的に切断する能力を保有するRNA分子である。リボザイムは配列特異的であるので、特定の配列のあるmRNAだけが不活性化される。2つの基本タイプのリボザイム、即ち、テトラヒメナ型（H a s s e l h o f f, N a t u r e, 3 3 4 : 5 8 5, 1 9 8 8）と「ハンマーヘッド」型が存在する。テトラヒメナ型のリボザイムが4つの塩基の長さである配列を認識するのに対し、「ハンマーヘッド」型リボザイムは、11～18塩基の長さの塩基配列を認識する。認識配列が長いほど、その配列が標的mRNA種の中で排他的に存在する可能性が高くなる。従って、ハンマーヘッド型リボザイムのほうがテトラヒメナ型リボザイムより好ましい。アンチセンスアプローチと同じように、リボザイムは修飾されたオリゴヌクレオチドから構成され、強い構成的 *pol I I I* 若しくは *pol I I* プロモーターの制御下でリボザイムを「コードする」DNA構築体を使用してデリバリーされ得る。

10

20

【0091】

他のやり方では、標的遺伝子の調節領域（例えば、標的遺伝子のプロモーター、及び／又はエンハンサー）へ相補的なDNA配列を標的指向させ、標的遺伝子の転写を妨げる三重らせん構造を形成させることによって、内因性のM P D発現を抑制し得る（一般論として、H e l e n e, A n t i c a n c e r D r u g D e s., 6 (6), 5 6 9, 1 9 9 1 ; H e l e n e e t a l., A n n. N. Y. A c a d. S c i., 6 6 0 : 2 7, 1 9 9 2 ; 及び M a h e r, B i o a s s a y s 1 4 (1 2), 8 0 7, 1 9 9 2 を参照のこと）。

【0092】

本発明のアンチセンス、リボザイム、及び三重らせんの分子は、DNA及びRNAの分子の合成について当技術分野で知られている任意の方法により製造され得て、それには、例えば、B i o s e a r c h A p p l i e d B i o s y s t e m sから供される自動化DNA合成機を使用する固相ホスホロアミダイト化学合成のような、オリゴデオキシリボヌクレオチド及びオリゴリボヌクレオチドを化学合成するための技術が含まれる。ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、S t e i n e t a l., N u c l. A c i d s R e s. 1 6 : 3 2 0 9, 1 9 8 8 の方法により合成され得る。メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、制御孔ガラスポリマー支持体の使用により製造され得る（S a r i n e t a l., P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A. 8 5 : 7 4 4 8, 1 9 8 8）。他のやり方では、RNA分子が、アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列の *in vitro* 及び *in vivo* 転写により産生され得る。

30

40

【0093】

内因性遺伝子発現はまた、標的化相同的組換えを使用して、標的遺伝子又はそのプロモーターを不活性化するか又は「ノッキングアウト」することによって抑制され得る（例えば、S m i t h i e s, e t a l., N a t u r e 3 1 7 : 2 3 0, 1 9 8 5 ; T h o m a s a n d C a p e c c h i, C e l l 5 1, 5 0 3, 1 9 8 7 ; T h o m p s o n, e t a l., C e l l 5, 3 1 3, 1 9 8 9 を参照のこと。これらはいずれもそのまま参照により本明細書に組込まれる）。例えば、内因性標的遺伝子へ相同なDNAが隣接した突然変異体の非機能性標的遺伝子（又は完全に無関係なDNA配列）が、選択可能マーカー、及び／又はネガティブ選択可能マーカーを伴うか又は伴わずに

50

使用され得る。標的化相同的組換えを介したDNA構築体の挿入は、標的遺伝子の不活性化をもたらす。そのようなアプローチは、不活性標的遺伝子をもった非ヒト動物の子孫を産生するために胚性幹細胞への修飾が使用され得る場合に特に適している（例えば、Thomas and Capecchi, 1987 と Thompson, 1989, 同上、を参照のこと；また、Grishok et al., Science 287 (5462) : 2494, 2000 及び Dernburg et al., Genes Dev. 14 (13) : 1578, 2000 の「RNA干渉」（「RNAi」）技術も参照のこと）。

【0094】

本明細書で使用されるように、「トランスジェニック動物」は、胚細胞へ挿入され、その細胞から発生する動物のゲノムの一部となるトランス遺伝子を包含する動物、又はそのような動物の子孫である。トランス遺伝子技術により産生され得る任意の非ヒト動物が本発明に含まれるが、哺乳動物が好ましい。好ましい哺乳動物には、非ヒト霊長類、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ウシ、ブタ、ウサギ、及び、モルモット、ハムスター、ラット、アレチネズミ (gerbils)、及びマウスのような齧歯動物が含まれる。

【0095】

「トランス遺伝子 (transgene)」は、トランスジェニック動物で発現され得る、1つ以上の選択される配列（例えば、MPD mRNAを切断するリボザイムをコードする、MPD mRNAへのアンチセンス分子をコードする、突然変異体のMPD配列をコードする、等）を含むポリヌクレオチドである。このポリヌクレオチドは、トランスジェニック動物に対して部分的又は全体的に異種である、即ち外来であるか、又はトランスジェニック動物の内因性遺伝子に対して同種であるが、天然の遺伝子の位置とは異なる位置で動物のゲノムへ挿入されるように設計される。トランス遺伝子には、選択されるDNAの発現に必要な1つ以上のプロモーターとイントロンのような他のDNA配列が含まれる場合があり、いずれも選択されるDNAへ機能可能的に連結され、エンハンサー配列が含まれる場合もある。

【0096】

トランスジェニック動物は、特定の経路若しくは表現型に対する、増加又は減少したMPDレベルの影響を同定するために使用され得る（例えば、Brinster, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 4438, 1985 ; Jaenisch, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 : 1260, 1976 ; Hogan, et al., 1986『マウス胚の操作法 (Manipulating the Mouse Embryo)』コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、コールドスプリングハーバー、N. Y. ; Jahner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 6927, 1985 ; Vander Putten, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 6148 ; Steward, et al., EMBO J., 6 : 383, 1987 ; Jahner, et al., Nature, 298 : 623, 1982 を参照のこと）。

【0097】

もう1つの態様では、本発明のポリペプチドと免疫反応する抗体が本明細書に提供される。上記に示すような、MPDのポリペプチド、断片、変異体、融合ポリペプチド、等がそれと免疫反応する抗体を産生するときの「免疫原」として利用され得る。そのような抗体は、抗体の抗原結合部位を介してポリペプチドへ特異的に結合する。特異的に結合する抗体は、MPDポリペプチド、相同体、及び変異体を特異的に認識し、それと結合するが、他の分子とは結合しない。好ましい態様では、抗体は、本発明のMPDアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的であって、他のポリペプチドとは交差反応しない。

【0098】

より特定すると、上記のポリペプチド、断片、変異体、融合ポリペプチド、等は、抗体の形成を誘発する抗原決定基若しくはエピトープを含有する。これらの抗原決定基若しくは

エピトープは、直線状、又は高次構造的 (conformational) (断続的) のいずれかであり得る。直線状エピトープがポリペプチドのアミノ酸の単一部分からなるのに対し、高次構造的若しくは断続的エピトープは、ポリペプチド鎖の様々な領域に由来し、ポリペプチドの折り畳みに応じて近傍へ集められるアミノ酸部分からなる。エピトープは、当技術分野で知られている任意の方法により同定され得る。さらに、本発明のポリペプチドに由来するエピトープは、アッセイにおける研究試薬として、そして、ポリクローナル血清や培養ハイブリドーマ由来の上澄液のような物質から特異結合抗体を精製するために使用され得る。そのようなエピトープ又はその変異体は、固相合成、ポリペプチドの化学的若しくは酵素的切断のような当技術分野で知られている技術を使用するか、又は組換えDNA技術を使用して産生され得る。

10

【0099】

本発明のポリペプチドに対するポリクローナル及びモノクローナル抗体は、いずれも従来技術により調製され得る。例えば、『モノクローナル抗体、ハイブリドーマ：生物学的分析の新次元 (Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses)』(Kennet et al. 編) プレナム・プレス、ニューヨーク (1980)；及び、『抗体：実験マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual)』(Harlow と Land 編)、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、コールドスプリングハーバー、NY (1988)；Kohler and Milstein, (米国特許第4, 376, 110号)；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kosbor et al., Immunology Today 4: 72, 1983；Cole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026, 1983)；及び、EBV-ハイブリドーマ技術 (Cole et al., 1985, 『モノクローナル抗体と癌治療 (Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)』アラン・R. リス社、77-96頁)を参照のこと。本発明のポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系も本明細書で意図される。そのようなハイブリドーマは、従来技術により産生され、同定され得る。抗体の産生のために、様々な宿主動物が、MPDポリペプチド、その断片、変異体、又は突然変異体を用いた注射で免疫化され得る。そのような宿主動物には、限定されないが、少し挙げると、ウサギ、マウス、及びラットが含まれ得る。免疫学的応答を高めるには、様々なアジュバントが使用され得る。宿主の種に依存して、そのようなアジュバントには、限定されないが、フロイント (完全及び不完全) アジュバント、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リゾレシチンのような界面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、アオガイヘモシアニン、ジニトロフェノール、及び、BCG (カルメット-ゲランの桿菌) 及び坐瘡プロピオンバクテリウム (Corynebacterium parvum) のような潜在的に有用なヒトアジュバントが含まれる。モノクローナル抗体は、従来技術により回収され得る。そのようなモノクローナル抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDを含む免疫グロブリンのクラス、及びそのサブクラスのものであり得る。

20

30

【0100】

さらに、適正な抗原特異性のあるマウス抗体分子由来の遺伝子を、適正な生物学的活性のあるヒト抗体分子由来の遺伝子と一しょにスプライスすることによる「キメラ抗体」の産生 (Takeda et al., Nature, 314: 452, 1985) のために開発された技術も使用することができる。キメラ抗体は、ブタmAbから導かれた可変領域とヒト免疫グロブリンの定常領域を有するもののよう、様々な部分が異なる動物種から誘導されている分子である。本発明のモノクローナル抗体にはまた、マウスモノクローナル抗体のヒト化バージョンも含まれる。そのようなヒト化抗体は既知の技術により調製され得て、抗体がヒトへ投与されるときに、低減した免疫原性という利点を提供し得る。キメラ抗体とさらに工学処理されるモノクローナル抗体の産生の方法には、Richmann et al. (Nature 332: 323, 1988), Liu et

40

50

al. (PNAS 84: 3439, 1987), Larrick et al. (Bio/Technology 7: 934, 1989) 及び Winter and Harris (TIPS 14: 139, Can, 1993) に記載されるものが含まれる。抗体をトランスジェニック的に産生する方法は、GB 2, 272, 440、米国特許第5, 569, 825及び5, 545, 806号と、それからの優先権を主張する関連特許に見出し得るが、これらはいずれも参照により本明細書に援用される。好ましくは、ヒトでの使用では、抗体はヒトのものであるか又はヒト化されていて、そのような抗体を作成するための技術も知られている。ヒト抗体を作成するためのトランスジェニック動物は、例えば、メダレクス (Medarex) 社 (プリンストン、NJ) とアブジェニクス (Abgenix) 社 (フレモント、CA) から入手可能である。

10

【0101】

特異エピトープを認識する抗体断片は、既知の技術により産生され得る。例えば、そのような断片には、限定されないが、抗体分子のペプシン消化により産生され得る F(ab')₂ 断片と、この (ab')₂ 断片のジスルフィド架橋を還元することによって産生され得る Fab 断片が含まれる。あるいは、所望される特異性をもったモノクローナル Fab 断片の迅速かつ容易な同定を可能にするために、Fab 発現ライブラリーが構築され得る (Huse et al., Science, 246: 1275, 1989)。単鎖抗体の産生に記載される技術 (米国特許第4, 946, 778号; Bird, Science 242: 423, 1988; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879, 1988; 及び Ward et al., Nature 334: 544, 1989) も、MPD アミノ酸配列を含有するポリペプチドに対する単鎖抗体を産生するために採用され得る。さらに、MPD ポリペプチドへの抗体はまた、MPD ポリペプチドを「模倣」し、当業者に知られた技術を使用して MPD ポリペプチドへ結合し得る抗イディオタイプ抗体を産生するために活用され得る (例えば、Greenspan & Bona, FASEB J 7(5): 437, 1993; 及び Nissinoff, J. Immunol. 147(8): 2429, 1991 を参照のこと)。

20

【0102】

そのような抗体を同定するためのスクリーニング方法が知られていて、例えば、免疫アフィニティークロマトグラフィーを含み得る。抗体は、アゴニスト的な (即ち、リガンド模倣的な) 特性でスクリーニングされ得る。そのような抗体は、細胞表面上の MPD ポリペプチドへ結合すると、天然に存在する MPD 結合パートナーが細胞表面上のポリペプチドへ結合するときに誘導される生物学的効果に類似した生物学的効果 (例えば、生物学的シグナルの伝達) を誘導し得る。アゴニスト性抗体は、MPD 仲介性の副刺激経路又は細胞間情報伝達を誘導するために使用され得る。

30

【0103】

さらに、本発明の MPD ポリペプチド配列を有するポリペプチドの、その結合パートナー若しくは基質への結合を阻止する抗体は、そのような結合から生じる MPD ポリペプチド仲介性の細胞間情報伝達若しくは副刺激を阻害すること、及び／又は MPD ポリペプチドのインテグリンコグネイトを同定するために使用され得る。そのような阻止抗体は、MPD ポリペプチドへの結合パートナー (例えば、インテグリン) を発現するある種の細胞へのそのポリペプチドの結合を阻害する能力について抗体を試験することのような好適なアッセイ方法を使用して、同定され得る。あるいは、阻止抗体は、MPD ポリペプチドの標的細胞への結合から生じる生物学的効果を阻害する能力についてのアッセイにおいて同定され得る。1つの態様では、フローサイトメトリーのインテグリン mAb をベースとした結合阻害アッセイが、内皮細胞の表面上で発現されるインテグリンへの MPD dis-Fc ポリペプチドの結合を示すために使用される。そのようなアッセイでは、ヒト内皮細胞が使用され得る。ヒト内皮細胞は、 $\alpha_v \beta_3$ 、 $\alpha_v \beta_5$ 、 β_1 、 β_4 、 α_1 、 α_2 、 α_3 、 α_4 、 α_5 、及び α_6 インテグリンを発現する。MPD dis-Fc ポリペプチドを内皮細胞と接触させる。ヒトインテグリン $\alpha_v \beta_3$ (LM609, 抗CD51/61, Ch

40

50

emicon, Temecula, CA; Brooks et al., Science 264: 569, 1994)、 $\alpha_2\beta_1$ (BHA2.1, 抗CD49b, Chemicon; Wang et al., Mol. Biol. of the Cell 9: 865, 1998)、 $\alpha_5\beta_1$ (SAM-1, 抗CD49e, Biodesign; A. te Velde et al., J. Immunol. 140: 1548, 1988)、 $\alpha_3\beta_1$ (ASC-6, 抗CD49c, Chemicon; Pattaramalai et al., Exp. Cell. Res. 222: 281, 1996)、 $\alpha_4\beta_1$ (HP2/1, 抗CD49d, イムノテック、マルセイユ、フランス; ヒト白血球分化抗原に関する第4回国際会議ワークショップ、ウィーン、オーストリア、1989、ワークショップ番号p091)、 $\alpha_6\beta_1$ (GoH3, 抗CD49f, イムノテック; ヒト白血球分化抗原に関する第4回国際会議ワークショップ、ワークショップ番号p055)、 $\alpha_6\beta_4$ (439-9B, 抗CD104, Pharmingen, サンディエゴ、CA; Schlossman et al., 1995 『白血球V型: 白血球分化抗原 (Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens)』オックスフォード・ユニバーシティ・プレス、ニューヨーク)、及び $\alpha_v\beta_5$ (MAB 1961, Chemicon; Weinaker et al., J. Biol. Chem. 269: 6940, 1994) に特異的なモノクローナル抗体は、HMVEC-dへ特異的に結合することが示された。これらの抗体のそれぞれは、指定されたインテグリンのそのリガンド (例、フィブロネクチン、ビトロネクチン、フィブリノーゲン) への結合を特異的に阻止することが知られている。MPDdis-Fcポリペプチドの結合を阻害するインテグリンmAbの能力は、MPDポリペプチドのディスインテグリンドメインがどのインテグリンへ結合するか、そして、間接的に、ディスインテグリンドメインがどのインテグリン結合活性に拮抗し得るかを明らかにする。選択されたインテグリンへ結合するMPDdis-Fcポリペプチドは、インテグリン-リガンド相互作用を妨害し、内皮細胞の機能、血管新生、及び他の生物学的活性を *in vitro* 及び *in vivo* で変調する能力についてさらに試験される。

【0104】

従って、MPDポリペプチドの細胞表面結合パートナーとの相互作用により引き起こされるか又は (直接的又は間接的に) 悪化される障害が治療され得る。治療法は、MPD結合仲介性の生物学的活性を阻害するのに有効な量で、阻止抗体を被検者 (subject) へ *in vivo* 投与することを伴う。本明細書で使用されるように、「被検者」は任意の動物、好ましくは哺乳動物 (例、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ウマ、霊長類、等)、そして最も好ましくはヒトであり得る。一般に、モノクローナル抗体は、そのような治療法での使用に好ましい。1つの態様では、抗原結合抗体断片が利用される。MPDポリペプチドに対する抗体と生理学的に許容される希釈剤、賦形剤、又は担体を含んでなる組成物が本明細書に提供される。

【0105】

また本明細書に提供されるのは、抗MPDポリペプチド抗体へ付いた、検出可能 (例、診断用) であるか、又は治療用の剤を含んでなるコンジュゲートである。このコンジュゲートは、*in vitro* 若しくは *in vivo* の方法に使用を見出す。本発明の抗体はまた、本発明のポリペプチド若しくは断片の存在を検出する *in vitro* 又は *in vivo* のいずれかのアッセイに使用され得る。抗体はまた、本発明のポリペプチド若しくは断片を免疫アフィニティークロマトグラフィーにより精製することに利用され得る。

【0106】

もう1つの態様では、注目する生物学的に活性なポリペプチド、又はそれらが相互作用する小分子、例えば、基質、結合剤、阻害剤、アゴニスト、アンタゴニスト、等の構造類似体を産生するために、合理的薬剤設計が使用される。本明細書に提供される方法は、ポリペプチドのより活性であるか、又はより安定な形態であるか、又はポリペプチドの *in vivo* での機能を高めるか、又はそれに干渉する薬剤を形成するか又は同定するため

に使用され得る (Hodgson, J. Biotechnology 9: 19, 1991, 参照により本明細書に組込まれる)。1つのアプローチでは、本発明のポリペプチド、リガンド若しくは結合パートナー、又は、ポリペプチド-結合パートナー複合体の三次元構造が、X線結晶学、核磁気共鳴、又はコンピュータ相同性モデリング、又は最も典型的には、これらアプローチの組合せにより決定される。類似分子を設計すること、効率的な阻害剤を同定すること、又は本発明のポリペプチドへ結合し得る小分子を同定することのために、関連した構造情報が使用される。ADAMポリペプチド構造情報、好ましくはMPD構造情報の、分子モデリングソフトウェアシステムにおける使用は、MPD活性を変調するのに有用な阻害剤若しくは結合剤の設計を提供する。本発明の特定の方法は、基質若しくはリガンドの可能な結合部位についてMPDポリペプチドの三次元構造を分析すること、予測される反応部位を取込む新たな分子を合成すること、及び、この新たな分子を本明細書にさらに記載されるようにアッセイすることを含む。タンパク質の三次元構造に基づいて基質又は結合剤をモデル化するためのアルゴリズム、ソフトウェア、及び方法の例が、PCT公開WO 107579A2に記載されていて、この開示内容は参照により本明細書に組込まれる。

10

【0107】

本明細書にさらに記載されるような機能アッセイにより選択される標的特異抗体を単離し、次いで、その結晶構造を解説し、それにより後続の薬剤設計の基礎となり得るファルマコア (pharmacore) を生ずることも可能である。機能的な、薬理的に活性な抗体への抗イディオタイプ抗体 (anti-id) を産生することによってポリペプチド結晶学を完全に回避することが可能である。鏡像の鏡像として、anti-idの結合部位は、元の受容体の類似体となることが期待される。従って、化学的若しくは生物学的に産生されたペプチドのバンクからペプチドを同定及び単離するためにanti-idが使用され得る。そうなれば、単離されたペプチドは、ファルマコアとして機能する。

20

【0108】

本発明は、MPDポリペプチドの活性若しくは発現を変調する薬剤を同定するための方法を提供する。そのような方法には、MPDポリペプチド若しくはポリヌクレオチドを含有するサンプルを、試験剤とポリペプチド若しくはポリヌクレオチドが相互作用することを可能にする条件の下で試験剤と接触させること、及び、その試験剤の存在若しくは不在下でMPDポリペプチドの発現若しくは活性を測定することが含まれる。

30

【0109】

1つの態様では、MPDポリヌクレオチドを含有する細胞を、細胞と試験剤とが相互作用することが可能になる条件の下で試験剤と接触させる。そのような条件には、典型的には、活用される特定の細胞型に一致した、当技術分野で知られている通常の細胞培養条件が含まれる。高められた温度に関連した条件下か、又は細胞による試験剤の取込みを促進する試薬の存在下で試験剤と細胞が相互作用することを可能にすることが望ましい場合がある。対照は、同様に、但し、試験剤の不在下で処置される。あるいは、MPDの活性若しくは発現が試験剤との接触に先立って測定され (例、標準若しくは対照の測定) されてから、試験剤との接触の後で再び測定され得る。次いで、処置された細胞を対照と比較すると、対照と比較したMPDの発現若しくは活性における差異は、MPDの活性若しくは発現を変調する剤の存在を示唆する。

40

【0110】

MPD発現が測定される場合、MPDポリペプチドをコードするmRNAの細胞における量を検出することは、例えば、PCR又はノーザンブロットにより定量化され得る。サンプル中にあるMPDポリペプチドの量の変化が測定される場合、MPDポリペプチドを検出するか又は定量することは、抗MPD抗体を使用し、既知の技術を使用して実施され得る。

【0111】

試験剤は、タンパク質の活性若しくは発現の変調に典型的に使用される任意の分子であり得て、例えば、小分子、化学品、ペプチド模擬体、抗体、ペプチド、ポリヌクレオチド (

50

例、アンチセンス若しくはリボザイムの分子)、等が含まれる。従って、コンピュータをベースとする薬剤設計により開発される剤が、MPDの活性若しくは発現の変調に対する剤の活性を決定するための本明細書に記載されるアッセイ及び方法を使用して、実験室で試験され得る。MPDの変調には、活性又は発現の増加又は減少が含まれる。

【0112】

本発明のMPDポリペプチド(断片、変異体、オリゴマー、及び他の形態を含む)は、多種多様なアッセイにおいて有用である。例えば、本発明のMPDポリペプチドは、ADAファミリーポリペプチドのメンバーの結合パートナーを同定するために使用され得て、これはまた、細胞間情報伝達、共刺激、又は免疫細胞活性を変調するためにも使用され得る。他のやり方では、それらは、細胞間情報伝達、共刺激経路、又は免疫細胞活性を変調する、非結合パートナーの分子若しくは物質を同定するために使用され得る。

10

【0113】

MPDポリペプチドとその断片は、結合パートナーを同定するために使用され得る。例えば、それらは、従来の結合アッセイのような、好適なアッセイにおいて、候補結合パートナーへ結合する能力について試験され得る。例を挙げると、MPDポリペプチド又はその断片は、検出可能な分子(例、放射性核種、発色団、及び比色若しくは蛍光反応を触媒する酵素、等)で標識化され得る。標識されたポリペプチドを、候補結合パートナーを発現する細胞と接触させる。次いで、細胞を洗浄して未結合の標識ポリペプチドを除去し、標識の性質に従って選択される好適な技術により、細胞に結合した標識の存在が決定される。

20

【0114】

1つの態様では、抗インテグリン抗体の使用により、結合パートナーのインテグリンが同定される。MPDdis-Fcポリペプチドの結合を阻害するインテグリンmAbの能力は、ディスインテグリンドメインがどのインテグリンへ結合するか、そして、間接的に、ディスインテグリンドメインがどのインテグリン結合活性に拮抗し得るかを明らかにする。選択されたインテグリンへ結合するMPDdis-Fcポリペプチドは、インテグリンーリガンド相互作用を妨害し、内皮細胞の機能、血管新生、及び他の生物学的活性を *in vitro* 及び *in vivo* で変調する能力についてさらに試験される。

【0115】

結合アッセイのもう1つの例では、候補結合パートナーのcDNAを含有する組換え発現ベクターをCV1-EBNA-1細胞にトランスフェクトする。この細胞を、例えば、様々な濃度の可溶性MPDポリペプチド/Fc融合ポリペプチドと、37℃で1時間インキュベートする。細胞を洗浄し、一定飽和濃度の¹²⁵I-マウス抗ヒトIgGとインキュベートする。洗浄後、トリプシン処理により細胞を遊離させる。上記に利用されるマウス抗ヒトIgGは、ヒトIgGのFc領域に対して向けられていて、Jackson・Immunoresearch・Laboratories Inc.、ウェストグローブ、PAから入手され得る。この抗体は、細胞へ結合したFcポリペプチドのFc部分へ結合する。細胞に結合した¹²⁵I-抗体をパッカード・オートガンマ(Autogamma)カウンターで定量する。

30

【0116】

MPDポリペプチドが(例えば、受容体ーリガンド相互作用において)別のポリペプチドへ結合するか、又は潜在的に結合する場合、MPDポリヌクレオチドはまた、結合が起こる他のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを同定するか、又は結合相互作用の阻害剤を同定するための、相互作用トラップアッセイ(例えば、Gyuris et al., Cell 75: 791, 1993を参照のこと)において使用され得る。これらの結合相互作用に関わるポリペプチドはまた、結合相互作用のペプチド若しくは低分子の阻害剤若しくはアゴニストをスクリーニングするために使用され得る。

40

【0117】

もう1つのタイプの好適な結合アッセイは、競合結合アッセイである。例を挙げると、候補結合パートナーへの結合について天然のポリペプチドと競合する変異体の能力をアッセイ

50

することによって、変異体の生物学的活性を決定し得る。競合結合アッセイは、慣用の方法論により実施され得る。競合結合アッセイに利用され得る試薬には、放射標識MPDの断片若しくは変異体と、細胞表面上で（内因性又は組換えの）MPDを発現するインタクト細胞が含まれる。インタクト細胞の代わりに、（固相上の）ポリペプチドA若しくはポリペプチドGのFc部分との相互作用を介して固相へ結合した可溶性の結合パートナー／Fc融合ポリペプチドを代用し得る。ポリペプチドA及びGを含有するクロマトグラフィーカラムには、Pharmacia Biotech Inc.、ピスカタウェイ、NJから供されるものが含まれる。

【0118】

MPDポリペプチドのメタロプロテイナーゼ活性を測定するために、酵素アッセイが使用され得る。例えば、MPDメタロプロテイナーゼポリペプチドの活性は、蛍光標識化MPDメタロプロテイナーゼ基質をMPDメタロプロテイナーゼポリペプチドとインキュベートし、蛍光又は蛍光の位置の変化を測定することによって測定され得る。蛍光標識化基質の現像については当技術分野で知られている。

【0119】

細胞間情報伝達、共刺激、インテグリン結合、内皮細胞遊走、血管新生、又は免疫細胞活性に対する、MPDポリペプチド、MPD断片、及び抗体の影響は、標的細胞における細胞間情報伝達、共刺激、インテグリン結合、内皮細胞遊走、血管新生、又は免疫細胞活性を誘導、増進、抑制、又は抑止するポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニスト若しくはアンタゴニストと、細胞又は細胞の集団を接触させることによってアッセイされ得る。MPDポリペプチド、アゴニスト、又はアンタゴニストの同定は、当業者に知られた多種多様なアッセイにより行うことができる。そのようなアッセイに含まれるのは、細胞間情報伝達、共刺激、インテグリン結合、内皮細胞遊走、又は血管新生に影響するMPDポリペプチドの能力を評価するものである。そのようなアッセイには、例えば、MPDポリペプチド又はその可溶性ディスインテグリン断片の存在下での（例えば、インテグリン関連の結合を介した）細胞－細胞相互作用の分析が含まれる。そのようなアッセイでは、MPD配列を有するポリペプチドの存在下での細胞－細胞相互作用、細胞マトリックス相互作用、又はインテグリン関連結合の割合を決定し、そのような結合若しくは相互作用が、例えば可溶性ディスインテグリンMPD（MPDdis）配列の存在下で変化するかどうかを決定するだろう。本発明のこの側面の例示的なアッセイには、内皮細胞遊走アッセイが含まれる。他のアッセイも当技術分野で知られている。

【0120】

もう1つの側面では、本発明は、細胞若しくは培養物に対する、試験剤が細胞－細胞相互作用、細胞－マトリックス相互作用、インテグリン関連結合活性、内皮細胞遊走活性、あるいは細胞若しくは培養物に対する試験剤の血管新生活活性に影響を及ぼす能力を検出する方法を提供する。この側面では、本方法は：（1）第一群の標的細胞を、MPD配列を含んでなるポリペプチド（例えば、配列番号1～27；又は可溶性MPDディスインテグリンポリペプチド）、MPDポリペプチドのリガンド若しくは受容体、又はそれらの断片を含んでなるポリペプチドを含む試験剤と、使用される特定アッセイに適した条件の下で、接触させること；（2）標的細胞間での細胞－細胞相互作用、細胞－マトリックス相互作用、インテグリン関連結合活性、内皮細胞遊走活性、又は血管新生活活性の正味割合（net rate）を測定すること；及び（3）試験剤の不在下、他の点では第一群の細胞と同一である条件の下で、MPDポリペプチドリガンド又はその断片を含有する対照細胞の間での細胞－細胞相互作用、細胞－マトリックス相互作用、インテグリン関連結合活性、内皮細胞遊走活性、又は血管新生活活性の正味割合を観測することを含む。この態様では、対照細胞における細胞間情報伝達若しくは共刺激の正味割合が、MPD分子、並びに試験剤の両方で処理された細胞のそれと比較される。この比較により、MPD活性を変調する剤の示標となる、細胞－細胞相互作用、細胞－マトリックス相互作用、インテグリン関連結合活性、内皮細胞遊走活性、又は血管新生活活性の正味割合における差異が提供される。試験剤は、細胞－細胞相互作用、細胞－マトリックス相互作用、インテグリン関連結合活

性、内皮細胞遊走活性、又は血管新生活性を活性化若しくはアップレギュレートすることによるか、又は阻害若しくはダウンレギュレートすることのいずれかにより、エフェクターとして機能し得る。

【0121】

本発明のポリペプチドは、サイトカイン産生若しくは阻害活性、細胞増殖（誘導するか又は阻害する）、又は細胞分化（誘導するか又は阻害する）活性を示し得る。既知のあらゆるサイトカインを含む、今日までに発見された多くのポリペプチド因子は、1つ以上の細胞増殖アッセイにおいて活性を示したので、このアッセイは、サイトカイン活性の簡便な確認法として役立つ。本発明のポリペプチドの活性は、限定されないが、32D、DA2、DA1G、T10、B9、B9/11、BaF3、MC9/G、M+（プレBM+）、2E8、RB5、DA1、123、T1165、HT2、CTLL2、TF-1、Mo7e、及びCMKを含む細胞系についての、数多くの定常因子依存型細胞増殖アッセイのいずれかにより裏付けられる。本発明のMPDポリペプチドの活性は、以下の方法により測定され得る：

T細胞若しくは胸腺細胞の増殖アッセイには、限定されないが、『免疫学の最新プロトコール（Current Protocols in Immunology）』Coligan et al., 編、Pub. グリーン・パブリッシング・アソシエーツ、及びウィリー・インターサイエンス（第3章、マウス白血球機能の *in vitro* アッセイ 3.1-3.19；第7章、ヒトの免疫学的試験）；Takai et al., J. Immunol. 137: 3494, 1986；Bertagnolli et al., J. Immunol. 145: 1706, 1990；Bertagnolli et al., Cell. Immunol. 133: 327, 1991；Bertagnolli et al., J. Immunol. 149: 3778, 1992；Bowman et al., J. Immunol. 152: 1756, 1994 に記載されるものが含まれる。

【0122】

サイトカイン産生、及び／又は脾臓細胞、リンパ節細胞、又は胸腺細胞の増殖のアッセイには、限定されないが、『免疫学の最新プロトコール（Current Protocols in Immunology）』E. M. Coligan et al., 編、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、トロント、1994の「ポリクローナルT細胞刺激（Polyclonal T cell stimulation）」Kruisbeek, A. M. and Shevach, 第1巻、3.12.1-3.12.14 頁と、「マウス及びヒトのγ-インターフェロンの測定（Measurement of mouse and human Interferon γ）」Schreiber, R. D. 第1巻、6.8.1-6.8.8 頁に記載されるものが含まれる。

【0123】

造血及びリンパ生成細胞の増殖及び分化のアッセイには、限定されないが、『免疫学の最新プロトコール（Current Protocols in Immunology）』Coligan 編、第1巻、6.3.1-6.3.12 頁、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、トロント、1991の「ヒト及びマウスのインターロイキン-2及びインターロイキン-4の測定（Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4）」Bottomly, et al., ; deVries et al., J. Exp. Med. 173: 1205, 1991；Moreau et al., Nature 336: 690, 1988；Greenberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 2931, 1983；『免疫学の最新プロトコール（Current Protocols in Immunology）』Coligan 編、第1巻、6.6.1-6.6.5 頁、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、トロント、1991の「マウス及びヒトのインターロイキン-6の測定（Measurement of mouse and human interleukin 6）」Nordan,

10

20

30

40

50

R. ; Smith et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83 : 1857, 1986 ; 『免疫学の最新プロトコール (Current Protocols in Immunology)』Coligan 編、第1巻、6. 15. 1 頁、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、トロント、1991の「ヒトインターロイキン-11の測定 (Measurement of human interleukin 11)」Bennett et al. ; 『免疫学の最新プロトコール (Current Protocols in Immunology)』Coligan 編、第1巻、6. 13. 1 頁、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、トロント、1991の「マウス及びヒトのヒトインターロイキン-9の測定 (Measurement of mouse and human interleukin 9)」Ciarletta et al. に記載されるものが含まれる。 10

【0124】

抗原に対するT細胞クローン応答のアッセイ (特に、APC-細胞相互作用に影響を及ぼすと共に、T細胞の影響を導くポリペプチドを、増殖とサイトカイン産生を測定することによって同定する) には、限定されないが、『免疫学の最新プロトコール (Current Protocols in Immunology)』Coligan 編、Pub. グリーン・パブリッシング・アソシエーツ、及びウィリー-インターサイエンス (第3章、マウス白血球機能の *in vitro* アッセイ；第6章、サイトカインとその細胞受容体；第7章、ヒトの免疫学的試験)；Weinberger et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 6091, 1980；Weinberger et al. , Eur. J. Immun. 11 : 405, 1981；Takai et al. , J. Immunol. 137 : 3494, 1986；Takai et al. , J. Immunol. 140 : 508, 1988 に記載されるものが含まれる。 20

【0125】

胸腺細胞若しくは脾臓細胞の細胞毒性のアッセイ には、限定されないが、『免疫学の最新プロトコール (Current Protocols in Immunology)』Coligan 編、Pub. グリーン・パブリッシング・アソシエーツ、及びウィリー-インターサイエンス (第3章、マウス白血球機能の *in vitro* アッセイ、3. 1-3. 19 頁；第7章、ヒトの免疫学的試験)；Herrmann et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 2488, 1981；Herrmann et al. , J. Immunol. 128 : 1968, 1982；Handa et al. , J. Immunol. 135 : 1564, 1985；Takai et al. , J. Immunol. 137 : 3494, 1986；Takai et al. , J. Immunol. 140 : 508, 1988；Bowman et al. , J. Virol. 61 : 1992；Bertagnolli et al. , Cell. Imm. 133 : 327, 1991；Brown et al. , J. Immun. 153 : 3709, 1994 に記載されるものが含まれる。 30

【0126】

T細胞依存性IgG応答及びアイソタイプスイッチングのアッセイ (特に、T細胞依存性抗体応答を変調し、Th1/Th2プロフィールに影響を及ぼすポリペプチドを同定する) には、限定されないが、Maliszewski, J. Immunol. 144 : 3028, 1990；及び、『免疫学の最新プロトコール (Current Protocols in Immunology)』Coligan 編、第1巻、3. 8. 1-3. 8. 16 頁、ウィリー・アンド・サンズ、トロント、1994の「B細胞機能のアッセイ：*in vitro* 抗体産生 (Assays for B cell function: *In vitro* antibody production)」Mond, J. J. and Brunswick, M. に記載されるものが含まれる。 40

【0127】

混合リンパ球反応 (MLR) のアッセイ (特に、Th1及びCTLの応答を産生するポリ 50

ペプチドを同定する)には、限定されないが、『免疫学の最新プロトコル (Current Protocols in Immunology)』Coligan 編、Pub. グリーン・パブリッシング・アソシエーツ、及びウィリー・インターサイエンス (第3章、マウス白血球機能の *in vitro* アッセイ、3.1-3.19 頁; 第7章、ヒトの免疫学的試験); Takai et al., 1986, 同上; Takai et al., 1988, 同上; Bertagnoli et al., J. Immunol. 149: 3778, 1992 に記載されるものが含まれる。

【0128】

樹状細胞依存性アッセイ (特に、天然T細胞を活性化する樹状細胞により発現されるポリペプチドを同定する)には、限定されないが、Guery et al., J. Immunol. 134: 536, 1995; Inaba et al., J. of Exp. Med. 173: 549, 1991; Macatonia et al., J. Immunol. 154: 5071, 1995; Porgador et al., J. of Exp. Med. 182: 255, 1995; Nair et al., J. Virol. 67: 4062, 1993; Huang et al., Science 264: 961, 1994; Macatonia et al., J. of Exp. Med. 169: 1255, 1989; Bhardwaj et al., J. Clin. Invest. 94: 797, 1994; 及び Inaba et al., J. of Exp. Med. 172: 631, 1990 に記載されるものが含まれる。

【0129】

リンパ球生存/アポトーシスのアッセイ (特に、超抗原誘導後のアポトーシスを防止するポリペプチドとリンパ球のホメオスタシスを調節するポリペプチドを同定する)には、限定されないが、Darzynkiewicz et al., Cytometry 13: 795, 1992; Gorczyca et al., Leukemia 7: 659, 1993; Gorczyca et al., Cancer Research 53: 1945, 1993; Ito et al., Cell 66: 233, 1991; Zacharchuk, J. Immunol. 145: 4037, 1990; Zamai et al., Cytometry 14: 891, 1993; Gorczyca et al., Int. J. of Oncology 1: 639, 1992 に記載されるものが含まれる。

【0130】

T細胞拘束及び発生の初期段階に影響を及ぼすポリペプチドのアッセイには、限定されないが、Antica et al., Blood 84: 111, 1994; Fine et al., Cell. Immunol. 155: 111, 1994; Galy et al., Blood 85: 2770, 1995; Toki et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 7548, 1991 に記載されるものが含まれる。

【0131】

胚性幹細胞分化のアッセイ (特に、胚分化造血作用に影響を及ぼすポリペプチドを同定する)には、限定されないが、Johansson et al., Cell. Biol. 15: 141, 1995; Keller et al., Mol. and Cell. Biol. 13: 473, 1993; McClanahan et al., Blood 81: 2903, 1993 に記載されるものが含まれる。

【0132】

幹細胞の生存及び分化のアッセイ (特に、リンパ生成-造血を調節するポリペプチドを同定する)には、限定されないが、『造血細胞の培養 (Culture of Hematopoietic Cells)』R. I. Freshney, et al. 編、巻、265-268頁、ウィリー・リス社、ニューヨーク、N. Y. 1994 の「メチルセルロースコロニー形成アッセイ (Methylcellulose colony form

ing assays)」Freshney, M. G.; Hirayama et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5907-5911, 1992; 『造血細胞の培養 (Culture of Hematopoietic Cells)』R. I. Freshney, et al. 編、巻、23-29頁、ウィリー・リス社、ニューヨーク、N. Y. 1994 の「高い増殖ポテンシャルを有する始原造血コロニー形成細胞 (Primitive hematopoietic colony forming cells with high proliferative potential)」McNiece, I. K. and Briddel, R. A.; Neben et al., Exp. Hematol. 22: 353, 1994; 『造血細胞の培養 (Culture of Hematopoietic Cells)』R. I. Freshney, et al. 編、巻、1-21頁、ウィリー・リス社、ニューヨーク、N. Y. 1994 の「玉石領域形成細胞アッセイ (Cobblestone area forming cell assay)」Ploemacher; 『造血細胞の培養 (Culture of Hematopoietic Cells)』R. I. Freshney, et al. 編、巻、163-179頁、ウィリー・リス社、ニューヨーク、N. Y. 1994 の「ストローマ細胞存在下での長期骨髓培養 (Long term bone marrow cultures in the presence of stromal cells)」Spooncer et al.; 『造血細胞の培養 (Culture of Hematopoietic Cells)』R. I. Freshney, et al. 編、巻、139-162頁、ウィリー・リス社、ニューヨーク、N. Y. 1994 の「長期培養開始の細胞アッセイ (Long term culture initiating cell assay)」Sutherland に記載されるものが含まれる。

【0133】

組織生成活性のアッセイには、限定されないが、特許公開番号WO95/16035 (骨、軟骨、腱); 特許公開番号WO95/05846 (神経、ニューロン); 特許公開番号WO91/07491 (皮膚、内皮) に記載されるものが含まれる。創傷治癒活性のアッセイには、限定されないが、Winter, 『表皮の創傷治癒 (Epidermal Wound Healing)』71-112頁 (Maibach と Rovee 編)、イヤブック・メディカル・パブリッシャーズ (Year Book Medical Publishers) 社、シカゴ (Eaglstain and Mertz, J. Invest. Dermatol 71: 382-84 (1978) による変更) に記載されるものが含まれる。

【0134】

アクチビン/インヒビン活性のアッセイには、限定されないが、Vale et al., Endocrinol. 91: 562, 1972; Ling et al., Nature 321: 779, 1986; Vale et al., Nature 321: 776, 1986; Mason et al., Nature 318: 659, 1985; Forage et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3091, 1986 に記載されるものが含まれる。

【0135】

細胞の運動及び接着のアッセイには、限定されないが、『免疫学の最新プロトコール (Current Protocols in Immunology)』Coligan 編、Pub. グリーン・パブリッシング・アソシエーツ、及びウィリー・インターサイエンス (第6.12章、 α -及び β -ケモカインの測定、6.12.1-6.12.28); Taub et al., J. Clin. Invest. 95: 1370-1376, 1995; Lind et al. APMIS 103: 140, 1995; Muller et al. Eur. J. Immunol. 25: 1744; Gruber et al. J. Immunol. 152: 5860, 1994; Johnston et al. J. Immunol. 153: 1762, 1994 に記載されるも

のが含まれる。

【0136】

止血及び血栓溶解活性のアッセイには、限定されないが、Lin et al., J. Clin. Pharmacol. 26: 131, 1986; Burdick et al., Thrombosis Res. 45: 413, 1987; Humphrey et al., Fibrinolysis 5: 71, 1991; Schaub, Prostaglandins 35: 467, 1988 に記載されるものが含まれる。

【0137】

受容体ーリガンド活性のアッセイには、限定されないが、『免疫学の最新プロトコル (Current Protocols in Immunology)』Coligan 編、Pub. グリーン・パブリッシング・アソシエーツ、及びウィリー・インターサイエンス (第7. 28章、静的条件下での細胞接着の測定、7. 28. 1-7. 28. 22); Takai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6864, 1987; Bierer et al., J. Exp. Med. 168: 1145, 1988; Rosenstein et al., J. Exp. Med. 169: 149, 1989; Stoltenberg et al., J. Immunol. Methods 175: 59, 1994; Stitt et al., Cell 80: 661, 1995 に記載されるものが含まれる。

【0138】

カドヘリンの接着及び侵襲サプレッサー活性のアッセイには、限定されないが、Hortsch et al., J Biol. Chem. 270 (32): 18809, 1995; Miyaki et al., Oncogene 11: 2547, 1995; Ozawa et al., Cell 63: 1033, 1990 に記載されるものが含まれる。

【0139】

本発明により提供されるMPD配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、数多くの診断又は他の有用な目的に使用され得る。本発明のポリヌクレオチド (例えば、配列番号1~26若しくは27をコードするポリヌクレオチド) は、対応するポリペプチドが選好的に発現される組織のマーカーとして、サザンゲル上の分子量マーカーとして、染色体を同定するか又は関連した遺伝子の位置をマップして被検者の内因性DNA配列と比較し、潜在的な遺伝障害を同定するための染色体マーカー若しくはタグとして、ハイブリダイズさせることにより新規な関連ポリヌクレオチドを発見するためのプローブとして、遺伝子フィンガープリンティングのためにPCRプライマーを誘導するための情報源として、他の新規核酸を発見する方法において既知のポリヌクレオチドを「取り去る」ためのプローブとして、抗DNA抗体を産生させるか又は他の免疫応答を誘発するための抗原として、及び、遺伝子治療に使用され得る。

【0140】

プローブとプライマー、開示されるMPDポリヌクレオチド、及びその断片の組合せの使用には、プローブ若しくはプライマーとしての断片の使用がある。一般に、そのような断片は、少なくとも約17の連続したヌクレオチドのDNA配列を含む。他の態様では、DNA断片は、少なくとも30、又は少なくとも60の隣接したヌクレオチドのDNA配列を含む。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を及ぼす基本変数と好適な条件を設計するための手引きは、Sambrook et al., 1989 に示され、上記に詳しく記載されている。遺伝暗号の知識を上記に示されるアミノ酸配列と組合せて使用すれば、縮重オリゴヌクレオチドのセットを調製し得る。そのようなオリゴヌクレオチドは、例えばDNA断片が単離されて同定される、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のプライマーとして有用である。ある種の態様では、縮重プライマーが、非ヒト遺伝子ライブラリーのプローブとして使用され得る。そのようなライブラリーには、限定されないが、cDNAライブラリー、ゲノムライブラリー、及び電子的なEST (発現配列タグ) 若しくはDN

Aライブラリーさえも含まれる。次いで、この方法により同定される相同配列は、本明細書で同定されるMPD配列の非ヒト相同体を同定するためのプローブとして使用され得る。

【0141】

染色体マッピング. MPDポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、これらポリヌクレオチドの開示される断片及び組合せは、既知の技術を使用する当業者により、これらの配列がマップされるヒト染色体を同定するために使用され得る。有用な技術には、限定されないが、オリゴヌクレオチドを含む配列若しくは部分を放射線ハイブリッドマッピング（高い解像度）のような様々な既知技術のプローブとして使用すること、染色体スプレッドへの *in situ* ハイブリダイゼーション（中位の解像度）、及び個別のヒト染色体を含有するハイブリッド細胞系へのサザンブロットハイブリダイゼーション（低い解像度）が含まれる。以下のウェブサイトは、放射線ハイブリッドマッピングに関する追加の情報を提供する：www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/human_STS_releases/july97/07-97.INTRO.html.

本発明のMPDポリペプチド配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとこれらポリヌクレオチドの開示される断片及び組合せは、MPDポリペプチドに対応する遺伝子に関連した異常を分析するために使用され得る。これにより、このマーカーが再配置されるか又は欠失されている状態を識別することが可能になる。さらに、本発明のポリヌクレオチド又はその断片は、位置不明の他の遺伝子をマップするための位置マーカーとして使用され得る。このポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドに対応する遺伝子の欠損、又は不十分な量により（直接的又は間接的に）仲介される障害（例、MPD関連障害）の治療法を開発するときに使用され得る。本明細書に開示されるポリヌクレオチドと関連配列により、欠陥遺伝子の検出と、正常遺伝子でのその置換が可能になる。欠陥遺伝子は、*in vitro* 診断アッセイにおいて、この遺伝子の欠陥部分を収容しているか、又はMPD関連障害を有していることが疑われる被検者に由来する遺伝子の配列と本明細書に開示されるポリヌクレオチド配列の比較により検出され得る。

【0142】

MPDポリペプチドとそのペプチド断片の使用には、限定されないが、以下のものが含まれる：デリバリー用剤；治療及び研究用の試薬；分子量及び等電点電気泳動のマーカー；ペプチド断片化の対照；未知ポリペプチドの同定；及び抗体の調製。

【0143】

本発明のMPDポリペプチド（例、配列番号1～26若しくは27）は、ポリペプチド精製試薬として使用され得る。例えば、MPDポリペプチドは、固形支持体素材へ付けて、アフィニティークロマトグラフィーによりその結合パートナー（例、インテグリン分子）を精製するために使用され得る。特定の態様では、ポリペプチドを従来の方法により固形支持体へ付ける。1例として、ポリペプチドのアミノ酸側鎖と反応する官能基を含有するクロマトグラフィーカラムが利用可能である（ファルマシア・バイオテク社、ピスカタウェイ、NJ）。あるいは、MPD-Fcポリペプチドを、Fc部分との相互作用により、ポリペプチドA-若しくはポリペプチドG-含有クロマトグラフィーカラムへ付ける。このポリペプチドはまた、細胞表面上で結合パートナーを発現する細胞を精製するか又は同定することに使用を見出す。ポリペプチドは、カラムクロマトグラフィーマトリックス、又は類似の好適な基質のような固相へ結合される。例えば、磁気ミクロスフェアをこのポリペプチドで被覆して、インキュベーション容器中で磁場により固定し得る。結合パートナー発現細胞を含有する細胞混合物の懸濁液を、このポリペプチドをその上に有する固相と接触させる。細胞表面上で結合パートナーを発現する細胞が固相上のポリペプチドへ結合してから、未結合細胞が洗浄除去される。他のやり方では、ポリペプチドを検出可能な部分へコンジュゲートさせてから、結合パートナーの発現について試験される細胞とインキュベートし得る。インキュベーションの後で、未結合の標識化物質を除去し、検出可能な部分の細胞上での存在若しくは不在を決定する。

10

20

30

40

50

【0144】

担体及びデリバリー用剤。本発明のポリペプチドはまた、それへ付けた剤を、同定された結合パートナー（例、インテグリン）を担う細胞へデリバリーするための担体としても使用を見出す。このように、このポリペプチドは、*in vitro* 若しくは *in vivo* の方法で、診断若しくは治療用の剤をそのような細胞へデリバリーするために使用され得る。ポリペプチドへ付けることができる検出（診断）及び治療用の剤には、限定されないが、毒素、他の細胞毒性剤、薬物、放射性核種、発色団、比色若しくは蛍光反応を触媒する酵素、等が含まれ、意図される応用に従って、特定の剤が選択される。毒素のなかには、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、緑膿菌の外毒素A、リボソーム不活性化ポリペプチド、トリコテセン（*trichothecenes*）のような真菌毒素と、それらの誘導体及び断片（例、単鎖）がある。診断使用に適した放射性核種には、限定されないが、 ^{123}I 、 ^{131}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、及び ^{76}Br が含まれる。治療使用に適した放射性核種の例は、 ^{131}I 、 ^{211}At 、 ^{77}Br 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{109}Pd 、 ^{64}Cu 、及び ^{67}Cu である。そのような剤は、好適な従来法により、ポリペプチドへ付けることができる。ポリペプチドはアミノ酸側鎖に官能基を含み、これが所望される薬剤の官能基と反応し得て、例えば共有結合を形成する。他のやり方では、ポリペプチド又は剤が、所望される反応性の官能基を産生するか付けるように誘導化され得る。この誘導化は、様々な分子をポリペプチドへ付けるために利用可能な二官能性カップリング試薬（ピアス・ケミカル・カンパニー、ロックフォード、イリノイ）の1つを付けることを含み得る。特に興味深いのは、結合パートナーを発現する細胞をMPDディスインテグリン部分（例、インテグリン）へ標的指向するのに使用され得る、可溶性MPDディスインテグリンである。そのような可溶性MPDディスインテグリンは、例えば、ディスインテグリンのコグネイトインテグリンを発現する細胞へ試薬を標的指向するために使用され得る。同様に、そして以下により詳しく論じるように、MPDポリペプチドに特異的な抗体が、診断若しくは治療用の剤で標識化され、MPDポリペプチドを発現する細胞へその診断若しくは治療剤を標的指向するために使用され得る。

10

20

【0145】

MPDポリペプチドとMPD断片（例、ディスインテグリン及び／又はメタロプロテイナーゼ活性を有する断片）は、ADAMポリペプチド、特にMPDポリペプチドの生物学的活性を *in vitro* 若しくは *in vivo* の方法で変調するときに利用され得る。本発明に含まれるのは、融合ポリペプチドの断片としてか又は成分として発現されるときに、天然のMPD活性を含む、天然のADAMポリペプチド機能の変調因子として作用するMPDポリペプチドのドメインである。例えば、本発明の実質的に精製されたポリペプチドドメインは、MPDポリペプチドの内因性結合パートナーへの結合を阻害するために使用され得る。そのような使用は、有効に、MPDの相互作用を阻止し、MPD活性を阻害するだろう。本発明のなごもう1つの側面では、MPD結合パートナーの可溶性形態（例えば、可溶性インテグリンドメイン）が、内因性MPDポリペプチドへ結合し、その活性化を競合的に阻害するために使用される。

30

【0146】

もう1つの態様では、本発明は、インテグリンを有効量のMPDdisポリペプチドと接触させることを含んでなる、インテグリンのそのリガンドへの結合を阻害し、それによりインテグリンの生物学的活性を阻害する方法へ向けられる。さらに本発明は、有効量のMPDdisポリペプチドを投与することを含んでなる、内皮細胞の遊走を阻害する方法と血管新生を阻害する方法へ向けられる。ある態様では、MPDdisポリペプチドが多量体、好ましくはロイシンジッパー多量体又はFcポリペプチドの形態である。あるいは、実質的に精製されたか又は修飾された本発明のMPDポリペプチドを、MPDポリペプチドと膜結合性ではないMPD結合パートナーとの相互作用を変調するために投与してもよい。

40

【0147】

50

M P Dポリペプチドへ結合する抗体は、M P Dポリペプチドの活性を阻害し得て、アンタゴニストとして作用する可能性がある。例えば、M P Dポリペプチドの1つ以上のエピトープ、又は保存されたM P Dポリペプチドの変異体又は断片のエピトープへ特異的に結合する抗体が、M P D活性を阻害するために使用され得る。「特異的に結合する」とは、M P Dポリペプチド又はその断片への抗体が無関係のポリペプチドとは交差反応しないことを意味する。好ましくは、そのような抗体は、A D A Mファミリーの他のメンバーと交差反応しない。

【0148】

他の側面では、さらに本発明には、高められたディスインテグリン活性が有益である疾患の症状を治療するか又は改善するための、M P D活性のアゴニストの使用が含まれる。好ましい側面では、本発明には、M P Dポリヌクレオチド又はその断片、あるいはM P Dアミノ酸配列（例、配列番号1～26若しくは27）又はその断片を含んでなるポリペプチドを含んでなる組成物を投与することが伴う。投与は、*in vitro*の細胞へ、*ex vivo*の細胞へ、*in vivo*の細胞へ、及び／又は多細胞生物へなされ得る。好ましい治療形態には、ディスインテグリン活性を有するM P Dの可溶性形態が含まれる。そのような可溶性M P Dディスインテグリンポリペプチドは、その結合パートナー（例、インテグリン）へ結合し、その結合パートナーに関連した生物学的活性を刺激する。

【0149】

本発明のなもう1つの側面では、組成物が、疾患の治療のために、宿主生物で発現するM P Dポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを投与することを含む。この点で特に好ましいのは、M P Dポリペプチドの異常な（例えば、減少した）内因性活性に関連した機能不全の治療のための、ヒト被検者における発現である。さらに、本発明には、M P Dアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドの内因性活性を高めることが見出された化合物を細胞及び／又は生物体へ投与することが含まれる。M P Dポリペプチド活性を高める化合物の1つの例は、M P Dポリペプチドへ結合し、構成的な細胞内シグナル伝達（又は「リガンド模倣」）を引き起こすか、又はM P Dポリペプチド活性の天然の阻害剤の結合を妨げることによって、M P Dポリペプチド活性を高めるか又は刺激する抗体、好ましくはモノクローナル抗体である。

【0150】

生物学的経路及び相互作用の多様性及び相互関連性のために、本発明のM P Dポリペプチド、断片、変異体、アンタゴニスト、アゴニスト、抗体、及び結合パートナーは、本明細書でさらに記載されるような、細胞－細胞及び細胞－マトリックス相互作用（例、インテグリン仲介性の障害）、内皮細胞遊走、血管新生、炎症、癌、アレルギー、生殖系、神経系、及び血管系の状態に関連した医学的状态及び疾患を治療するのに有用であり得る。使用される治療用の分子若しくは諸分子は、治療される状態の原因と関与する生物学的経路に依存し、M P Dポリペプチドの様々な変異体、アンタゴニスト、及び結合パートナーが類似しているか又は異なる効果を有する可能性のあることを考慮する。例えば、M P Dポリペプチド又はその断片は、A D A M結合パートナーと相互作用し、メタロプロテイナーゼのその基質への活性を妨げることによって、（例えば、A D A Mファミリーポリペプチドの他のメンバーに由来する）メタロプロテイナーゼのタンパクプロセッシング機能のアンタゴニストとして作用する可能性がある。従って、M P Dは、増殖因子、接着タンパク質、及び炎症性因子の放出のような、タンパクプロセッシングを変調する可能性がある。

【0151】

本明細書に記載される、開示されるM P Dポリペプチド、その断片、抗体、組成物、及び組合せ療法は、細菌、ウイルス、又は原生動物感染症、及びそれから生じる合併症を治療する医薬品において有用である。大動脈瘤；動脈炎；血管閉塞；冠動脈バイパス手術の合併症；虚血／再灌流損傷；心臓疾患；心不全；及び心筋梗塞を含む心臓血管障害が、開示されるM P Dポリペプチド、その断片、抗体、医薬組成物、又は組合せ療法で治療可能である。さらに、本発明のM P Dポリペプチド、その断片、抗体、組成物、及び組合せ療法は、慢性疼痛状態を治療し、様々な内分泌系の障害、胃腸系の状態、生殖泌尿系の障害、

10

20

30

40

50

及び貧血と血液障害を治療するために使用され得る。

【0152】

癌と癌細胞転移を含む細胞増殖障害におけるインテグリン（例、 $\alpha_v \beta_3$ 、 $\alpha_v \beta_5$ 、 β_1 、 β_4 、 α_1 、 α_2 、 α_3 、 α_4 、 α_5 、及び α_6 インテグリン）の役割により、本明細書では、様々な血液学的及び腫瘍学的障害を治療するためにMPDポリペプチド、その断片、抗体、組成物、又は組合せ療法を使用するための方法が提供される。例えば、可溶性MPDディスインテグリンドメインは、急性骨髄性白血病、エプシュタイン-バーウイルス陽性鼻咽癌、グリオーマ、結腸、胃、前立腺、腎細胞、子宮頸部及び卵巣の癌、肺癌（SCLC及びNSCLC）を含む様々な形態の癌、さらには癌関連の悪液質、疲労、無力症、悪液質の腫瘍外症候群、及び高カルシウム血症を、インテグリン関連相互作用を変調することによって治療するために使用され得る。

10

【0153】

本発明のポリペプチド、断片、抗体、組成物、又は組合せ療法で治療可能なさらなる疾患は、肉腫、骨肉腫、及び、腺癌（例、乳癌）及び扁平上皮癌のような癌腫を含む固形腫瘍である。可溶性MPDディスインテグリンドメインの投与は、そのような腫瘍細胞の細胞-細胞及び細胞-マトリックス相互作用を変調し、及び／又は血管新生とそのような腫瘍への血液供給を変調し得る。

【0154】

さらに、MPDポリペプチド、その断片、組成物、又は組合せ療法は、急性骨髄性白血病、慢性若しくは急性リンパ芽球性白血病、及び毛様細胞白血病を含む白血病を治療するのに有用である。MPDポリペプチド、断片、抗体、組成物、及び組合せ療法で治療され得る、侵襲転移の潜在力を有する他の悪性腫瘍には、多発性骨髄腫と、自己免疫リンパ増殖症候群（ALPS）、慢性リンパ芽球性白血病、毛様細胞白血病、慢性リンパ性白血病、末梢T細胞リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、バーキット・リンパ腫、エプシュタイン-バーウイルス陽性T細胞リンパ腫、組織球性リンパ腫、ホジキン病、びまん性攻撃性リンパ腫、急性リンパ性白血病、T-ガンマリリンパ増殖疾患、皮膚B細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫（即ち、菌状息肉腫）、及びセザリ-症候群のような様々なリンパ増殖障害が含まれる。

20

【0155】

少なくとも1つのMPDポリペプチド、その断片、又は抗体、及び1つ以上の抗血管新生因子、又は他の治療剤の組合せ物が被検者へ投与され得る。さらなる治療剤は、MPDポリペプチド、その断片、又は抗体の投与に先行してか、それと同時か、又はその後で投与され得る。1つ以上の治療剤の使用が特に有利であるのは、治療されている被検者が固形腫瘍を有する場合である。本発明のある態様では、治療は、放射線で哺乳動物を治療することをさらに含む。短距離療法と遠隔療法を含む放射線は、MPDポリペプチド、断片、抗体、又はMPD結合パートナー、及び／又は追加の治療剤の投与に先行してか、それと同時か、又はその後で投与され得る。

30

【0156】

ある態様では、本方法には、MPDポリペプチド、その断片、又は抗体に追加する、アルキル化剤、代謝アンタゴニスト、植物アルカロイドと他の植物由来の化学療法剤、抗腫瘍抗生物質、抗腫瘍酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、白金類似体、副腎皮質抑制剤、ホルモン及び抗ホルモン、抗体、免疫治療剤、放射治療剤、及び生物学的応答調節剤からなる群から選択される1つ以上の治療薬の投与が含まれる。

40

【0157】

ある態様では、本方法には、MPDポリペプチド、その断片、又は抗体に加えて、シスプラチン、シクロホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、ブレオマイシン、カルボプラチン、フルオロウラシル、5-フルオロデオキシウリジン、メトトレキセート、タキソール、アスパラギナーゼ、ビンクリスチン、及びビンブラスチン、インターロイキン類、インターフェロン類（ α 、 β 、又は δ ）及びTNFのようなリンホカイン類及びサイトカイン類、クロラムブシル、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ス

50

トレプトゾトシン、ダカルバジン、シタラビン、メルカプトプリン、チオグアニン、ビンデシン、エトポシド、テニポシド、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン、マイトマイシン、L-アスパラギナーゼ、ヒドロキシ尿素、メチルヒドラジン、ミトタン、タモキシフェン、フルオキシメステロン、IL-8阻害剤、アンジオスタチン、エンドスタチン、クリングル5、アンジオポエチン-2又は他のアンジオポエチン-1のアンタゴニスト、血小板活性化因子のアンタゴニスト、塩基性線維芽球増殖因子のアンタゴニスト、並びにCOX-2阻害剤からなる群から選択される1つ以上の治療薬の投与が含まれる。

【0158】

ある態様では、本方法には、MPDポリペプチド、その断片、又は抗体に追加する、Flt3リガンド（米国特許第5,554,512号を参照のこと）、CD40リガンド（米国特許第5,716,805号を参照のこと）、IL-2、IL-12、4-1BBリガンド（米国特許第5,674,704号を参照のこと）、抗4-1BB抗体、TRAIL、TNFアンタゴニストとTNFR/Fcを含むTNF受容体アンタゴニスト、Tekアンタゴニスト、TWEAKアンタゴニスト、及びTWEAK-R（米国特許出願60/172,878及び60/203,347号と、Feng et al., Am. J. Pathol. 154(6): 1253を参照のこと）、TWEAK-R/Fcを含むアンタゴニスト、抗VEGF抗体を含むVEGFアンタゴニスト、VEGF受容体（Flt1及びFlk1、又はKDRとしても知られている、VEGF-R1及びVEGF-R2を含む）アンタゴニスト、CD148（DEP-1、ECRTP、及びPTPRJとも呼ばれる。Takahashi et al., J. Am. Soc. Nephrol. 10: 2135-45, 1999; 及びPCT公開番号WO00/15258, 2000年3月、を参照のこと）結合タンパク質、及びネクチン-3（Satoh-Horikawa et al., J. Biol. Chem. 275(14): 10291, 2000を参照のこと; ヒトネクチン-3核酸とポリペプチド配列のGenBank受託番号は、それぞれAF282874とAAF97597である）アンタゴニストからなる群から選択される、その可溶性形態を含む、1つ以上の治療用ポリペプチドの投与が含まれる。

【0159】

ある好ましい態様では、本発明のMPDポリペプチド、その断片、又は抗体が、Browder et al. and Klement et al. (Cancer Research 60: 1878, 2000; J. Clin. Invest. 105(8): R15, 2000; Barinaga, Science 288: 245, 2000も参照のこと)により記載されるような「メトロノーム (metronomic) 療法」の成分としてか、又はそれと組合わせて使用される。

【0160】

本発明は、医療障害、及び特に、MPD関連障害に罹患している、被検者、好ましくは哺乳動物の被検者、そして最も好ましくはヒト被検者を治療するための化合物、組成物、及び方法を提供する。そのようなMPD関連障害には、MPD配列を有するポリペプチドとその結合パートナー（例、インテグリン）との結合により（直接的若しくは間接的に）引き起こされるか、又は増悪される状態が含まれる。本開示の目的では、「病気」、「疾患」、「障害」、「医学的状态」、「異常状態」、等という用語は、「医療障害」と交換可能に使用される。本明細書で使用される「治療する (treat)」、「治療すること (treating)」、及び「治療 (treatment)」という用語には、治癒、防止（例えば、予防）、及び緩和若しくは改善の治療が含まれる。そのような治療上の使用では、MPDポリペプチド及び断片、MPDポリペプチドをコードするMPDポリヌクレオチド、及び／又は抗体のようなMPDポリペプチドのアゴニスト若しくはアンタゴニストが、必要とする被検者へ、既知の手段により投与され得る。本発明の組成物は、天然のポリペプチド、変異体、誘導體、オリゴマー、及び生物学的に活性な断片のような、本明細書に記載される任意の形態でポリペプチドを含有し得る。特定の態様では、組成物は

、可溶性ポリペプチド、又は可溶性M P D ポリペプチド（例、可溶性M P D ディスインテグリンドメイン）を含んでなるオリゴマーを含む。

【0161】

本発明の治療若しくは使用の方法を実施する場合、本発明の治療剤の治療有効量が、好ましくはM P D ポリペプチドの活性に関連した疾患を治療するか又は改善するために、治療されるべき病気を有する被検者へ投与される。「治療剤」には、限定されないが、任意のM P D ポリペプチド、断片、及び変異体；M P D ポリペプチド、断片、及び変異体をコードするポリヌクレオチド；抗体のようなM P D ポリペプチドのアゴニスト若しくはアンタゴニスト；M P D ポリペプチド結合パートナー；M P D ポリペプチド、断片、変異体、及び結合パートナーから形成される複合体、等が含まれる。本明細書で使用されるように、
「治療有効量」という用語は、意味のある被検者の利益、例えば、関連する医学的状態の
治療、治癒、予防、又は改善、又はそのような状態の治療、治癒、予防、又は改善の速度
の増加を示すのに十分である医薬組成物若しくは方法のそれぞれの治療剤又は他の有効成分
の全体量を意味する。単独で投与される、個別の治療剤若しくは有効成分へ適用される
場合、この用語は、その成分だけを意味する。併用して適用される場合、この用語は、組
合せて、又は連続的若しくは同時に投与されても、治療効果をもたらす成分の組合せた量
を意味する。本明細書で使用されるように、治療剤の「治療有効量を投与する」という用
語は、障害の重症度を反映する少なくとも1つの指標において、改善、及び好ましくは持
続した改善を誘導するのに十分な量で、及び時間の間、被検者が前記治療剤で治療され
ることを意味する。改善が「持続している」とみなされるのは、1週間以上離れた少なくと
も2つの時で被検者が改善を示す場合である。改善の程度は、徴候若しくは症状に基づい
て決定され、決定には、「生活の質（quality of life）」アンケートの
ような、被検者へ与えられるアンケートが利用され得る。被検者の病気の程度を反映する
様々な指標が、治療の量及び時間が十分であるかどうかを判定するために評価され得る。
選択される指標（群）のベースライン値を、治療剤の初回用量の投与に先立つ被検者の検
査により確定する。好ましくは、ベースライン検査は、初回用量を投与する約60日以内
になされる。治療剤が急性症状を治療するために投与されている場合、初回用量は、損傷
が起こってから現実に可能な限りすぐ投与される。改善は、M P D ポリペプチド、断片、
抗体、又はM P D 結合パートナーのような治療剤を投与することによって誘導され、その
とき被検者は、選択された指標（群）についてベースラインを上回る改善を示す。慢性状
態を治療する場合、この改善の程度は、少なくとも1ヶ月以上、例えば1、2、又は3ヶ
月、又はそれより長くか、際限ない期間の間、この医薬品を反復的に投与することによ
って得られる。急性状態を治療するには、1～6週間の期間、または単回用量でさえしばし
ば十分である。被検者の病気の程度は、1つ以上の指標によれば、治療後に改善されたよ
うに見える場合もあるが、治療は、同一レベルで、又は低減された用量若しくは頻度で、
際限なく継続され得る。治療は、いったん低減されるか又は中止されても、症状が再び現
れたならば、元のレベルで再開され得る。

【0162】

当業者は、治療される障害の性質及び重症度、被検者の体重、年齢、一般状態、及び以前
の病気及び／又は治療、及び投与の経路のような要因に依存して、好適な投与量が変化し
得ることを理解されよう。予備用量は動物試験に従って決定され得て、ヒト投与への投与
量のスケールリングは、標準投薬試験のような当技術分野で受け入れられた方法に従って実
施される。例えば、治療有効量は、はじめは細胞培養アッセイから推定され得る。投与量
は化合物の比活性に依存し、定常的な実験法により容易に決定され得る。用量は、毒性を
最小化する一方で、細胞培養において決定されるようなI C₅₀。（即ち、症状の半最大阻
害を達成する試験化合物の濃度）を含む、循環血漿濃度範囲を達成する動物モデルにおい
て定式化され得る。そのような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するた
めに使用され得る。最終的には、担当医が、それぞれの個別患者を治療するのに用いる本
発明のポリペプチドの量を決定する。最初、担当医は、本発明のポリペプチドの低用量を
投与し、被検者の反応を観察する。被検者にとって最適な治療効果が得られるまで、本発

明のポリペプチドのより高用量が投与される場合があり、その時点で投与量はそれ以上増加されない。本発明の方法を実施するために使用される様々な医薬組成物は、体重 kg あたり、約 0.01 ng ～ 約 100 mg (好ましくは約 0.1 ng ～ 約 10 mg 、より好ましくは約 0.1 マイクログラム ～ 約 1 mg) の本発明のポリペプチドを含有すると考えられる。本発明の1つの態様では、本明細書に開示される様々な医療障害を治療するために、MPDポリペプチド、断片、抗体、又はMPD結合パートナーが週に1回投与される。もう1つの態様では、ポリペプチド、断片、抗体、又はMPD結合パートナーが週に少なくとも2回、そしてもう1つの態様では、週に少なくとも3回注射される。注射される場合、MPDポリペプチド、断片、抗体、又はMPD結合パートナーの成人用量での有効量は $1 \sim 20 \text{ mg/m}^2$ の範囲であり、好ましくは、約 $5 \sim 12 \text{ mg/m}^2$ である。あるいは、均一量が投与される場合があり、その量は $5 \sim 100 \text{ mg}$ / 用量の範囲であり得る。皮下注射により投与される均一量の代表的な用量範囲は、 $5 \sim 25 \text{ mg}$ / 用量、 $25 \sim 50 \text{ mg}$ / 用量、及び $50 \sim 100 \text{ mg}$ / 用量である。本発明の1つの態様では、MPDポリペプチド、断片、抗体、又はMPD結合パートナーを 25 mg / 用量で含有するか、又はあるいは、 50 mg / 用量で含有する、注射に許容される調製物を投与することによって、本明細書に記載される様々な適応症が治療される。 25 mg 若しくは 50 mg の用量は、特に慢性状態では、反復的に投与され得る。注射以外の投与の経路が使用される場合、用量は、標準的な医療行為に従って、適正に調整される。多くの事例で、約 25 mg 用量のMPDポリペプチド、断片、抗体、又はMPD結合パートナーを少なくとも3週間の期間に及んで週に1～3回、又は約 50 mg 用量のMPDポリペプチド、断片、抗体、又はMPD結合パートナーを少なくとも3週間の期間に及んで週に1又は2回注射することによって、被検者の状態の改善が得られる(所望される程度の改善を誘導するにはより長い期間の治療が必要となる場合がある)。難治性の慢性状態では、治療方式が際限なく続けられる場合があり、被検者の医師により必要とみなされた場合は、用量や頻度に対して調整がなされる。上記の用量は、18歳以上の人である成人被検者への例である。小児被検者(4～17歳)では、好適な治療方式は、週1回以上の皮下注射により投与される、 0.4 mg/kg 、最大用量 25 mg までのMPDポリペプチド、断片、抗体、又はMPD結合パートナーの皮下注射を伴う。MPDポリペプチドに対する抗体がMPDポリペプチドアンタゴニストとして使用される場合、好ましい用量範囲は $0.1 \sim 20 \text{ mg/kg}$ であり、より好ましくは $1 \sim 10 \text{ mg/kg}$ である。抗MPDポリペプチド抗体のもう1つの好ましい用量範囲は、 $0.75 \sim 7.5 \text{ mg}$ / 体重 kg である。ヒト化抗体が好ましい。そのような抗体は、静脈内で注射されるか又は投与され得る。

【0163】

本発明のMPDポリペプチド(限定されないが、組換え及び非組換えの供給源を含む、どんな供給源からも誘導される)の有効量を、生理学的に許容される希釈剤、担体、又は賦形剤のような他の成分と共に含んでなる組成物が本明細書に提供される。「薬学的に許容される(pharmaceutically)」という用語は、有効成分の生物学的活性の有効性に干渉しない無毒の物質を意味する。投与に適した製剤には、抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、及び、製剤をレシピエントの血液と等張にする溶質を含有し得る、水性及び非水性の無菌注射溶液剤; 及び、懸濁剤若しくは増粘剤を包含し得る水性及び非水性の無菌懸濁液剤が含まれる。ポリペプチドは、薬学的に有用な組成物を調製するために使用される既知の方法に従って製剤化され得る。それらは、単一の活性材料としてか又はある既定の適応症に適した他の知られた活性材料とともに、製剤的に許容される希釈剤(例、生理食塩水、 Tris-HCl 、酢酸塩、及びリン酸緩衝化溶液)、保存剤(例、チメロサル、ベンジルアルコール、パラベン)、乳化剤、可溶化剤、アジュバント、及び/又は担体と混合して組合せられ得る。医薬組成物に適した製剤には、『レミントン製薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)』16版、1980、マック・パブリッシング・カンパニー、イーストン、PAに記載されるものが含まれる。ある態様では、吸着又は摂取を促進するために、ポリペプチドがペジレーション(pegylation)を受ける場合がある。例えば、そのような組成物は、ポリエチ

レングリコール（PEG）、金属イオンと複合され得るか、又はポリ酢酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲル、デキストラン、等のような高分子化合物へ取込まれ得るか、又はリポソーム、マイクロエマルジョン、ミセル、単層若しくは多層の小胞、赤血球ゴースト、又はスフェロプラストへ取込まれ得る。リポソーム製剤に適した脂質には、限定されないが、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リゾレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸、等が含まれる。そのようなリポソーム製剤の調製は、例えば、米国特許第4,235,871号；米国特許第4,501,728号；米国特許第4,837,028号；及び米国特許第4,737,323号に開示されるように、当技術分野の技術レベル内にあり、これらはいずれも参照により本明細書に援用される。そのような組成物は、物理状態、溶解度、安定性、*in vivo* 放出速度、*in vivo* クリアランス速度に影響を及ぼすので、担体の特徴が選択される投与経路に依存するように、意図される適用に従って選択される。本発明の1つの好ましい態様では、MPDポリペプチドの持続放出形態が使用される。開示される方法での使用に適した持続放出形態には、限定されないが、（局所適用ヒドロゲルを含む）そのようなポリマーと混合される（米国特許第6,036,978号に記載されるアルギン酸塩マイクロ粒子のような）遅溶解性の生体適合性ポリマーに被包化されているか、又は生体適合性半浸透性インプラントに封入されているMPDポリペプチドが含まれる。

【0164】

本発明のMPDポリペプチドは、多量体（例、ヘテロ二量体若しくはホモ二量体）、又はそれ自身か他のポリペプチドとの複合体において活性であり得る。結果として、本発明の医薬組成物は、そのような多量体若しくは複合体の形態で本発明のポリペプチドを含み得る。本発明の医薬組成物は、本発明のポリペプチド（群）の複合体の形態であり得る。さらに本発明には、MPDポリペプチド、断片、抗体、又はMPD結合パートナーの、同一の被検者へ投与される1つ以上の他の薬物（それぞれの薬物はその医薬品に適した治療方式に従って投与される）との同時投与が含まれる。「同時投与」には、組合せ物の成分を用いた同時若しくは連続の治療、並びに、薬物に変更されるか、又は1つの成分が長期に投与され、他の成分が間欠的に投与される治療方式も含まれる。成分は、同一又は別個の組成物において、及び、同じか又は異なる投与経路により投与され得る。本発明の医薬組成物に含まれ得る成分の例は、M-CSF、GM-CSF、TNF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-17、IL-18、IFN、TNF0、TNF1、TNF2、G-CSF、Meg-CSF、トロンボポエチン、幹細胞因子、及びエリスロポエチンのような、サイトカイン類、リンホカイン類、又は他の造血因子である。さらに医薬組成物は、ポリペプチドの活性を亢進させるか、又は治療におけるその活性若しくは使用を補填する他の剤を含有し得る。そのような追加の因子及び／又は剤は、本発明のポリペプチドとの相乗効果をもたらすか、又は副作用を最小化するために、医薬組成物に含まれる場合がある。逆に、本発明のMPDポリペプチド、断片、抗体、又はMPD結合パートナーが、サイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血栓溶解若しくは抗血栓溶解因子、又は抗炎症剤の副作用を最小化するために、特定のサイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血栓溶解若しくは抗血栓溶解因子、又は抗炎症剤のある製剤に含まれる場合がある。同時に投与される薬物のさらなる例には、限定されないが、抗ウイルス剤、抗生物質、鎮痛薬、コルチコステロイド、炎症性サイトカインのアンタゴニスト、非ステロイド性抗炎症剤、ペントキシフィリン、サリドマイド、及び、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、硫酸ヒドロキシクロロキン、メトトレキセート、レフルノミド、ミノサイクリン、ペニシラミン、スルファサラジン、及び（経口金、金チオリンゴ酸ナトリウム及びアウロチオグルコースのような）金化合物のような疾患改善抗リウマチ薬（DMARD）が含まれる。さらに、MPDポリペプチド、断片、抗体、又はMPD結合パートナーは、第二のMPDポリペプチド、MPDポリペプチドに対する抗体、又はネーティブなMPDポリペプチドの競合阻害剤として作用するMPDポリペプチド誘導化ペプチドと組合せられ得る。

【0165】

M P D ポリヌクレオチドを含んでなる組成物を含む、M P D ポリペプチド、断片、抗体、又はM P D 結合パートナーを治療的に投与するために、任意の有効な投与経路が使用され得る。非経口投与には、例えば、関節内、静脈内、筋肉内、病巣内、腹腔内、又は皮下の経路を介した、ボーラス注射又は連続注入による注射が含まれる。他の経路には、例えば疾患若しくは損傷の部位での局所投与が含まれる。他の好適な投与の手段には、インプラントからの持続放出；エアゾール吸入及び／又は通気；点眼；膣若しくは直腸の坐剤；頬内調製物；丸剤（p i l l）、シロップ剤、トローチ剤、又はチューイングガムを含む経口調製物；及び、ローション剤、ゲル剤、スプレー剤、軟膏剤、又は他の好適な技術のような局所調製物が含まれる。あるいは、M P D ポリペプチド、断片、抗体、又はM P D 結合パートナーは、このポリペプチドを発現する細胞を埋め込むことによって（例えば、M P D ポリペプチド、断片、抗体、又はM P D 結合パートナーを発現する細胞を埋め込むことによって）デリバリーされ得る。細胞はまた、そのような細胞において増殖するか、又は所望される効果若しくは活性を産生するために、本発明のポリペプチドの存在下、e x v i v o で培養され得る。次いで、処置された細胞を、治療目的のために i n v i v o で導入し得る。もう1つの態様では、M P D ポリペプチド、断片、抗体、又はM P D 結合パートナーをコードするポリヌクレオチドを用いた i n v i v o 若しくは e x v i v o トランスフェクションにより、M P D ポリペプチド、断片、抗体、又はM P D 結合パートナーを産生するように、被検者自身の細胞が誘導される。このポリヌクレオチドは、例えば、M P D ポリペプチド、断片、抗体、又はM P D 結合パートナーをコードする裸のD N A 若しくはリボソーム被包化D N A を注射することによるか、又は他のトランスフェクションの手段により、被検者の細胞へ導入され得る。本発明のポリヌクレオチドはまた、（限定されないが、ウイルスベクターの形態も含まれる）細胞若しくは生物への核酸の導入について知られている他の方法により被検者へ投与され得る。

【0166】

本発明のM P D ポリペプチド、その断片、抗体、又は結合パートナーの治療有効量が経口投与される場合、ポリペプチドは、典型的には、錠剤、カプセル剤、散剤、溶液剤、又はエリキシル剤の形態であり得る。錠剤の形態で投与される場合、本発明の医薬組成物は、ゼラチンのような固形担体か、又はアジュバントを追加的に含有し得る。錠剤、カプセル剤、及び散剤は、約5～95%の本発明のポリペプチド、好ましくは約25～90%の本発明のポリペプチドを含有する。液体の形態で投与される場合、水、石油、落花生油、鉱油、ダイズ油、又はゴマ油のような動物若しくは植物起源の油、又は合成油が追加され得る。医薬組成物の液体形態は、さらに、生理食塩水溶液、デキストロース又は他の糖の溶液、又はエチレングリコール、プロピレングリコール、又はポリエチレングリコールのようなグリコールを含有する場合がある。液体の形態で投与される場合、医薬組成物は、約0.5～90重量%の本発明のポリペプチド、好ましくは約1～50%の本発明のポリペプチドを含有する。

【0167】

本発明のM P D ポリペプチド、断片、抗体、又は結合剤の治療有効量が静脈内、皮膚、又は皮下の注射により投与される場合、ポリペプチドは、発熱物質フリーの、非経口的に許容される水溶液の形態である。p H、等張性、安定性、等を当然考慮する、そのような非経口的に許容されるポリペプチド溶液の調製は、当技術分野の技量内にある。静脈内、皮膚、又は皮下注射に好ましい医薬組成物は、本発明のポリペプチドに加えて、塩化ナトリウム注射剤、リンゲル注射剤、デキストロース注射剤、デキストロース及び塩化ナトリウム注射液、乳酸リンゲル注射剤、又は当技術分野で知られている他の担体のような等張の担体を含有すべきである。本発明の医薬組成物はまた、安定化剤、保存剤、緩衝剤、抗酸化剤、又は当業者に知られている他の添加剤を含有し得る。本発明の医薬組成物を使用する静脈内療法の間は、治療される疾患の重症度とそれぞれの個別被検者の状態と潜在的な特異体質応答に依存して変化する。本発明のポリペプチドの各適用の間は、連続的な静脈内投与の12～24時間の範囲にあると考慮される。最終的には、担当医が静脈内療

法の適正な期間について決定する。

【0168】

組織の修復若しくは再生に有用である本発明の組成物では、治療法には、発熱物質フリーの生理学的に許容される組成物の形態を、局所に、全身に、局部に、又はインプラント若しくはデバイスと一緒に投与することが含まれる。さらに、組成物は、望ましくは、デリバリー用の粘稠な形態で組織損傷部位へ被包化又は注射され得る。さらなる有用な剤も、上記のように、場合により組成物に含まれ得るか、又は本発明の方法で組成物と同時に又は連続的に投与され得る。組成物には、ポリペプチド含有組成物を組織損傷部位へデリバリーすることを可能にし、発達する組織へある構造を提供し、体内へ吸収されることを最適に可能にするマトリックスが含まれ得る。マトリックス材料の選択は、生体適合性、生物分解性、機械特性、美容的外観、及び界面特性に基づく。組成物の潜在的なマトリックスには、硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、及びポリ無水物が含まれる。他の潜在的なマトリックスは、焼結ヒドロキシアパタイト、バイオガラス、アルミン酸塩、又は他のセラミックスのように、非生物分解性で化学的に定義される。マトリックスは、ポリ乳酸とヒドロキシアパタイト、又はコラーゲンとリン酸三カルシウムのように、上記のタイプの材料の組合せから構成され得る。進行は、例えば、X線、組織形態計測決定、及びテトラサイクリン標識化による、組織／骨の増殖及び／又は修復の定期的な評価によりモニターされ得る。

【0169】

M P Dポリペプチド、断片、抗体、又はM P D結合パートナーを含んでなる組成物は、ヒト被検者に加えて、ペット（イヌ、ネコ、トリ、霊長類、等）、家畜動物（ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、トリ、等）のような非ヒト動物の病的状態の治療に有用である。そのような事例では、適正な用量が動物の体重に従って決定され得る。例えば、 $0.2 \sim 1 \text{ mg/kg}$ の用量が使用され得る。他のやり方では、用量が動物の体表面積に従って決定され、例示的な用量は、 $0.1 \sim 20 \text{ mg/m}^2$ 、又はより好ましくは、 $5 \sim 12 \text{ mg/m}^2$ である。イヌ又はネコのような小動物では、好適な用量は 0.4 mg/kg である。1つの態様では、M P Dポリペプチド、断片、抗体、又はM P D結合パートナー（好ましくは、被検者と同じ種から導かれる遺伝子から構築される）が、動物の状態が改善するまで、注射又は他の好適な経路により週1回以上投与されるか、又はそれが際限なく投与され得る。

【0170】

本発明はまた、M P Dポリペプチド、断片、及び変異体；M P Dポリペプチド、断片、及び変異体をコードするポリヌクレオチド；抗体のような、M P Dポリペプチドのアゴニスト若しくはアンタゴニスト；M P Dポリペプチド結合パートナー；M P Dポリペプチド、断片、変異体、及び結合パートナーから形成される複合体、等の、疾患若しくは障害を予防するか又は治療的に処置するための医薬品の製造における使用に関する。

【0171】

本発明によりさらに含まれるのは、1つ以上のM P Dポリペプチド、コードする核酸、及び対応する遺伝子を同定すること、及び／又は特性決定することを含んでなる、M P Dポリペプチドを分析するためのシステム及び方法（これらのシステム及び方法は、好ましくは1つ以上のM P D分子のセットを表すデータセットを含んでなる）、又はその使用である。従って、本発明は、配列番号1～26又は27に示されるような配列を含んでなるポリペプチドからなる群から選択されるメンバー；及び、前記配列の少なくとも1つが配列番号1～27に示されるような配列を含む、ポリペプチド配列のセットをその上に保存したコンピュータ読取り可能な媒体を提供する。

【0172】

本発明の1つの態様は、本発明のポリペプチド又はポリヌクレオチドを分析するために計算環境と選択的に実行される複数のアルゴリズムを含む。A D A Mポリペプチドの分析の例には、限定されないが、セット中のポリペプチドのアミノ酸配列を表示すること、セット中のあるポリペプチドのアミノ酸配列をセット中の別のポリペプチドのアミノ酸配列と

比較すること、セット中のポリペプチドの構造を予測すること、セット中のポリペプチドをコードする核酸のヌクレオチド配列を決定すること、及びセット中のポリペプチドに対応する遺伝子を同定することが含まれる。

【0173】

他に定義されなければ、本明細書で使用されるすべての技術及び科学の用語は、本発明が属する技術分野の当業者により通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に提供される見出し及び小見出しは、いずれも読解を容易にするためだけのものであって、本発明を制限すると解釈されてはならない。本明細書で「使用される「a」、「an」（不定冠詞）と「the」（定冠詞）は、文脈が明らかに単数形を指示することがなければ、複数を含むことを意味する。本明細書に記載されるものと類似若しくは同等の方法及び材料が本発明の実施若しくは試験に使用されうるが、好適な方法及び材料は以下に記載される。本明細書に言及されるあらゆる出版物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、そのまま参照により本明細書に組み込まれる。法的抵触の場合、諸定義を含む本明細書が、それを調整するだろう。さらに、材料、方法、及び実施例は例示のためであって、（本発明を）制限するためのものではない。以下の実施例は特定の態様を例示するものであって、本発明の範囲を制限しない。

【0174】

【実施例】

実施例1：MPDポリペプチドの同定

ヒトゲノムによりコードされることが予測されるアミノ酸配列を含有するデータセットを、Celera Genomics（ロックビル、メリーランド）から受け取った。BLASTアルゴリズムを使用してこのデータセットを検索し、ADAMファミリーポリペプチドを同定した。図1に示されるポリペプチドを、ADAMファミリーのポリペプチドを包含する、メタロプロテイナーゼーディスインテグリンポリペプチドへの実質的な相同性を有するものとして同定した。

【0175】

実施例2：RACE分析

MPDポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、cDNAエンドの迅速増幅（RACE）分析により同定する。すべてのRACE産物をベクターへクローン化し、配列決定する。RACE産物の配列分析により、実質的に同一な配列を有する多数のクローンが提供される。RACE分析キットは、Roche・Molecular・Systemsを含む多数の企業から利用可能である。RACE産物比較により見出されたコンセンサス配列に基づいて、プライマーを設計した。

【0176】

図1のポリペプチド配列から逆転写されたヌクレオチドを含んでなるプライマー対を使用して、リンパ節細胞、骨髓細胞、並びに当技術分野で知られている他の細胞型からのcDNAライブラリーをPCR増幅する。生じたPCR産物をクローン化し、標準プロトコルを使用して配列決定する。

【0177】

図1に提供されるMPD配列の分析は、すべての配列が、ADAMファミリーのポリペプチドのメンバーを含む、メタロプロテイナーゼ及び／又はディスインテグリン含有タンパク質への相同性を含有することを示す。例えば、配列番号4～5、10、14、21～22、及び25～26は、それぞれ、残基208ないし219、15ないし26、229ないし240、555ないし566、3ないし14、269ないし280、及び154ないし165で、配列HexGHxxGxxHD（配列番号28）を含む。配列番号24は、保存されたHexGHxxGxxHDモチーフへの実質的な同一性を有する配列を含む。従って、配列番号4、5、10、14、21、22、24、25、又は26を含んでなるポリペプチドは、メタロプロテイナーゼ活性を有すると予測される。配列番号4、8、10、14、18～19、21、及び25、並びにいくつかの既知メタロプロテイナーゼは、LNIX（I/V）（A/V）LVGLE（V/I）WTを含んでなる配列への相同性

を共有するので、配列番号 4、8、10、14、18～19、21、及び 25 を含んでなるポリペプチドは、メタロプロテイナーゼ活性を有すると予測される。本発明はまた、TMD C I I I、TMD C I V A、及び TMD C I V C を含む、精巢メタロプロテイナーゼ様、ディスインテグリン様、システインリッチ (TMD C) タンパク質ファミリーへの高度の相同性を有する配列番号 2、3、7、9、17、20、及び 27 を提供する。上記の表 1 は、本発明の代表的なポリペプチドの、TMD C タンパク質ファミリーメンバーとの相対的な同一性を示す。

【0178】

TMD C ファミリーメンバーへの相同性を有する上記の配列だけでなく、図 1 の多数のポリペプチドは、ADAM (ディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ) ファミリーのタンパク質への相同性を有する。そのようなポリペプチドには、高度に保存された H E x G H x x G x x H D モチーフ (配列番号 28) 及び／又は L N I x (I/V) (A/V) L V G L E (V/I) W T モチーフ (配列番号 29) を有することで特徴づけられる、メタロプロテイナーゼドメインが含まれる。例えば、配列番号 4、10、14、21、25、及び 26 は、ほぼ配列番号 4 の 65 ないし 274；配列番号 10 の 24 ないし 235；配列番号 14 の 85 ないし 290；配列番号 21 の 202 ないし 411；配列番号 25 の 123 ないし 332；及び配列番号 26 の 118 ないし 215 のアミノ酸残基配列を含む。

【0179】

図 1 の多数のポリペプチドは、配列 C G N (G/K) x (L/V) (E/D) x (G/N) E E C D C G (配列番号 30) (本明細書では、以下、「C G N-G E E C」モチーフ) を有する保存されたモチーフを含有することで典型的に特徴づけられるディスインテグリンドメイン配列への相同性を有する。例えば、配列番号 4、10、14、21、及び 24～26 は、C G N-G E E C モチーフを含有するので、配列番号 4、10、14、21、24、25、又は 26 を含んでなるポリペプチドは、ディスインテグリン活性を有すると予測される。配列番号 11 は、残基 43 ないし 57 に推定 C G N-G E E C 配列を有するので、配列番号 11 を含んでなるポリペプチドは、ディスインテグリン活性を有すると予測される。さらに、ADAM ファミリーのタンパク質は、そのディスインテグリン及びシステインリッチドメインに多数の保存されたシステイン残基を有するものとして特徴づけられる。例えば、配列番号 6、8、12、13、16、及び 23 を多数の ADAM ファミリーメンバー (例えば、ADAM9 (受託番号 003807)) と並列させると、そのような ADAM ファミリーメンバーのディスインテグリンドメイン中にある保存されたシステイン残基が同じ位置に並ぶ。上記の表 2 は、本発明のポリペプチドのいくつかのドメインを特徴づける関連するドメイン及び残基の概要を提供する。

【0180】

M P D ポリペプチド配列の変異体は、本明細書に提供される配列に基づいて同定され得る。M P D アミノ酸配列に対するアミノ酸の置換と他の変化 (欠損、挿入、等) は、それが図 1 に示されるようなアミノ酸配列の保存された残基へ変化をもたらし、そして特にその変化が (脂肪族残基 - A l a、G l y、L e u、I l e、又は V a l のいずれか 1 つを別の脂肪族残基で置換することのように) 類似構造のアミノ酸を置換するのでなければ、M P D ポリペプチド活性を変化させるか又は破壊する可能性がより高いと予測される。逆に、M P D アミノ酸配列に対して、他の M P D ポリペプチド配列の 1 つに由来する、並列のその位置での残基の置換をもたらす変化がなされるならば、そのような変更が変化した M P D ポリペプチドの機能に影響を及ぼす可能性はより少ないだろう。

【0181】

実施例 3：本発明のポリペプチドへ結合するモノクローナル抗体

米国特許第 4, 411, 993 号に記載されるような慣用技術を使用して、実質的に精製された M P D ポリペプチドを使用して、それと免疫反応するモノクローナル抗体を産生することができる。完全フロイントアジュバントで乳化した M P D ポリペプチド免疫原でマウスを免疫化し、10～100 µg の範囲の量で皮下又は腹腔内に注射する。10～12

10

20

30

40

50

日後、この免疫化マウスを、不完全フロイントアジュバントで乳化した追加のMPDポリペプチドで追加免疫する。その後、1週～2週に1回の免疫化スケジュールで、マウスを定期的に追加免疫する。後眼窩出血又は尾先端切除により血清サンプルを定期的に採取し、ドットプロットアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着検定）、又はMPDポリペプチドのMPDポリペプチド結合パートナーへの結合の阻害により、MPDポリペプチド抗体を試験する。

【0182】

適正な抗体価の検出後、ポジティブ動物に、MPDポリペプチド／生理食塩水の静脈内注射を最後に1回与える。3～4日後、動物を屠殺し、脾臓細胞を採取し、脾臓細胞をマウス骨髓腫細胞系、例えばNS1、又は好ましくはP3x63Ag8.653（ATCC CRL 1580）へ融合させる。融合によりハイブリドーマ細胞が産生され、これを、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するHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン）選択培地のマルチプル・マイクロタ イタープレートで培養する。

【0183】

ハイブリドーマ細胞を、Engvall et al., (Immunochem. 8: 871, 1971) 及び米国特許第4,703,004号に開示される技術の適用により、実質的に純粋なMPDポリペプチドに対する反応性についてELISAで選択する。好ましいスクリーニング技術は、Beckmann et al., (J. Immunol. 144: 4212, 1990) に記載される抗体捕捉技術である。ポジティブなハイブリドーマ細胞を同系BALB/cマウスへ腹腔内注射し、高濃度の抗MPDモノクローナル抗体を含有する腹水を産生し得る。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、様々な技術によりフラスコ若しくはローラーボトルにおいて *in vitro* で増殖させ得る。マウス腹水中に産生されるモノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿に次いで、ゲル排除クロマトグラフィーにより精製され得る。他のやり方では、ポリペプチドA若しくはポリペプチドGへの抗体の結合に基づいたアフィニティークロマトグラフィーが、MPDポリペプチドへの結合に基づいたクロマトグラフィーと同じように使用され得る。

【0184】

実施例4：染色体マッピング

PCRをベースとするマッピング戦略を使用して、MPDポリペプチドに対応する遺伝子をマップする。実施例8に記載されるようなMPD特異的PCRプライマーとBIOSラボラトリーズ（ニューヘーヴン、CT）からのBIOS体細胞ハイブリッドPCR可能DNAキットを、製造業者の指示に従って使用して、最初のヒト染色体帰属（assignment）を行う。Genebridge 4 放射線ハイブリッドパネル（リサーチジェネティクス、ハンツビル、AL）（例えば、Walter, MA et al., Nature Genetics 7: 22-28, 1994 を参照のこと）を使用して、より詳細なマッピングを実施する。次いで、この分析からのデータを、MIT放射線ハイブリッドマッパー（Radiation Hybrid Mapper）（<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>）へ、そこに含まれる指示に従って、電子的に提示する。この分析から特定の遺伝子マーカー名称が生まれ、これをNCBI: (ncbi.nlm.nih.gov/genemap) へ電子的に提示すると、特定の染色体間隔が産生される。

【0185】

実施例5：角膜ポケットアッセイにおけるMPD-ディスインテグリンポリペプチドの活性

Fcへ融合したMPDディスインテグリンドメイン（MPDdis-Fcポリペプチド）をコードするポリヌクレオチドを構築するために、例えば、配列番号6；ほぼ残基43ないし148の配列番号6；ほぼ残基1ないし366の配列番号8；ほぼ残基38ないし366の配列番号8；配列番号11；配列番号13；ほぼ残基1ないし622の配列番号14；ほぼ残基84ないし622の配列番号14；ほぼ残基299ないし622の配列番号

10

20

30

40

50

14；配列番号16；ほぼ残基1ないし701の配列番号21；配列番号23；配列番号24；ほぼ残基278ないし435の配列番号24；ほぼ残基1ないし627の配列番号25；配列番号26；又はほぼ残基224ないし383の配列番号26のアミノ酸残基のようなディスインテグリンドメインをコードし、CGN-GEEC配列から始まり、膜貫通ドメインを示唆する疎水性配列の前で終わる核酸を、Fcポリペプチドをコードする核酸配列へ融合する。この構築体は、シグナルペプチダーゼによりC末端G（グリシン）アミノ酸の後で切り離されるIgKappaリーダーを使用し得る。従って、この分子の可溶性は、この残基の後から始まると予測される。制限部位のコドンに対応する数個の残基は、ディスインテグリンドメインをFcドメインへ連結させるために使用されるディスインテグリンドメインのいずれかの末端に存在し得る。

10

【0186】

マウス角膜ポケットアッセイは、MPDdis-Fcポリペプチドによる血管新生の阻害をin vivoで定量化するために使用される。このアッセイでは、血管新生若しくは抗血管新生の活性について試験される剤がハイドロン（hydron）ペレット中に徐放性形態で固定化され、麻酔されたマウスの角膜上皮中に創出されるマイクロポケットへ埋め込まれる。血管形成された角膜縁から正常に無血管角膜への増殖における血管の外観、密度、及び程度として血管形成を測定する。

【0187】

Kenyon et al., Invest Ophthalmol. & Visual Science 37: 1625, 1996に記載されるようなハイドロンペレットは、スクラルファートを、bFGF（90ng／ペレット）、bFGF及びIgG（11μg／ペレット、対照）、又はbFGFと、ある濃度範囲の試験される剤（例えば、MPDdis-Fcポリペプチド）とともに取込む。このペレットを、6～8週齢の雄C57BLマウスの後角膜縁に対して1mm内側でのマイクロ切開により創出した角膜固有質マイクロポケットへ外科的に埋め込む。5日後、bFGFへの新血管形成応答のピーク時に、Zeissスリットランプを使用して、ペレットを含有する角膜経線の極軸から35～50°の初期角度で角膜を写真撮影する。映像をデジタル化し、減法混色フィルター（Adobe Photoshop 4.0）により処理し、ヘモグロビン含量により、構築された微小血管の輪郭を描く。映像分析ソフトウェア（バイオクォント、ナッシュビル、TN）を使用して、血管形成されている角膜映像の分画、血管形成領域中の血管密度、及び全角膜内の血管密度を計算する。bFGF誘導性角膜血管新生の阻害を、MPDディスインテグリン-Fcポリペプチドの用量の関数として決定する。

20

30

【0188】

実施例6：マウス移植モデルにおけるMPDディスインテグリンポリペプチドによる新血管形成の阻害

あるマウスドナーから他の遺伝的に類似したマウスの耳の皮膚へ異所的に移植された心臓組織が生存するには、心筋機能の生存及びエネルギーを高めるために、移植された心臓と周囲の組織による十分な新血管形成が必要とされる。移植部位での不十分な血管構造は、この心臓への過度の虚血、組織損傷、及び、組織の生着の失敗を引き起こす。内皮細胞遊走及び血管形成に関与する因子に拮抗する剤は、移植部位での血管新生を減少させることにより、移植片の機能、最終的には生着そのものを制限する。マウス異所性心臓同種移植モデルを使用して、新血管形成に対するMPDdis-Fcポリペプチドのアンタゴニスト効果を判定する。

40

【0189】

雌BALB/c（約12週齢）レシピエントへ、同系のドナーマウス由来の新生心臓移植片を与える。0日目に、ドナー心臓組織をレシピエントの左耳介へ移植し、このマウスを2つの群へ分ける。対照群にはヒトIgG（Hu IgG）を、他の群にはMPDdis-Fcを、いずれも腹腔内に与える。この処置は5日間連続する。生着後7日目と14日目に、目に見える拍動機能をモニターすることによって、移植片の機能性を判定する。機能的な生着の阻害を、MPDdis-Fcの用量の関数として決定する。移植部位での浮

50

腫と宿主及びドナーの組織血管構造に対するMPDdis-Fcの効果を視覚化するために、（例えば、V I I I 因子染色を使用して）移植された心臓の組織学を検査する。

【0190】

実施例7：MPDディスインテグリン（MPDdis）ポリペプチドを用いた腫瘍の処置
MPDdis-Fcを固形腫瘍の動物モデルで試験する。腫瘍の頻度と腫瘍の成長を測定することによってMPDdis-Fcの効果を判定する。MPDdis-Fcの生物学的活性はまた、カルシウム可動化アッセイや血小板の活性化、動員、又は凝集を測定するアッセイのような、当技術分野で知られている他の *in vitro*、*ex vivo*、及び *in vivo* アッセイでも証明される。

【0191】

実施例8：MPDポリペプチドの組織発現

MPDポリペプチドコーディング領域に対応するオリゴヌクレオチドは、ヒトの組織及び細胞系のcDNA（「MTC cDNA」、クローンテク）のパネルを使用して、MPD mRNAの発現を評価するために使用され得る。所望される長さの予測されるコーディング領域断片を増幅するために、前方プライマーと逆プライマーを設計する。所望される長さの増幅されたDNA断片の存在により裏付けられるような、MPD mRNAを発現した組織及び細胞系を同定する。本発明のMPDポリペプチドはどんな組織でも発現されるわけではないので、本発明は、本発明のポリペプチドへの抗体を活用するか、又は本発明のポリヌクレオチドに特異的なオリゴヌクレオチドのプライマー若しくはプローブを活用することによって、組織型を決定する方法を提供する。

【0192】

従って、前方プライマー：5'-CTGCTGCTGTGGCTGGGAGTG-3'（配列番号43）と逆プライマー：5'-GTCAATACCCAAATTA TGACCAAGCTCAGG-3'（配列番号44）を使用して、以下の組織が配列番号8をコードする配列を有するmRNAを発現することを見出した：胎盤、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、胃、リンパ節、心臓、肺、結腸、腺癌、胎児肝臓、胎児肺、胎児脾臓、胎児骨格筋、胎児胸腺、胎児腎臓、前立腺、胸腺、卵巣、白血球、及び食道。

【0193】

前述の発明を明瞭な理解のために例示及び実施例によりやや詳しく記載したが、当業者には、本発明の教示に照らせば、これに対してなし得るある種の変更及び改良が付帯の特許請求項の精神若しくは範囲から逸脱しないことが明瞭であろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明のポリペプチド配列を1文字アミノ酸コードで示す。「X」は、任意のアミノ酸か又は複数の任意アミノ酸を表す。

10

20

30

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/10406 A2

- (51) International Patent Classification: **C12N 15/57**,
9/64, C07K 16/40, G01N 33/68, A61K 38/43, G06F
LSAO: 19/00
- (21) International Application Number: PCT/US01/23734
- (22) International Filing Date: 27 July 2001 (27.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 28 July 2000 (28.07.2000) US
60/221,838
- (71) Applicant (for all designated States except US): **IMMUNEX CORPORATION** [US/US]; 51 University
Street, Seattle, WA 98101 (US).
- (72) Inventors and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **DUBOSE, Robert**,
F. [US/US]; 6151 156th Place SE, Bellevue, WA 98006
(US); **WILKIN, Steven, R.** [US/US]; 1511 11th Avenue
West #8, Seattle, WA 98119 (US); **BLACK, Ray, A.**
[US/US]; 8062 30th Avenue NE, Seattle, WA 98115 (US).
- (74) Agent: **BAKER, Joseph, R.**, Immunex Corporation, Law
Department, 51 University Street, Seattle, WA 98101 (US).
- (81) Designated States (nationally): AP, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GR, GU,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OL, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.
- (84) Designated States (regionally): ARIPO patent (GT, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).
- Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report
entirely in electronic form (except for this front page) and
available upon request from the International Bureau
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning
of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/10406 A2

(54) Title: METALLOPROTEINASE-DISINTEGRIN POLYPEPTIDES AND METHODS OF MAKING AND USE THEREOF

(57) Abstract: Provided is a new disintegrin polypeptide, methods of making such polypeptides, and methods of using them to treat disintegrin associated disorders and conditions and to identify agents that modulate Metalloproteinase/Disintegrin polypeptide activities.

WO 02/10406

PCT/US01/23734

TITLEMETALLOPROTEINASE-DISINTEGRIN POLYPEPTIDES AND METHODS OF
MAKING AND USE THEREOFCROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims the benefit under 35 U.S.C. §119 of U.S. Provisional Application Serial Number 60/221,838, filed 28 July 2000, the disclosure of which is incorporated herein by reference.

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to polypeptides having homology to the human Metalloproteinase-Disintegrin polypeptide family, to polynucleotides encoding such polypeptides, and to methods of making and use thereof.

BACKGROUND

The Metalloproteinase-Disintegrin polypeptides, also referred to herein as ADAM ("A Disintegrin And Metalloproteinase domain") polypeptides or "ADAMs," are a related group of multi-domain, type I membrane polypeptides. Certain members of the ADAM family of polypeptides are highly expressed in some cell types including, for example, reproductive tissue or muscle cells. In addition, members of the ADAM family of polypeptides are generally constitutively expressed throughout development.

A number of ADAM genes have now been identified, including fertilin α and β (involved in the integrin mediated binding and fusion of egg and sperm; previously known as PH-30 α and β), epididymal apical protein I, cysteinin, MDC (a candidate for tumor suppressor in human breast cancer), meltrin- α (mediates fusion of myoblasts in the process of myotube formation), MS2 (a macrophage surface antigen), and metargidin. In addition, a new ADAM family gene, named ADAMTS-1, containing a disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin (TSP) motifs, has been shown to be closely associated with various inflammatory processes, as well as development of cancer cachexia (Kuno, K. *et al.*, J. Biol. Chem. 272:556-562 (1997)). A new member of ADAM in Drosophila, called the kuzbanian gene ("KUZ"), was found to be involved in Drosophila neurogenesis (Rooke, J. *et al.*, Science 273:1227-1231 (August 1996)).

Typical ADAM family polypeptides are cell surface polypeptides that consist of pro-, metalloprotease-like, disintegrin-like, cysteine-rich, epidermal growth factor-like repeat, transmembrane and cytoplasmic domains. In some ADAMs the metalloproteinase domain is believed to be involved in protein processing functions such as release of growth factors, adhesion

WO 02/10406

PCT/US01/23734

proteins, and inflammatory factors. The disintegrin domain may play a role in integrin-mediated cell adhesion (cell to cell and cell to matrix) interactions, such as platelet aggregation, migration of tumor cells or neutrophils, and angiogenesis. These activities of the ADAM family of polypeptides are most likely mediated through interactions with the substrates of the metalloproteinase and with integrins, with the substrates of the metalloproteinase binding to the metalloproteinase catalytic domain and integrins binding to the disintegrin domain of the ADAM family of polypeptides. Because of their suspected roles in mediation of protein processing functions such as release of growth factors, adhesion proteins, and inflammatory factors and cell adhesion, the ADAM family of polypeptides are suspected of being associated with inflammation, cancer, allergy, reproductive, and vascular conditions. Characteristics and activities of the ADAM polypeptide family are described further in Black, R.A. and White, J.M., 1998, Curr. Opin. in Cell Biol. 10: 654-659; and in Schlondorff, J. and Blobel, C.P., 1999, J. Cell Sci. 112: 3603-3617; which are incorporated by reference herein.

SUMMARY OF THE INVENTION

Provided herein for the first time are polypeptide sequences having homology to metalloproteinase-disintegrin (MPD) polypeptides and to the ADAM ("A Disintegrin And Metalloproteinase") polypeptide family and functional domains contained in the ADAM family of polypeptides as well as methods of making and methods of use thereof.

The present invention provides a substantially purified polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID Nos: 3-4, and 6-27; fragments of SEQ ID NO:6 having disintegrin activity; fragments of SEQ ID NO:8 having disintegrin activity; fragments of SEQ ID NO:14 having disintegrin activity; fragments of SEQ ID NO:24 having metalloproteinase activity; fragments of SEQ ID NO:24 having disintegrin activity; SEQ ID NO:6 from about residue 43 to 148; SEQ ID NO:8 from about residue 1 to 366; SEQ ID NO:8 from about residue 38 to 366; SEQ ID NO:14 from about residue 1 to 622; SEQ ID NO:14 from about residue 84 to 622; SEQ ID NO:14 from about residue 299 to 622; SEQ ID NO:21 from about residue 1 to 701; SEQ ID NO:24 from about residue 1 to 277; SEQ ID NO:24 from about residue 278 to 435; SEQ ID NO:25 from about residue 1 to 332; SEQ ID NO:25 from about residue 1 to 627; SEQ ID NO:26 from about residue 1 to 215; SEQ ID NO:26 from about residue 118 to 215; SEQ ID NO:26 from about residue 224 to 383; and SEQ ID NO:27 from about residue 29 to 574.

The invention also provides a substantially purified polypeptide comprising a sequence that is at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, or at least 97% homologous to a sequence as set forth in SEQ ID NO:3-4, 6-11, 13-18, 20, or 23-27 wherein the polypeptide has a metalloproteinase or disintegrin activity.

WO 02/10406

PCT/US01/23734

The invention further provides a polypeptide, as set forth above, linked to a second polypeptide, wherein the second polypeptide is a leucine zipper polypeptide, an Fc polypeptide, or a peptide linker moiety.

5 The invention further includes an isolated polynucleotide encoding a polypeptide of as set forth above, as well as vectors comprising the polynucleotide, and recombinant host cells comprising a polynucleotide of the invention.

The invention also provides a method for producing a polypeptide, comprising culturing a host cell containing a polynucleotide of the invention under conditions promoting expression of the polypeptide.

10 The invention further provides a polypeptide produced by culturing a host cell comprising a polynucleotide of the invention under conditions to promote expression of the polypeptide.

The invention provides a substantially purified antibody that specifically binds to a polypeptide of as set forth above. In one embodiment, the antibody is a monoclonal antibody. In another embodiment, the antibody is a human or humanized antibody.

Also provided by the invention is a method of designing an inhibitor or binding agent of a polypeptide as set forth above or herein, comprising determining the three-dimensional structure of the polypeptide, analyzing the three-dimensional structure for binding sites of substrates or ligands, designing a molecule that is predicted to interact with the polypeptide, and determining the inhibitory or binding activity of the molecule.

15 The invention further provides a method for identifying an agent that modulates an activity of a polypeptide as set forth herein, comprising contacting the agent with the polypeptide under conditions such that the agent and the polypeptide interact; and determining activity of the polypeptide in the presence of the agent compared to a control (e.g., the polypeptide in the absence of the agent) wherein a change in activity is indicative of an agent that modulates the polypeptide's activity. In one embodiment, the activity of the polypeptide is selected from the group consisting of disintegrin activity, cell adhesion activity, angiogenic activity, metalloproteinase activity, and a combination thereof (e.g., metalloproteinase and disintegrin activity). In another embodiment, the agent is selected from the group consisting of an antibody, a small molecule, a peptide, and a peptidomimetic.

20 The invention also provides a method for modulating angiogenesis in a cell or mammal, comprising contacting or administering to the cell or mammal a polypeptide of the invention as set forth herein in an amount effective to modulate disintegrin activity. The cell may be contacted *in vitro* or *in vivo*.

Also provided by the invention is a method for modulating endothelial cell migration, comprising contacting the endothelial cell with a polypeptide of the invention, as set forth herein.

The invention provides a method of inhibiting the binding of an integrin to a ligand comprising contacting or administering to a cell or mammal that expresses the integrin an effective

WO 02/10406

PCT/US01/23734

amount of a polypeptide having disintegrin activity. In one embodiment, the mammal is afflicted with a condition selected from the group consisting of ocular disorders; malignant and metastatic conditions; inflammatory diseases; osteoporosis and other conditions mediated by accelerated bone resorption; restenosis; inappropriate platelet activation, recruitment, or aggregation; thrombosis; and a condition requiring tissue repair or wound healing.

The polypeptides of the invention and the methods of the invention include polypeptides in the form of a multimer (e.g., a dimer or trimer). The multimer can comprise an Hc polypeptide, a leucine zipper, or a peptide linker.

The invention further provides a system for analyzing polypeptides or polynucleotides of the invention comprising a data set representing a set of one or more polypeptides as set forth herein; a computer; and a computer algorithm in an executable format on the computer for analyzing the polypeptides.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows polypeptide sequences of the invention in single letter amino acid code. "X" represents any amino acids or a plurality of any amino acids.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention provides polypeptides having or predicted to have metalloproteinase and/or disintegrin activity. These metalloproteinase-like/disintegrin-like (MPLD) polypeptides find use in the treatment and diagnosis of integrin-associated and metalloproteinase-associated diseases and disorders and well as use in the development of diagnostics and related therapeutics.

Matrix metalloproteinases (MMPs) compose a family of structurally similar zinc-dependent enzymes that degrade all of the major components of the extracellular matrix and play a major role in tissue remodeling and repair associated with development and inflammation (Maresian, Trends Genet. 6:121-125, 1990; and Woessner, FASEB J. 5:2145-2154, 1991). MMPs include the collagenases, gelatinases A and B, the stromelysins, matrilysin, metalloelastase, and the membrane-type matrix metalloproteinases. Over-expression and activation of MMPs have been linked with a range of diseases, such as arthritis, cancer, and multiple sclerosis. MMPs classically have been implicated in basement membrane destruction associated with late-stage tumor cell invasion and metastasis, one MMP member, matrilysin, has been shown to be expressed in early stage human colorectal tumors. (Wilson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1402-1407, 1997). Abnormal expression of MMPs can contribute to destructive processes including tumor invasiveness (Mignatti and Rifkin, Cell 47:487-498, 1986; and Khokha *et al.*, Science 243:947-950, 1989), arthritis (Dean *et al.*, J. Clin. Invest. 84:678-685, 1989; and McCachren, Arthritis Rheum. 34:1085-1093, 1991), and atherosclerosis (Henney *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8154-8158, 1991). The metalloproteinases identified herein are candidate proteins contributing

WO 02/10406

PCT/US01/23734

to the pathogenesis of, for example, inflammatory diseases and disorders. Accordingly, the metalloproteinase polypeptides provided herein can be used to treat inflammatory disorders and as a source for the development of inhibitors both *in silico* and *in vitro*. Inhibitors to the metalloproteinases provided herein can ameliorate diseases and disorders associated with excessive proteinase activity including, for example, inflammation.

The disintegrin domain of ADAM family proteins functions in the prevention of integrin-mediated cell to cell and cell to matrix interactions, such as platelet aggregation, adhesion, and migration of tumor cells or neutrophils, and angiogenesis. Previously described disintegrins, such as contortrostatin (Trikha *et al.*, Cancer Research 54:4993-4998, 1994) have been used to inhibit human metastatic melanoma (M24 cells) cell adhesion to type I collagen, vitronectin, and fibronectin, but not laminin. Further, contortrostatin inhibits lung colonization of M24 cells in a murine metastasis model.

The structure of most metalloproteinase-disintegrin polypeptides includes a signal domain, a metalloproteinase domain, a disintegrin domain, a transmembrane domain and a cytoplasmic domain. For example, the typical structural elements common to various members of the ADAM family of polypeptides include, in N-to-C order, a signal sequence, a prodomain, a metalloproteinase domain, a disintegrin domain, a cysteine-rich domain, a transmembrane domain, and a cytoplasmic domain. There are certain key residues within the metalloproteinase domains/motifs (*e.g.*, the HExGHxxGxxHD motif (SEQ ID NO:28)) such that substitutions of those extremely conserved residues are likely to be associated with an altered function or lack of function for the polypeptide. ADAMs with the conserved metalloprotease active site sequence of SEQ ID NO:28 include ADAMs 1, 8-10, 12-13, 15-17, 19-21, 24-26, 28, and 30. The metalloproteinase catalytic domains also contain four conserved cysteines that may be required for the formation of a functional polypeptide structure through disulfide bonds. There are 31 highly conserved cysteines in the disintegrin and cysteine rich region; almost all of the ADAM family of polypeptides have those 31 cysteines. The skilled artisan will recognize that the boundaries of these regions within the polypeptides are approximate and that the precise boundaries of such domains (which can be predicted by using computer programs available for that purpose) can differ from member to member within the ADAM family of polypeptides.

The ADAM family of polypeptides is reasonably well conserved, with the human family members similar to each other and to ADAM family members from other species such as mouse, rat, and even *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* (see, *e.g.*, Yamamoto *et al.*, Immunol. Today, 20(6):278, 1999; and the following Internet websites for more information (www): gene.ucl.ac.uk/users/hester/rctalo.html; uta.fi/~loikka/ADAMs/HADAMs.html; and people.Virginia.EDU/~jag6n/Tabl_e_of_the_ADAMs.html). However, subfamilies of the ADAM family of polypeptides can be defined on the basis of sequence similarity and related biological activities. One such subfamily comprises the ADAM10 and ADAM17/TACE polypeptides, which

WO 02/10406

PCT/US01/23734

show greater sequence similarity to each other compared to other members identified so far within the ADAM family of polypeptides. ADAMs 10 and 17 have 21 cysteines in the disintegrin-cysteine rich region in contrast to the 31 conserved cysteines in this region among the other ADAMs. Accordingly, ADAMs may have from 20 to 31 conserved cysteines (*e.g.*, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, or 31 conserved cysteines). ADAM17/TACE and ADAM-10 are also "shedases," meaning they are believed to cleave and release the extracellular domains of other membrane proteins. The major function of another subfamily may be to bind integrins or other proteins. ADAM-2, for example, is processed to remove both the prodomain and the metalloproteinase catalytic domain so as to expose the disintegrin domain and allow it to bind to its cognate. Another subfamily that can be defined are the ADAMs that appear to be testis-specific; these proteins include ADAMs 2-3, 16, 18, 20-21, 24-26, and 29-30; with ADAMs 5 and 6 being primarily testis-specific.

Polypeptides of the ADAM family are expressed in many cell types including, for example, urogenital tissues (*e.g.*, kidney tissue and reproductive tissue), neurologic tissue, and muscle cells. Some binding partners for ADAM polypeptides are expressed, for example, by endothelial cells and T cells, as displayed by the disintegrin-cysteine rich domains of several ADAM family polypeptides binding to endothelial cells, at least partly through interaction with integrins, and to T cells. The interactions between members of the ADAM family of polypeptides and their binding partners are likely involved in mediating interactions between cell types including reproductive tissue, neurologic tissue, and muscle cells, and binding-partner-expressing endothelial cells and T cells.

The disintegrin domain of some ADAM family polypeptides can interact with binding partners such as cell surface integrins (see, *e.g.*, co-pending International Application Serial No. PCT/US01/05701, the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety). By binding to one or more binding partners, a disintegrin domain polypeptide can inhibit the biological activities (*e.g.*, angiogenesis) mediated via binding of an ADAM polypeptide to its binding partner. Because some ADAM family polypeptides exhibit integrin-binding activities via the disintegrin domain, modulation of disintegrin activity will modulate adhesion, *e.g.*, the role of ADAMs 1 and 2 in sperm binding to egg and the role of ADAM-9 in interactions of glomerular and tubular epithelial cells with the basal laminae in renal tissue. The degree to which individual members of the ADAM family of polypeptides and fragments and other derivatives of these polypeptides exhibit these activities can be determined by standard assay methods, such as inhibition of endothelial cell migration by disintegrin-Fc constructs, and the like. Particularly suitable assays to detect or measure the binding between ADAM polypeptides and their binding partners are FACS analyses. Additional assays for evaluating the biological activities and partner-binding properties of ADAM family polypeptides are described below. Polypeptides of the invention lacking a metalloproteinase domain are contemplated by the present invention and may

WO 02/10406

PCT/US01/23734

act as a dominant negative with respect to the metalloproteinase activity of other ADAM family polypeptides (see, e.g., International Publication WO/_____, entitled, "A HUMAN DISINTEGRIN PROTEIN," filed 27 July 2001, the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety).

5 Polypeptides of the ADAM family are involved in inflammation, cancer, allergy, reproductive, neural disorders and diseases, angiogenesis and vascular diseases or conditions that share as a common feature integrin-associated interactions via disintegrin activity and/or protein degradation via metalloproteinase activity. Examples of inflammation, cancer, allergy, reproductive, neural disorders and diseases, angiogenesis and vascular conditions that are known
10 or are likely to involve the biological activities of ADAM polypeptides are rheumatoid arthritis, septic shock, glomerular diseases, acute renal failure, Alzheimer's disease, and inappropriate bone resorption. Blocking or inhibiting the interactions between members of the ADAM family of polypeptides and their substrates, ligands, receptors, binding partners, or other interacting polypeptides is an aspect of the invention and provides methods for treating, modulating, or
15 ameliorating these diseases and conditions through the use of inhibitors or modulators of ADAM polypeptide activity. In one embodiment, interaction between members of the ADAM family of polypeptides and their cognates is affected by contacting a sample containing an ADAM family polypeptide or its cognate with an MPD polypeptide or anti-MPD antibody.

For certain conditions involving too little disintegrin activity, methods of treating or
20 ameliorating these conditions comprise increasing the amount or activity of, for example, MPD polypeptides having disintegrin activity by providing such polypeptides or active fragments or fusion polypeptides thereof, or by providing agents that activate endogenous or exogenous MPD polypeptides. Additional uses for MPD polypeptide include diagnostic reagents for inflammation, cancer, allergy, reproductive, neural disorders, and vascular diseases; research reagents for
25 investigation of integrin polypeptides and fertilization processes, purification and processing of integrins and/or endothelial cells or T cells; or as a carrier/targeting polypeptide to deliver therapeutic agents to cells.

As used herein, both "protein" and "polypeptide" mean any chain of amino acids, regardless of length or post-translational modification (e.g., glycosylation or phosphorylation), and
30 include natural proteins, synthetic or recombinant polypeptides and peptides as well as a recombinant molecule consisting of a hybrid with one portion, for example, comprising all or part of an MPD amino acid sequence and a second portion being encoded by all or part of a different nucleotide sequence. Typically the protein or polypeptide is substantially pure of other components from which it is normally present in nature. The term "substantially pure" or
35 "purified" when referring to a polypeptide, means a polypeptide that is at least 30% free from the proteins and naturally-occurring organic molecules with which it is naturally associated. Preferably the substantially pure polypeptide of the invention is at least 35 to 50%; preferably 60 to 70%;

WO 02/10406

PCT/US01/23734

more preferably at least 75% to 90%; and most preferably at least 99% by weight purified from other naturally occurring molecules. A substantially pure polypeptide of the invention can be obtained, for example, by extraction from a natural source, by expression of a recombinant polynucleotide encoding the polypeptide, or by chemically synthesizing the polypeptide. Purity can be measured by any appropriate method, *e.g.*, chromatography, PAGE, or HPLC analysis.

As used herein an "MPD polypeptide" means a polypeptide that contains or comprises an amino acid sequence as set forth in Figure 1; polypeptides having substantial homology or substantial identity to the sequences set forth in Figure 1; fragments of the foregoing sequences; and conservative variants of the foregoing. The invention provides MPD polypeptides comprising a sequence as set forth in SEQ ID Nos:1 to 27.

MPD polypeptides comprising sequences associated with disintegrin activity include SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:6 from about residue 43 to 148; SEQ ID NO:8 from about residue 1 to 366; SEQ ID NO:8 from about residue 38 to 366; SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:14 from about residue 1 to 622; SEQ ID NO:14 from about residue 84 to 622; SEQ ID NO:14 from about residue 299 to 622; SEQ ID NO:16; SEQ ID NO:21 from about residue 1 to 701; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:24 from about residue 278 to 435; SEQ ID NO:25 from about residue 1 to 627; SEQ ID NO:26; and SEQ ID NO:26 from about residue 224 to 383, termed herein "MPD disintegrin polypeptides," (MPDdis). As used herein, the term "between about" or "from about" will be understood to include sequences between any such referenced residues of a sequence. For example, "from about 43 to 148" means 44 to 148, 45 to 148, 46 to 148, and so on; and 43 to 147, 43 to 146, and so on.

MPD polypeptides comprising sequences associated with metalloproteinase activity include SEQ ID NO:14 from about residue 1 to 622; SEQ ID NO:14 from about residue 84 to 622; SEQ ID NO:18; SEQ ID NO:21 from about residue 1 to 701; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:24 from about residue 1 to 277; SEQ ID NO:25 from about residue 1 to 332; SEQ ID NO:25 from about residue 1 to 627; SEQ ID NO:26 from about residue 1 to 215; SEQ ID NO:26 from about residue 118 to 215; and SEQ ID NO:26, termed herein "MPD metalloproteinase polypeptides."

The MPD polypeptides have been shown to have a high degree of homology to members of the ADAM family and related metalloproteinase/disintegrin polypeptides and thus have a predicted function or activity of an ADAM polypeptide, a disintegrin polypeptide, or a metalloproteinase polypeptide. Accordingly, the invention provides an MPD polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos:1 to 26, and 27. In one embodiment, the MPD polypeptide has disintegrin activity, metalloproteinase activity, or a combination thereof. Methods of determining whether a polypeptide of the invention has a desired disintegrin activity or metalloproteinase activity can be accomplished by assaying the polypeptide by any of the methods described herein below.

WO 02/10406

PCT/US01/23734

A number of conserved sequences have been identified in ADAM and matrix metalloproteinases (MMPs) including, for example, the HEXGHxxGxxHD motif (SEQ ID NO:28). In addition, a potential conserved motif includes a LNIx(I/V)(A/V)LVGLE(V/I)WT motif (SEQ ID NO:29). For example, SEQ ID Nos:4 to 5, 10, 14, 21 to 22, and 25 to 26 comprise the sequence HexGHxxGxxHD (SEQ ID NO:28) at residues 208 to 219, 15 to 26, 229 to 240, 555 to 566, 3 to 14, 269 to 280, and 154 to 165, respectively. SEQ ID NO:24 comprises a sequence that has substantial identity to the conserved HexGHxxGxxHD motif. Thus, a polypeptide comprising SEQ ID NO: 4, 5, 10, 14, 21, 22, 24, 25, or 26 is predicted to have metalloproteinase activity. SEQ ID Nos:4, 8, 10, 14, 18 to 19, 21, and 25 comprise a sequence having identity with the LNIx(I/V)(A/V)LVGLE(V/I)WT motif and thus a polypeptide comprising SEQ ID NO: 4, 8, 10, 14, 18 to 19, 21, or 25 is predicted to have metalloproteinase activity. The invention also provides SEQ ID Nos:2, 3, 7, 9, 17, 20, and 27 which have a high degree of homology to the Testicular Metalloproteinase-like, Disintegrin-like, Cysteine rich (TMDC) protein family, including TMDC III, TMDC IVA, and TMDC IVC. Table 1 shows the relative identity of representative polypeptides of the invention with TMDC protein family members. Accordingly, polypeptides comprising sequences as set forth in SEQ ID Nos: 2, 3, 7, 9, 17, 20, or 27, and fragments thereof having metalloproteinase activity and/or disintegrin activity are provided herein.

TABLE 1

SEQUENCE	Homology	TMDC family member
SEQ ID NO:2	99%	TMDCIII
SEQ ID NO:3	91%	TMDCIVC
SEQ ID NO:7	85%	TMDCIVA
SEQ ID NO:9	48%	TMDCIVA
SEQ ID NO:17	53%	TMDCIVA
SEQ ID NO:20	90%	TMDCIV
SEQ ID NO:27	89%	TMDCIVA

In addition, to the sequences above having homology to TMDC family members, the invention also provides polypeptides having homology to the ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) family of proteins. Such polypeptides include metalloproteinase domains. Preferably the metalloproteinase domain of the polypeptides comprising SEQ ID Nos:4, 10, 14, 21, 25, and 26 comprise a sequence from about amino acids residues 65 to 274 of SEQ ID NO:4; 24 to 235 of SEQ ID NO:10; 85 to 290 of SEQ ID NO:14; 202 to 411 of SEQ ID NO:21; 123 to 332 of SEQ ID NO:25; and 118 to 215 of SEQ ID NO:26. One of skill in the art will recognize that the N-terminal and C-terminal residues of the respective metalloproteinase domains are approximate and variations of about 1 to 10 amino acid(s) from either end of the domain will not depart from the scope of the present invention. For example, the addition of amino acids to either end of the domain may not change the molecule's activity. The effects of any such modification can be assayed using the methods described herein. Polypeptides comprising sequences as set

WO 02/10406

PCT/US01/23734

forth in SEQ ID Nos: 2 to 5, 7 to 10, 14, 17 to 19, 21 to 22, and 24 to 27 may also have disintegrin activity in addition to metalloproteinase activity.

The disintegrin domain is typically characterized as containing a conserved motif having a sequence CGN(G/K)_x(L/V)(E/D)_x(G/N)EECDG (SEQ ID NO:30) (herein after the "CGN-GEBC" motif). The present invention provides polypeptides having disintegrin activity characterized as having a motif with substantial identity to the CGN(G/K)_x(L/V)(E/D)_x(G/N)EECDG (SEQ ID NO:30). For example, SEQ ID Nos:4, 10, 14, 21, and 24 to 26 contain the CGN-GEBC motif and thus a polypeptide comprising SEQ ID NO: 4, 10, 14, 21, 24, 25, or 26 is predicted to have disintegrin activity. SEQ ID NO:11 has a putative CGN-GEBC sequence at residues 43 to 57 and thus a polypeptide comprising SEQ ID NO:11 is predicted to have disintegrin activity. In addition, ADAM family of proteins are characterized as having a number of conserved cysteine residues in their disintegrin and cysteine-rich domains. For example, SEQ ID Nos:6, 8, 12, 13, 16, and 23, when aligned with a number of ADAM family members (*e.g.*, ADAM9 (accession no. NP 003807, which is incorporated herein by reference)), align with the conserved cysteine residues in the disintegrin domain of such ADAM family members. Thus, the invention also provides polypeptides comprising a sequence as set forth in SEQ ID Nos:6, 8, 12, 13, 16, and 23 having disintegrin activity.

Table 2 provides a summary of the relative domains and residues characterizing the domains of some of the polypeptides of the invention. The relative domains and residues corresponding to such activity are estimates based on similar molecules and computer algorithms and accordingly may vary slightly depending upon a number of factors including, for example, the source of material, the cell type used, the expression system used, and the like. Such factors will be apparent and appreciated by one of skill in the art.

TABLE 2

Sequence (SEQ ID NO:)	Predicted Metalloproteinase domain comprises residues:	Predicted Disintegrin domain comprises residues:	Predicted Transmembrane domain comprises residues:	Predicted Cytoplasmic domain comprises residues:
4	65 to 274	283 to 564	565 to 585	586 to 686
5	1 to 46			
6		1 or 43 to 148		
8		1 or 38 to 366		
10	1, 24 or 118 to 235	244 to 528	529 to 539	540 to 751
11		1 to 126		
12		1 to 121		
13		1 to 66		
14	85 to 290	299 to 622	623 to 642	643 to 660
16		1 to 60		
18	1 to 56			
19	1 to 56			
21	30 or 202 to 411	420 to 710	711 to 725	726 to 812

WO 02/10406

PCT/US01/23734

22	1 to 38			
24	1 to 277	278 to 435		
25	123 to 332	343 to 627	628 to 645	646 to 811
26	118 to 215	224 to 383		

The invention further provides polypeptides having metalloproteinase activity and/or disintegrin activity comprising SEQ ID NO:15. For example, SEQ ID NO:15 has homology to ADAM 9 immediately following the metalloproteinase and before the disintegrin domain of ADAM 9.

A polypeptide of the invention also encompasses an amino acid sequence that has a sufficient or a substantial degree of identity or similarity to a sequence set forth in Figure 1. Substantially identical sequences can be identified by those of skill in the art as having structural domains and/or having biological activity in common with an MPD polypeptide. Methods of determining similarity or identity may employ computer algorithms such as, *e.g.*, BLAST, FASTA, and the like.

The phrase "substantially identical," in the context of two nucleic acids or polypeptides, refers to sequences or subsequences that have at least 50%, 60%, preferably 80% or 85%, more preferably 90 to 95%, and most preferably 96%, 97%, 98%, or 99% nucleotide or amino acid residue identity when aligned for maximum correspondence over a comparison window as measured by, for example, a sequence comparison algorithm or by manual alignment and visual inspection. This definition also refers to the complement of a test sequence, which has substantial sequence or subsequence complementarity when the test sequence has substantial identity to a reference sequence. A "comparison window," as used herein, includes reference to a segment of any one of the number of contiguous positions selected from the group consisting of from 20 to 1800, usually about 50 to 200, more usually about 70 to 150 in which a sequence may be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned.

For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are entered into a computer, subsequence coordinates are designated, if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. Default program parameters can be used, or alternative parameters can be designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identities for the test sequences relative to the reference sequence, based on the program parameters.

Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, *e.g.*, by the local homology algorithm of Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), by the homology alignment algorithm of Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), by the search for similarity method of Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), by

WO 02/10406

PCT/US01/23734

computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), or by manual alignment and visual inspection.

One example of a useful algorithm is PILEUP. PILEUP creates a multiple sequence alignment from a group of related sequences using progressive, pairwise alignments to show relationship and percent sequence identity. PILEUP uses a simplification of the progressive alignment method of Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35:351 (1987), and is similar to the method described by Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151 (1989). The multiple alignment procedure begins with the pairwise alignment of the two most similar sequences, producing a cluster of two aligned sequences. This cluster is then aligned to the next most related sequence or cluster of aligned sequences. Two clusters of sequences are aligned by a simple extension of the pairwise alignment of two individual sequences. The final alignment is achieved by a series of progressive, pairwise alignments. For example, a reference sequence can be compared to other test sequences to determine the percent sequence identity relationship using the following parameters: default gap weight (3.00), default gap length weight (0.10), and weighted end gaps.

Another example of algorithm that is suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity is the BLAST algorithm, as described in Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990). Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). This algorithm involves first identifying high scoring sequence pairs (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence, which either match or satisfy a positive-valued threshold score T when aligned with a word of the same length in a database sequence. T is referred to as the neighborhood word score threshold. These initial neighborhood word hits act as seeds for initiating searches to find longer HSPs containing them. The word hits are extended in both directions along each sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Extension of the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST program uses as defaults a wordlength (W) of 11, the BLOSUM62 scoring matrix (see, Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915, 1989) alignments (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=4, and a comparison of both strands. One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum probability (P(N)), which provides an indication of the probability by which a match between two nucleotide or amino acid sequences would occur by chance. For example, a nucleic acid is considered similar to a reference sequence if the smallest sum probability in a comparison of the test nucleic acid to the reference nucleic acid is less than about 0.2, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Alternatively, the percent identity of two amino acid or two nucleic acid sequences can be determined by comparing sequence information using the GAP computer program, version 6.0 described by Devereux *et al.* (*Nucl. Acids Res.* 12:387, 1984) and available from the University of Wisconsin Genetics Computer Group. The preferred default parameters for the GAP program include: (1) a unary comparison matrix (containing a value of 1 for identities and 0 for non-identities) for nucleotides, and the weighted comparison matrix of Gribskov and Burgess, *Nucl. Acids Res.* 14:6745, 1986, as described by Schwartz and Dayhoff, eds., *Atlas of Polypeptide Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979; (2) a penalty of 3.0 for each gap and an additional 0.10 penalty for each symbol in each gap; and (3) no penalty for end gaps.

One of skill will recognize that individual substitutions, deletions or additions to a nucleic acid sequence, peptide, or polypeptide sequence that alters, adds or deletes a single amino acid or a small percentage of amino acids in the encoded sequence is a "conservatively modified variant" where the alteration results in a molecule having substantially the same biological activity (*e.g.*, disintegrin and/or metalloproteinase activity). For example, an alteration that results in the substitution of an amino acid with a chemically similar amino acid is a conservatively modified variant. Conservative substitution tables providing functionally similar amino acids are known in the art. The following six groups each contain amino acids that are conservative substitutions for one another 1) Alanine (A), Serine (S), Threonine (T); 2) Aspartic acid (D), Glutamic acid (E); 3) Asparagine (N), Glutamine (Q); 4) Arginine (R), Lysine (K); 5) Isoleucine (I), Leucine (L), Methionine (M), Valine (V); and 6) Phenylalanine (F), Tyrosine (Y), Tryptophan (W) (*see, e.g.*, Creighton, *Proteins* (1984)).

One indication that two polynucleotides or polypeptides are substantially identical is that the polypeptide encoded by a first polynucleotide is immunologically cross reactive with the antibodies raised against the polypeptide encoded by a second polynucleotide. Another indication that two polynucleotides are substantially identical is that the two molecules or their complements hybridize to each other under stringent conditions.

Polypeptides derived from the MPD polypeptides of the invention by any type of alteration (*e.g.*, insertions, deletions, or substitutions of amino acids; changes in the state of glycosylation of the polypeptide; refolding or isomerization to change its three-dimensional structure or self-association state; and changes to its association with other polypeptides or molecules) are also encompassed by the invention. Therefore, the polypeptides provided by the invention include polypeptides characterized by amino acid sequences similar to those as set forth in Figure 1, but into which modifications are naturally provided or deliberately engineered. A polypeptide that shares biological activities in common with a polypeptide comprising a sequence as set forth in SEQ ID NO:1-26, or 27 having disintegrin activity and/or metalloproteinase activity are encompassed by the invention.

WO 02/10406

PC/T/US01/23734

The present invention encompasses the use of various forms of MPD disintegrin polypeptides or domains that retain at least one activity selected from the group consisting of integrin binding activity, inhibition of endothelial cell migration, and inhibition of angiogenesis. A MPD disintegrin polypeptide/domain (MPDdis) is intended to encompass polypeptides comprising all or part of an MPD polypeptide of the invention having disintegrin activity. In a preferred embodiment, an MPDdis contains all or part of an MPD disintegrin domain, with or without other domains (such as the cysteine-rich region), as well as related forms including, but not limited to: (a) fragments, (b) variants, (c) derivatives, (d) fusion polypeptides, and (e) multimeric forms (multimers). The ability of these related forms to inhibit integrin binding, endothelial cell migration, and/or inhibition of angiogenesis may be determined *in vitro* or *in vivo* by using methods such as those exemplified below or by using other assays known in the art.

One of skill in the art can easily assay for activity using the methods described herein. Such methods measure, for example, metalloproteinase activity, disintegrin activity, or a biological activities exhibited by members of the ADAM family of polypeptides including, without limitation, cell adhesion. For example, anti-MPD antibodies, which neutralize MPD activity (e.g., metalloproteinase activity and/or disintegrin activity) can be used to assay for similar polypeptides by contacting an anti-MPD antibody with a polypeptide of interest and determining if the activity associated with the polypeptide of interest is neutralized. In addition, the cross-reactivity of an antibody that specifically binds to an MPD polypeptide of the invention with another polypeptide of interest is indicative that the polypeptide of interest shares structural characteristics (e.g., primary, secondary, or tertiary protein characteristics) with an MPD polypeptide of the invention.

The invention provides both full-length and mature forms of MPD polypeptides. Full-length polypeptides are those having the complete primary amino acid sequence of the polypeptide as initially translated. The amino acid sequences of full-length polypeptides can be obtained, for example, by translation of the complete open reading frame ("ORF") of a cDNA molecule. Several full-length polypeptides may be encoded by a single genetic locus if multiple mRNA forms are produced from that locus by alternative splicing or by the use of multiple translation initiation sites. The "mature form" of a polypeptide refers to a polypeptide that has undergone post-translational processing steps, if any, such as, for example, cleavage of the signal sequence or proteolytic cleavage to remove a prodomain. Multiple mature forms of a particular full-length polypeptide may be produced, for example, by imprecise cleavage of the signal sequence, or by differential regulation of proteases that cleave the polypeptide. The mature form(s) of such polypeptide may be obtained by expression, in a suitable mammalian cell or other host cell, of a polynucleotide that encodes the full-length polypeptide. The sequence of the mature form of the polypeptide may also be determinable from the amino acid sequence of the full-length form, through identification of signal sequences or protease cleavage sites. The MPD polypeptides of the invention also include polypeptides that result from post-transcriptional or post-translational

WO 02/10406

PCT/US01/23734

processing events such as alternate mRNA processing which can yield a truncated but biologically active polypeptide, for example, a naturally occurring soluble form of the polypeptide. Also encompassed within the invention are variations attributable to proteolysis such as differences in the N- or C-termini upon expression in different types of host cells, due to proteolytic removal of one or more terminal amino acids from the polypeptide (generally from 1-5 terminal amino acids).

A polypeptide of the invention may be prepared by culturing transformed or recombinant host cells under culture conditions suitable to express a polypeptide of the invention. The resulting expressed polypeptide may then be purified from such culture using known purification processes, such as gel filtration and ion exchange chromatography. The purification of the polypeptide may also include an affinity column containing agents which will bind to the polypeptide; one or more column steps over such affinity resins as concanavalin A-agarose, heparin-tyosepearl® or Cibacron blue 3GA Sepharose®; one or more steps involving hydrophobic interaction chromatography using such resins as phenyl ether, butyl ether, or propyl ether; or immunoaffinity chromatography. Alternatively, a polypeptide of the invention may also be expressed in a form that will facilitate purification. For example, it may be expressed as a fusion polypeptide, joined to, for example, maltose binding polypeptide (MBP), glutathione-S-transferase (GST) or thioredoxin (TRX). Kits for expression and purification of such fusion polypeptides are commercially available from New England BioLab (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ), and InVitrogen, respectively. The polypeptide can also be tagged with an epitope and subsequently purified by using a specific antibody directed to such epitope. One such epitope ("Flag") is commercially available from Kodak (New Haven, Conn.). Finally, one or more reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) steps employing hydrophobic RP-HPLC media, *e.g.*, silica gel having pendant methyl or other aliphatic groups, can be employed to further purify the polypeptide. Some or all of the foregoing purification steps, in various combinations, can also be employed to provide a substantially homogeneous recombinant polypeptide. The polypeptide thus purified is substantially free of other mammalian polypeptides and is defined in accordance with the invention as a "substantially purified polypeptide"; such purified polypeptides include antibodies that specifically bind to an MPD polypeptide, fragment, variant, and the like. A polypeptide of the invention may also be expressed as a product of transgenic animals, *e.g.*, as a component of the milk of transgenic cows, goats, pigs, or sheep which are characterized by somatic or germ cells containing a polynucleotide encoding a polypeptide of the invention.

It is also possible to utilize an affinity column such as a monoclonal antibody generated against polypeptides of the invention, to affinity-purify expressed polypeptides. These polypeptides can be removed from an affinity column using conventional techniques, *e.g.*, in a high salt elution buffer and then dialyzed into a lower salt buffer for use or by changing pH or other components depending on the affinity matrix utilized, or be competitively removed using the

WO 02/10406

PCT/US01/23734

naturally occurring substrate of the affinity moiety, such as a polypeptide derived from the invention. In this aspect of the invention, proteins that bind a polypeptide of the invention (*e.g.*, an anti-MPD antibody of the invention) can be bound to a solid phase support or a similar substrate suitable for identifying, separating, or purifying cells that express polypeptides of the invention on their surface. Adherence of, for example, an anti-MPD antibody of the invention to a solid phase surface can be accomplished by any means, for example, magnetic microspheres can be coated with these polypeptide-binding proteins and held in the incubation vessel through a magnetic field. Suspensions of cell mixtures are contacted with the solid phase that has such polypeptide-binding proteins thereon. Anti-MPD antibodies bind cells having polypeptides of the invention on their surface (*e.g.*, an extracellular domain of MPD). Unbound cells (*e.g.*, cell lacking and MPD polypeptide) are washed away from the bound cells. This affinity-binding method is useful for purifying, screening, or separating such polypeptide-expressing cells from solution. Methods of releasing positively selected cells from the solid phase are known in the art and encompass, for example, the use of enzymes. Such enzymes are preferably non-toxic and non-injurious to the cells and are preferably directed to cleaving the cell-surface binding partner. Alternatively, mixtures of cells suspected of containing polypeptide-expressing cells of the invention are first incubated with a biotinylated binding polypeptide of the invention. Incubation periods are typically at least one hour in duration to ensure sufficient binding to polypeptides of the invention. The resulting mixture then is passed through a column packed with avidin-coated beads, whereby the high affinity of biotin for avidin provides the binding of the cells to the beads. Use of avidin-coated beads is known in the art (see, Berenson, *et al. J. Cell. Biochem.*, 10D:239, 1986). Wash of unbound material and the release of the bound cells is performed using conventional methods.

A polypeptide of the invention may also be produced by known conventional chemical synthesis. Methods for constructing the polypeptides of the invention by synthetic means are known to those skilled in the art. The synthetically-constructed polypeptide sequences, by virtue of sharing primary, secondary or tertiary structural and/or conformational characteristics with a native polypeptides may possess biological properties in common therewith, including biological activity. Thus, the synthesized polypeptides may be employed as biologically active or immunological substitutes for natural, purified polypeptides in screening of therapeutic compounds, and in immunological processes for the development of antibodies.

The desired degree of purity depends on the intended use of the polypeptide. A relatively high degree of purity is desired when the polypeptide is to be administered *in vivo*, for example. In such a case, the polypeptides are purified such that no polypeptide bands corresponding to other polypeptides are detectable upon analysis by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). It will be recognized by one skilled in the pertinent field that multiple bands corresponding to the polypeptide can be visualized by SDS-PAGE, due to differential glycosylation, differential post-translational processing, and the like. Most preferably, the

WO 02/10406

PCT/US01/23734

polypeptide of the invention is purified to substantial homogeneity, as indicated by a single polypeptide band upon analysis by SDS-PAGE. The polypeptide band can be visualized by silver staining, Coomassie blue staining, or (if the polypeptide is radiolabeled) by autoradiography.

Species homologues of MPD polypeptides and polynucleotides encoding the polypeptides are also provided by the invention. As used herein, a "species homologue" is a polypeptide or polynucleotide with a different species of origin from that of a given polypeptide or polynucleotide, but with significant sequence similarity to the given polypeptide or polynucleotide. Species homologues may be isolated and identified by making suitable probes or primers from polynucleotides encoding the polypeptides provided herein and screening a suitable nucleic acid source from the desired species. Alternatively, homologues may be identified by screening a genomic database containing sequences from one or more species utilizing a sequence (e.g., nucleic acid or amino acid sequence) of an MPD of the invention. Such genome databases are readily available for a number of species (e.g., on the world wide web (www) at tigr.org/tdb/genetics.wisc.edu; stanford.edu/~ball; hiv-web.lanl.gov; ncbi.nlm.nih.gov; ebi.ac.uk; and pasteur.fr/other/biology). The invention also encompasses allelic variants of MPD polypeptides and nucleic acids encoding them that are naturally-occurring alternative forms of such polypeptides and polynucleotides in which differences in amino acid or nucleotide sequence are attributable to genetic polymorphism.

Intermediate Sequence Search (ISS) can be used to identify closely related as well as distant homologs by connecting two proteins through one or more intermediate sequences. ISS repetitively uses the results of the previous query as new search seeds. Saturated BLAST is a package that performs ISS. Starting with a protein sequence, Saturated BLAST runs a BLAST search and identifies representative sequences for the next generation of searches. The procedure is run until convergence or until some predefined criteria are met. Saturated BLAST is available on the world wide web (www) at bioinformatics.burnham-inst.org/xblast (see also, Li *et al.* Bioinformatics 16(12):1105, 2000).

Fragments of the MPD polypeptides of the invention are encompassed by the invention and may be in linear form or cyclized using known methods (see, e.g., H.U. Saragovi, *et al.*, Bio/Technology 10, 773 (1992); and R. S. McDowell, *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 114:9245 (1992), both of which are incorporated by reference herein). Peptide fragments of MPD polypeptides of the invention, and polynucleotides encoding such fragments include amino acid or nucleotide sequence lengths that are at least 25% (more preferably at least 50%, 60%, or 70%, and most preferably at least 80%) of the length of an MPD polypeptide or polynucleotide. Preferably such sequences will have at least 60% sequence identity (more preferably at least 70%-75%, 80%-85%, 90%-95%, at least 97%-97.5%, or at least 99%, and most preferably at least 99.5%) with an MPD polypeptide or polynucleotide when aligned so as to maximize overlap and identity while minimizing sequence gaps. Also included in the invention are polypeptides, peptide fragments, and

WO 02/10406

PCT/US01/23734

polynucleotides encoding such fragments, that contain or encode a segment preferably comprising at least 8 to 10, or more preferably at least 20, or still more preferably at least 30, or most preferably at least 40 contiguous amino acids. Such polypeptides and fragments may also contain a segment that shares at least 70% (at least 75%, 80%-85%, 90%-95%, at least 97%-97.5%, or at least 99%, and most preferably at least 99.5%) with any such segment of, for example, any of the ADAM family polypeptides, when aligned so as to maximize overlap and identity while minimizing sequence gaps. Visual inspection, mathematical calculation, or computer algorithms can determine the percent identity.

The invention also provides soluble forms of MPD polypeptides comprising certain fragments or domains of these polypeptides. Soluble fragments having disintegrin activity are of particular interest. For example, an amino acid sequence beginning with a highly conserved CGN-GEBC sequence (as discussed above) but which lacks a transmembrane region (see, *e.g.*, Table 2). Transmembrane regions can be identified using publicly available computer algorithms. Other soluble forms include polypeptides comprising SEQ ID NO:6 beginning at an amino acid between and including residues 1 and 43 to 148; SEQ ID NO:8 beginning at an amino acid between and including residues 1 and 38 to 366; SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:14 beginning at an amino acid between and including residues 1 and 84 to 622; SEQ ID NO:14 beginning at an amino acid between and including residues 1 and 299 to 622; SEQ ID NO:16; SEQ ID NO:21 from about residue 1 to 701; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24 beginning at an amino acid between and including residues 1 and 278 to 435; SEQ ID NO:25 from about residue 1 to 627; and SEQ ID NO:26 beginning at an amino acid between and including residues 1 and 224 to 383. In such polypeptides can be secreted from the cell in which it is expressed. The intracellular and transmembrane domains of polypeptides of the invention can be identified in accordance with known techniques for determination of such domains from sequence information. For example, alignment of the polypeptide sequences of the invention with other members of the ADAM family of polypeptides having known domains will provide information regarding the domains of the polypeptides of the invention. One of skill in the art will recognize that slight modifications in the range of sequences of a particular domain can be made without affecting the molecule's biological activity. Accordingly, changes in the identified sequences of 1, 2, 3, 4, or 5 to 10 amino acids in either direction of the particular domain are encompassed by the present invention.

In another aspect of the invention, a polypeptide may comprise various combinations of ADAM polypeptide domains, such as a metalloproteinase domain, a disintegrin domain, or a cytoplasmic domain. Accordingly, polypeptides of the invention and polynucleotides include those comprising or encoding two or more copies of a domain such as the metalloproteinase domain, two or more copies of a domain such as the disintegrin domain, or at least one copy of each domain, and these domains may be presented in any order within such polypeptides. Also included are recombinant polypeptides and the polynucleotides encoding the polypeptides wherein the

WO 02/10406

PCT/US01/23734

recombinant polypeptides are "chimeric polypeptides" or "fusion polypeptides" and comprise an MPD sequence as set forth in SEQ ID NO:1-26 or 27 operatively linked to a second polypeptide. The second polypeptide can be any polypeptide of interest having an activity or function independent of, or related to, the function of an MPD polypeptide. For example, the second polypeptide can be a domain of a related but distinct member of the ADAM family of polypeptides such as, for example, an extracellular, cytoplasmic, metalloprotease, or transmembrane domain of an ADAM polypeptide. The term "operatively linked" is intended to indicate that the MPD sequence and the second polypeptide sequence are fused in-frame to each other. The second polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of an MPD sequence as set forth in Figure 1. For example, in one embodiment the fusion polypeptide is a GST-MPD fusion polypeptide in which an MPD sequence is fused to the C-terminus of the GST sequences. Such fusion polypeptides can facilitate the purification of recombinant MPD sequences. In another embodiment, the fusion polypeptide is an MPD sequence comprising a heterologous signal sequence at its N-terminus. In certain host cells (e.g., mammalian host cells), expression and/or secretion of an MPD polypeptide can be increased through use of a heterologous signal sequence. As another example, an MPD polypeptide or fragment thereof may be fused to a hexa-histidine tag to facilitate purification of bacterially expressed protein, or to a hemagglutinin tag to facilitate purification of protein expressed in eukaryotic cells. Further, fusion polypeptides can comprise, for example, poly-His or the antigenic identification peptides described in U.S. Patent No. 5,011,912 and in Hopp *et al.*, *BioTechnology* 6:1204, 1988. One such peptide is the FLAG[®] peptide, which is highly antigenic and provides an epitope reversibly bound by a specific monoclonal antibody, enabling rapid assay and facile purification of expressed recombinant polypeptide. A murine hybridoma designated 4E11 produces a monoclonal antibody that binds the FLAG[®] peptide in the presence of certain divalent metal cations, as described in U.S. Patent 5,011,912, hereby incorporated by reference. The 4E11 hybridoma cell line has been deposited with the ATCC under accession no. HB9259. Monoclonal antibodies that bind the FLAG[®] peptide are available from Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut.

Encompassed by the invention are oligomers or fusion polypeptides that comprise an MPD polypeptide. Oligomers that can be used as fusion partners can be in the form of covalently linked or non-covalently-linked multimers, including dimers, trimers, or higher oligomers. In one aspect of the invention, the oligomers maintain the binding ability or catalytic ability of the polypeptide components and provide therefor, bivalent, trivalent, and the like, binding or catalytic sites. In an alternative embodiment the invention is directed to oligomers comprising multiple polypeptides joined via covalent or non-covalent interactions between peptide moieties fused to the polypeptides. Such peptides can be peptide linkers (spacers), or peptides that have the property of promoting oligomerization. Leucine zippers and certain polypeptides derived from antibodies are

WO 02/10406

PCT/US01/23734

among the peptides that can promote oligomerization of the polypeptides attached thereto, as described in more detail below.

Typically a linker will be a peptide linker moiety. The length of the linker moiety is chosen to optimize the biological activity of the polypeptide comprising an MPD sequence and can be determined empirically without undue experimentation. The linker moiety should be long enough and flexible enough to allow an MPD polypeptide to freely interact with a substrate or ligand. The preferred linker moiety is a peptide between about one and 30 amino acid residues in length, preferably between about two and 15 amino acid residues. Preferred linker moieties are -- Gly-Gly-, GGGGS (SEQ ID NO:31), (GGGGG)_n (SEQ ID NO:32), GKSSGSGSESIS (SEQ ID NO:33), GSTSGSGKSSEGG (SEQ ID NO:34), GSTSGSGKSSEGGSTKG (SEQ ID NO:35), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:36), or EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO:37). Linking moieties are described, for example, in Huston, J. S., *et al.*, PNAS 85:5879 (1988), Whitlow, M., *et al.*, Protein Engineering 6:989 (1993), and Newton, D. L., *et al.*, Biochemistry 35:545 (1996). Other suitable peptide linkers are those described in U.S. Patents 4,751,180 and 4,935,233, which are hereby incorporated by reference. A DNA sequence encoding a desired peptide linker can be inserted between, and in the same reading frame as, a DNA sequence encoding an MPD polypeptide or fragment thereof, using any suitable conventional technique. For example, a chemically synthesized oligonucleotide encoding the linker can be ligated between the sequences. In particular embodiments, a fusion polypeptide comprises from two to four soluble MPD polypeptides, separated by peptide linkers.

In embodiments where variants of an MPD polypeptide are constructed to include a membrane-spanning domain, they will form a Type I membrane polypeptide. In such embodiments, it is preferable to link the fusion partner to the C-terminus of the MPD polypeptide. Alternatively, the membrane-spanning polypeptides can be fused with known extracellular receptor domain polypeptides, for which the ligand is also known. Such fusion polypeptides can then be manipulated to control the intracellular signaling pathways triggered by the bound MPD polypeptide. Polypeptides that span the cell membrane can also be fused with agonists or antagonists of cell-surface receptors, or cellular adhesion molecules to further modulate MPD intracellular effects. In another aspect of the invention, interleukins can be situated between the preferred MPD polypeptide fragment and other fusion polypeptide domains.

The MPD polypeptides of the invention can also include a localization sequence to direct the polypeptide to particular cellular sites by fusion to appropriate organellar targeting signals or localized host proteins. A polynucleotide encoding a localization sequence, or signal sequence, can be ligated or fused at the 5' terminus of a polynucleotide encoding an MPD polypeptide such that the signal peptide is located at the amino terminal end of the resulting fusion polynucleotide/polypeptide. In eukaryotes, the signal peptide functions to transport a polypeptide across the endoplasmic reticulum. The secretory protein is then transported through the Golgi

WO 02/10406

PCT/US01/23734

apparatus, into secretory vesicles and into the extracellular space or the external environment. Signal peptides include pre-pro peptides that contain a proteolytic enzyme recognition site.

The localization sequence can be a nuclear-, an endoplasmic reticulum-, a peroxisome-, or a mitochondrial-localization sequence, or a localized protein. Localization sequences can be targeting sequences that are described, for example, in "Protein Targeting", chapter 35 of Stryer, L., Biochemistry (4th ed.), W. H. Freeman, 1995. Some important localization sequences include those targeting the nucleus (e.g., KKKRK (SEQ ID NO:33)), mitochondria (MLRTSSLFTRRVQPSLFRNLRQLST (SEQ ID NO:39)), endoplasmic reticulum (KDEL (SEQ ID NO:40)), peroxisome (SKP), plasma membrane (CAAX (SEQ ID NO:41), CC, CXC, or CCXX (SEQ ID NO:42)), cytoplasmic side of plasma membrane (fusion to SNAP-25), or the Golgi apparatus (fusion to furin).

In another embodiment, a polypeptide of the invention or fragments thereof may be fused to carrier molecules such as immunoglobulins for a variety of purposes including increasing the valency of polypeptide binding sites. As an example, fragments of the polypeptide may be fused through linker sequences to the Fc portion of an immunoglobulin. For a bivalent form of the polypeptide, such a fusion could be to the Fc portion of an IgG molecule. Other immunoglobulin isotypes may also be used to generate such fusions. For example, a polypeptide-IgM fusion would generate a decavalent form of the polypeptide of the invention. In one embodiment, the invention provides a fusion polypeptide having an Fc polypeptide domain and an MPD polypeptide sequence SEQ ID NO:6 beginning at an amino acid between and including residues 1 and 43 to 148; SEQ ID NO:8 beginning at an amino acid between and including residues 1 and 38 to 366; SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:14 beginning at an amino acid between and including residues 1 and 84 to 622; SEQ ID NO:14 beginning at an amino acid between and including residues 1 and 299 to 622; SEQ ID NO:16; SEQ ID NO:21 from about residue 1 to 701; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24 beginning at an amino acid between and including residues 1 and 278 to 435; SEQ ID NO:25 from about residue 1 to 627; and SEQ ID NO:26 beginning at an amino acid between and including residues 1 and 224 to 383.

The term "Fc polypeptide" as used herein includes native and mutant forms of polypeptides made up of the Fc region of an antibody comprising any or all of the CH domains of the Fc region. Truncated forms of such polypeptides containing the hinge region that promotes dimerization are also included. Preferred polypeptides comprise an Fc polypeptide derived from a human IgG1 antibody. As one alternative, an oligomer is prepared using polypeptides derived from immunoglobulins. Preparation of fusion polypeptides comprising certain heterologous polypeptides fused to various portions of antibody-derived polypeptides (including the Fc domain) has been described, e.g., by Ashkenazi *et al.* (PNAS USA 88:10535, 1991); Byrn *et al.* (Nature 344:677, 1990); and Hollenbaugh and Aruffo ("Construction of Immunoglobulin Fusion Polypeptides", in *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, pages 10.19.1 - 10.19.11, 1992).

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Methods for preparation and use of immunoglobulin-based oligomers are known in the art. One embodiment of the invention is directed to a dimer comprising two fusion polypeptides created by fusing a polypeptide of the invention to an Fc polypeptide derived from an antibody. A gene fusion encoding the polypeptide/Fc fusion polypeptide is inserted into an appropriate expression vector.

5 Polypeptide/Fc fusion polypeptides are expressed in host cells transformed or transfected with the recombinant expression vector or recombinant polynucleotide encoding the fusion polypeptide, and allowed to assemble much like antibody molecules, whereupon interchain disulfide bonds form between the Fc moieties to yield divalent molecules. One suitable Fc polypeptide, described in PCT application WO 93/10151 (hereby incorporated by reference), is a single chain polypeptide

10 extending from the N-terminal hinge region to the native C-terminus of the Fc region of a human IgG1 antibody. Another useful Fc polypeptide is the Fc muain described in U.S. Patent 5,457,035 and in Baum *et al.*, (*EMBO J.* 13:3992, 1994) incorporated herein by reference. The amino acid sequence of this muain is identical to that of the native Fc sequence presented in WO 93/10151, except that amino acid 19 has been changed from Leu to Ala, amino acid 20 has been changed

15 from Leu to Glu, and amino acid 22 has been changed from Gly to Ala. The muain exhibits reduced affinity for Fc receptors. The above-described fusion polypeptides comprising Fc moieties (and oligomers formed therefrom) offer the advantage of facile purification by affinity chromatography over Polypeptide A or Polypeptide G columns. In other embodiments, the polypeptides of the invention can be substituted for the variable portion of an antibody heavy or

20 light chain. If fusion polypeptides are made with both heavy and light chains of an antibody, it is possible to form an oligomer with as many as four MPD polypeptides or fragments thereof.

Another method for preparing the oligomers of the invention involves use of a leucine zipper. Leucine zipper domains are peptides that promote oligomerization (dimers and trimers) of the polypeptides in which they are found. Leucine zippers were originally identified in several

25 DNA-binding polypeptides (Landschulz *et al.*, *Science* 240:1759, 1988), and have since been found in a variety of different polypeptides. The zipper domain comprises a repetitive heptad repeat, often with four or five leucine residues interspersed with other amino acids.

A chimeric or fusion polypeptide of the invention can be produced by standard recombinant DNA techniques. In one embodiment, polynucleotide fragments coding for the

30 different polypeptide sequences are ligated together in-frame in accordance with conventional techniques, for example, by employing blunt-ended or stagger-ended termini for ligation, restriction enzyme digestion to provide for appropriate termini, filling-in of cohesive ends as appropriate, alkaline phosphatase treatment to avoid undesirable joining, and enzymatic ligation. In another embodiment, the fusion gene can be synthesized by conventional techniques including

35 automated DNA synthesizers. Alternatively, PCR amplification of gene fragments can be carried out using anchor primers that give rise to complementary overhangs between two consecutive gene fragments that can subsequently be annealed and reamplified to generate a chimeric gene sequence

WO 02/10406

PCT/US01/23734

(see, for example, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel *et al.* John Wiley & Sons: 1992). Moreover, many expression vectors are commercially available that already encode a fusion moiety (e.g., a GST polypeptide).

The invention further includes polypeptides with or without associated native-pattern glycosylation. Polypeptides expressed in yeast or mammalian expression systems (e.g., COS-1 or CHO cells) can be similar to or significantly different from a native polypeptide in molecular weight and glycosylation pattern, depending upon the choice of expression system. Expression of polypeptides of the invention in bacterial expression systems, such as *E. coli*, provides non-glycosylated molecules. Further, a given preparation can include multiple differentially glycosylated species of the polypeptide. Glycosyl groups can be removed through conventional methods, in particular those utilizing glycopeptidase.

In another embodiment, modifications in the polypeptide or polynucleotide can be made using known techniques. Modifications of interest in the polypeptide sequences may include the alteration, substitution, replacement, insertion, or deletion of a selected amino acid residue in the coding sequence. For example, one or more of the cysteine residues may be deleted or replaced with another amino acid to alter the conformation of the molecule, an alteration which may involve preventing formation of incorrect intramolecular disulfide bridges upon folding or renaturation. Techniques for such alteration, substitution, replacement, insertion, or deletion are known to those skilled in the art (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,518,584). As another example, N-glycosylation sites in a polypeptide's extracellular domain can be modified to preclude glycosylation, allowing expression of a reduced carbohydrate analog in mammalian and yeast expression systems. N-glycosylation sites in eukaryotic polypeptides are characterized by an amino acid triplet Asn-X-Y, wherein X is any amino acid except Pro, and Y is Ser or Thr. Appropriate substitutions, additions, or deletions to the nucleotide sequence encoding these triplets will result in prevention of attachment of carbohydrate residues at the Asn side chain. Alteration of a single nucleotide, chosen so that Asn is replaced by a different amino acid, for example, is sufficient to inactivate an N-glycosylation site. Alternatively, the Ser or Thr can be replaced with another amino acid, such as Ala. Known procedures for inactivating N-glycosylation sites in polypeptides include those described in U.S. Patent 5,071,972 and EP 276,846, hereby incorporated by reference.

Additional variants within the scope of the invention include polypeptides that can be modified to create derivatives thereof by forming covalent or aggregative conjugates with other chemical moieties, such as glycosyl groups, lipids, phosphate, acetyl groups and the like. Covalent derivatives can be prepared by linking the chemical moieties to functional groups on amino acid side chains or at the N-terminus or C-terminus of a polypeptide. Conjugates comprising diagnostic (detectable) or therapeutic agents attached thereto are contemplated herein. Preferably, such alteration, substitution, replacement, insertion or deletion retains the desired activity of the polypeptide.

WO 02/10406

PCT/US01/23734

The invention also provides polynucleotides encoding MPD polypeptides. The term "polynucleotide" refers to a polymeric form of nucleotides of at least 10 bases in length. The nucleotides can be ribonucleotides, deoxyribonucleotides, or modified forms of either type of nucleotide. The term includes single and double stranded forms of DNA or RNA. DNA includes, for example, cDNA, genomic DNA, chemically synthesized DNA, DNA amplified by PCR, and combinations thereof. The polynucleotides of the invention include full-length genes and cDNA molecules as well as a combination of fragments thereof. The polynucleotides of the invention are preferentially derived from human sources, but the invention includes those derived from non-human species, as well.

By "isolated polynucleotide" is meant a polynucleotide that is not immediately contiguous with both of the coding sequences with which it is immediately contiguous (one on the 5' end and one on the 3' end) in the naturally occurring genome of the organism from which it is derived. The term therefore includes, for example, a recombinant polynucleotide molecule, which is incorporated into a vector, *e.g.*, an expression vector, into an autonomously replicating plasmid or virus; or into the genomic DNA of a prokaryote or eukaryote, or which exists as a separate molecule (*e.g.*, a cDNA) independent of other sequences.

An MPD polynucleotide of the invention (1) encodes a polypeptide comprising a sequence as set forth in SEQ ID NO:1-26 or 27 or a fragment thereof; (2) has a sequence complementary to a (1); (3) polynucleotides that specifically hybridize to the polynucleotide of (1) under moderate to highly stringent conditions; and (4) polynucleotides of (1) - (3) wherein T can also be U (*e.g.*, RNA sequences). Also encompassed by the invention are homologs of an MPD polynucleotide of the invention. These polynucleotides can be identified in several ways, including isolation of genomic or cDNA molecules from a suitable source, or computer searches of available sequence databases. Oligonucleotides or polynucleotides corresponding to the amino acid sequences described herein can be used as probes or primers for the isolation of polynucleotide homologs or as query sequences for database searches. Degenerate oligonucleotide sequences can be obtained by "back-translation" from the amino acid sequences of the invention. The polymerase chain reaction (PCR) procedure can be employed to isolate and amplify a DNA sequence encoding an MPD polypeptide. Oligonucleotides that define the desired termini of a target polynucleotide molecule are employed as 5' and 3' primers. Accordingly, fragments of the polynucleotides of the invention are useful as probes and primers to identify or amplify related sequence or obtain full-length sequences of an MPD of the invention. The oligonucleotides can additionally contain recognition sites for restriction endonucleases, to facilitate insertion of the amplified combination of DNA fragments into an expression vector. PCR techniques are known in the art (see, *e.g.*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis *et al.*, eds., Academic Press, Inc. (1990)).

The invention also includes polynucleotides and oligonucleotides that hybridize under reduced stringency conditions, more preferably moderately stringent conditions, and most

WO 02/10406

PCT/US01/23734

preferably highly stringent conditions, to MPD polynucleotides. The basic parameters affecting the choice of hybridization conditions and guidance for devising suitable conditions are set forth by Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11; and *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F. M. Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4, incorporated herein by reference), and can be readily determined by those having ordinary skill in the art based on, for example, the length and/or base composition of the polynucleotide. One way of achieving moderately stringent conditions involves the use of a prewashing solution containing 5 x SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0), hybridization buffer of about 50% formamide, 6 x SSC, and a hybridization temperature of about 55 °C (or other similar hybridization solutions, such as one containing about 50% formamide, with a hybridization temperature of about 42 °C), and washing conditions of about 60 °C, in 0.5 x SSC, 0.1% SDS. Generally, highly stringent conditions are defined as hybridization conditions as above, but with washing at approximately 68 °C, 0.2 x SSC, 0.1% SDS. SSPE (1xSSPE is 0.15M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, and 1.25 mM EDTA, pH 7.4) can be substituted for SSC (1xSSC is 0.15M NaCl and 15 mM sodium citrate) in the hybridization and wash buffers; washes are performed for 15 minutes after hybridization is complete. It should be understood that the wash temperature and wash salt concentration can be adjusted as necessary to achieve a desired degree of stringency by applying the basic principles that govern hybridization reactions and duplex stability, as known to those skilled in the art and described further below (see, e.g., Sambrook *et al.*, 1989). When hybridizing a nucleic acid to a target polynucleotide of unknown sequence, the hybrid length is assumed to be that of the hybridizing nucleic acid. When nucleic acids of known sequence are hybridized, the hybrid length can be determined by aligning the sequences of the nucleic acids and identifying the region or regions of optimal sequence complementarity. The hybridization temperature for hybrids anticipated to be less than 50 base pairs in length should be 5 to 10 °C less than the melting temperature (T_m) of the hybrid, where T_m is determined according to the following equations. For hybrids less than 18 base pairs in length, T_m (°C) = 2(# of A + T bases) + 4(# of G + C bases). For hybrids above 18 base pairs in length, T_m (°C) = 81.5 + 16.6(log₁₀ [Na⁺]) + 0.41(% G + C) - (600/N), where N is the number of bases in the hybrid, and [Na⁺] is the concentration of sodium ions in the hybridization buffer ([Na⁺] for 1xSSC = 0.165M). Preferably, each such hybridizing nucleic acid has a length that is at least 25% (more preferably at least 50%, 60%, or 70%, and most preferably at least 80%) of the length of a polynucleotide of the invention to which it hybridizes, and has at least 60% sequence identity (more preferably at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, or at least 99%, and most preferably at least 99.5%) with a polynucleotide of the invention to which it hybridizes.

"Conservatively modified variants" applies to both polypeptide and polynucleotide. With respect to particular polynucleotide, conservatively modified variants refer to codons in the

WO 02/10406

PCT/US01/23734

polynucleotide which encode identical or essentially identical amino acids. Because of the degeneracy of the genetic code, a large number of functionally identical polynucleotides encode any given protein. For instance, the codons GCA, GCC, GCG and GCU all encode the amino acid alanine. Thus, at every position where an alanine is specified by a codon, the codon can be altered to any of the corresponding codons described without altering the encoded polypeptide. Such variations are "silent variations," which are one species of conservatively modified variations. Every polynucleotide sequence herein that encodes a polypeptide also describes every possible silent variation of the nucleic acid. One of skill will recognize that each codon in a polynucleotide (except AUG, which is ordinarily the only codon for methionine) can be modified to yield a functionally identical molecule. Accordingly, each silent variation of a nucleic acid that encodes a polypeptide is implicit in each described sequence.

The invention also provides methodology for analysis of polynucleotides of the invention on "DNA chips" as described in Hacia *et al.*, *Nature Genetics*, 14:441-447 (1996). For example, high-density arrays of oligonucleotides comprising a sequence encoding an MPD polypeptide, fragment, or a variant or mutant thereof are applied and immobilized to the chip and can be used to detect sequence variations in a population. Polynucleotides in a test sample are hybridized to the immobilized oligonucleotides. The hybridization profile of the target polynucleotide to the immobilized probe is quantitated and compared to a reference profile. The resulting genetic information can be used in molecular diagnosis. The density of oligonucleotides on DNA chips can be modified as needed.

The invention also provides genes corresponding to the polynucleotides disclosed herein. "Corresponding genes" are the regions of the genome that are transcribed to produce the mRNAs from which cDNA molecules are derived and may include contiguous regions of the genome necessary for the regulated expression of such genes. Corresponding genes may therefore include but are not limited to coding sequences, 5' and 3' untranslated regions, alternatively spliced exons, introns, promoters, enhancers, and silencer or suppressor elements. The corresponding genes can be isolated in accordance with known methods using the sequence information disclosed herein. Such methods include the preparation of probes or primers from the disclosed sequence information for identification and/or amplification of genes in appropriate genomic libraries or other sources of genomic materials.

Expression, isolation, and purification of the polypeptides and fragments of the invention can be accomplished by any suitable technique, including but not limited to the following methods.

The isolated polynucleotides of the invention may be operably linked to an expression control sequence such as the pMT2 or pED expression vectors disclosed in Kaufman *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19:4485 (1991); and Pouwels *et al.* *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, (1985, and Supplements), in order to produce a polypeptide of the invention recombinantly. Many suitable expression control sequences are known in the art. General methods

WO 02/10406

PCT/US01/23734

of expressing recombinant polypeptides are also known and are exemplified in R. Kaufman, *Methods in Enzymology* 185:537 (1990). As defined herein "operably linked" means that an isolated polynucleotide of the invention and an expression control sequence are situated within a vector or cell in such a way that the polypeptide encoded by the polynucleotide is expressed by a host cell which has been transformed (transfected) with the vector or polynucleotide operably linked to the control sequence.

In addition, a sequence encoding an appropriate signal peptide (native or heterologous) can be incorporated into expression vectors. The choice of signal peptide or leader can depend on factors such as the type of host cells in which the recombinant polypeptide is to be produced. Examples of heterologous signal peptides that are functional in mammalian host cells include the signal sequence for interleukin (IL)-7 (see, U.S. Patent 4,965,195); the signal sequence for IL-2 receptor (see, Cosman *et al.*, *Nature* 312:768, 1984); the IL-4 receptor signal peptide (see, EP 367,566); the type I IL-1 receptor signal peptide (see, U.S. Patent 4,968,607); and the type II IL-1 receptor signal peptide (see, EP 460,846). A signal peptide that is functional in the intended host cells promotes extracellular secretion of the polypeptide. The signal peptide is cleaved from the polypeptide upon secretion of a polypeptide from the cell. A polypeptide preparation can include a mixture of polypeptide molecules having different N-terminal amino acids, resulting from cleavage of the signal peptide at more than one site.

Established methods for introducing DNA into mammalian cells have been described (Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15-69). Additional protocols using commercially available reagents, such as Lipofectamine or Lipofectamine-Plus lipid reagent (Gibco/BRL), can be used to transfect cells (Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7412, 1987). In addition, electroporation can be used to transfect mammalian cells using conventional procedures, such as those in Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed. Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Selection of stable transformants can be performed using methods known in the art, such as, for example, resistance to cytotoxic drugs. Kaufman *et al.*, *Meth. in Enzymology* 185:487, 1990, describes several selection schemes, such as dihydrofolate reductase (DHFR) resistance. A suitable strain for DHFR selection can be CHO strain DX-B11, which is deficient in DHFR (Uriah *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216, 1980). A plasmid expressing the DHFR cDNA can be introduced into strain DX-B11, and only cells that contain the plasmid can grow in the appropriate selective media. Other examples of selectable markers that can be incorporated into an expression vector include cDNAs conferring resistance to antibiotics, such as G418 and hygromycin B. Cells harboring the vector are selected on the basis of resistance to these compounds.

Alternatively, gene products can be obtained via homologous recombination, or "gene targeting" techniques. Such techniques employ the introduction of exogenous transcription control elements (such as the CMV promoter or the like) in a particular predetermined site on the genome,

WO 02/10406

PCT/US01/23734

to induce expression of an endogenous gene encoding an MPD polypeptide of the invention. The location of integration into a host chromosome or genome can be easily determined by one of skill in the art, given the known location and sequence of the gene. In a preferred embodiment, the invention also contemplates the introduction of exogenous transcriptional control elements in conjunction with an amplifiable gene, to produce increased amounts of the gene product. The practice of homologous recombination or gene targeting is explained by Schimke, *et al.* "Amplification of Genes in Somatic Mammalian cells," *Methods in Enzymology* 151:85 (1987), and by Capecchi, *et al.*, "The New Mouse Genetics: Altering the Genome by Gene Targeting," *TIG* 5:70 (1989).

- 10 Suitable host cells for expression of the polypeptide include eukaryotic and prokaryotic cells. Mammalian host cells include, for example, the COS-7 line of monkey kidney cells (ATCC CRL 1651) (Ghuzman *et al.*, *Cell* 23:175, 1981), L cells, C127 cells, 3T3 cells (ATCC CCL 163), Chinese hamster ovary (CHO) cells, HeLa cells, BHK (ATCC CRL 10) cell lines, the CV1/EBNA cell line derived from the African green monkey kidney cell line CV1 (ATCC CCL 70) (see, 15 McMahon *et al.* *EMBO J.* 10: 2821, 1991), human kidney 293 cells, human epidermal A431 cells, human Colo205 cells, other transformed primate cell lines, normal diploid cells, cell strains derived from *in vitro* culture of primary tissue, primary explants, HL-60, U937, HaK or Jurkat cells. Alternatively, it may be possible to produce the polypeptide in lower eukaryotes such as yeast or in prokaryotes such as bacteria. Potentially suitable yeast strains include *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* strains, *Candida*, or any yeast strain 20 capable of expressing heterologous polypeptides. Potentially suitable bacterial strains include, for example, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, or any bacterial strain capable of expressing heterologous polypeptides. If the polypeptide is made in yeast or bacteria, it may be necessary to modify the polypeptide produced therein, for example by phosphorylation or glycosylation of the appropriate sites, in order to obtain the functional polypeptide. Such covalent 25 attachments may be accomplished using known chemical or enzymatic methods. The polypeptide may also be produced by operably linking a polynucleotide of the invention to suitable control sequences in one or more insect expression vectors, and employing an insect expression system. Materials and methods for baculovirus/insect cell expression systems are commercially available 30 in kit form from, *e.g.*, Invitrogen, San Diego, CA, U.S.A. (the MaxBac® kit), as well as methods described in Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), and Luckow and Summers, *BioTechnology* 6:47 (1988), incorporated herein by reference. Cell-free translation systems could also be employed to produce polypeptides using RNAs derived from nucleic acid constructs disclosed herein. A host cell that comprises an isolated polynucleotide 35 of the invention, preferably operably linked to at least one expression control sequence, is a "recombinant host cell".

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Any method, which neutralizes MPD polypeptides or inhibits expression (either transcription or translation) of an MPD polynucleotide can be used to reduce the biological activities of MPD polypeptides.

- In one embodiment, antagonists can be designed to reduce the level of endogenous MPD expression, *e.g.*, using known antisense or ribozyme approaches to inhibit or prevent translation of MPD mRNA transcripts; triple helix approaches to inhibit transcription of MPD genes; or targeted homologous recombination to inactivate or "knock out" the MPD genes or their endogenous promoters or enhancer elements. Such antisense, ribozyme, and triple helix antagonists may be designed to reduce or inhibit either unimpaired or, if appropriate, mutant MPD activity.
- Antisense RNA and DNA molecules act to directly block the translation of mRNA by hybridizing to targeted mRNA and preventing polypeptide translation. Antisense approaches involve the design of oligonucleotides (either DNA or RNA) that are complementary to a mRNA having an MPD polynucleotide sequence. Absolute complementarity, although preferred, is not required. Oligonucleotides that are complementary to the 5' end of the message, *e.g.*, the 5' untranslated sequence up to, and including, the AUG initiation codon, should work most efficiently at inhibiting translation. Antisense nucleic acids are preferably oligonucleotides ranging from 6 to about 50 nucleotides in length. The oligonucleotides can be DNA, RNA, chimeric mixtures, derivatives or modified versions thereof, single-stranded or double-stranded. The oligonucleotide can be modified at the base moiety, sugar moiety, or phosphate backbone, for example, to improve stability of the molecule, hybridization, and the like. The oligonucleotide may include other appended groups such as peptides (*e.g.*, for targeting host cell receptors *in vivo*), or agents facilitating transport across the cell membrane (see, *e.g.*, Lotsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553, 1989; Lemaitre *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648, 1987; PCT Publication No. WO88/09810), or hybridization-triggered cleavage agents or intercalating agents (see, *e.g.*, Zon, Pharm. Res. 5:539, 1988). The antisense molecules are delivered to cells, which express a transcript having an MPD polynucleotide sequence *in vivo* by, for example, direct injection into the tissue or cell derivation site, or modified antisense molecules, designed to target the desired cells (*e.g.*, antisense linked to peptides or antibodies that specifically bind receptors or antigens expressed on the target cell surface) can be administered systemically. Preferred approach utilizes a recombinant DNA construct in which the antisense oligonucleotide is placed under the control of a strong pol III or pol II promoter.

- Ribozyme molecules designed to catalytically cleave mRNA transcripts having an MPD polynucleotide sequence prevent translation of MPD mRNA (see, *e.g.*, PCT International Publication WO90/11364; US Patent No. 5,824,519). Ribozymes are RNA molecules possessing the ability to specifically cleave other single-stranded RNA. Because ribozymes are sequence-specific, only mRNAs with particular sequences are inactivated. There are two basic types of ribozymes namely, tetrahymena-type (Hasselhoff, Nature, 334:585, 1988) and "hammerhead".

WO 02/10406

PCT/US01/23734

type. Tetrahymena-type ribozymes recognize sequences, which are four bases in length, while "hammerhead"-type ribozymes recognize base sequences 11-18 bases in length. The longer the recognition sequence, the greater the likelihood that the sequence will occur exclusively in the target mRNA species. Consequently, hammerhead-type ribozymes are preferable to tetrahymena-type ribozymes. As in the antisense approach, ribozymes can be composed of modified oligonucleotides and delivered using using a DNA construct "encoding" the ribozyme under the control of a strong constitutive pol III or pol II promoter.

Alternatively, endogenous MPD expression can be reduced by targeting DNA sequences complementary to a regulatory region of the target gene (e.g., the target gene promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the target gene (see generally, Helene, *Anticancer Drug Des.*, 6(6), 569, 1991; Helene, *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660:27, 1992; and Maher, *Bioassays* 14(12), 307, 1992).

Antisense, ribozyme, and triple helix molecules of the invention may be prepared by any method known in the art for the synthesis of DNA and RNA molecules and include techniques for chemically synthesizing oligodeoxyribonucleotides and oligoribonucleotides such as, for example, solid phase phosphoramidite chemical synthesis using an automated DNA synthesizer available from Biosearch, Applied Biosystems. Phosphorothioate oligonucleotides may be synthesized by the method of Stein *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16:3209, 1988. Methylphosphonate oligonucleotides can be prepared by use of controlled pore glass polymer supports (Sarin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:7448, 1988). Alternatively, RNA molecules may be generated by *in vitro* and *in vivo* transcription of DNA sequences encoding the antisense RNA molecule.

Endogenous gene expression can also be reduced by inactivating or "knocking out" the target gene or its promoter using targeted homologous recombination (see, e.g., Smithies, *et al.*, *Nature* 317:230, 1985; Thomas and Capecchi, *Cell* 51, 503, 1987; Thompson, *et al.*, *Cell* 5, 313, 1989; each of which is incorporated by reference herein in its entirety). For example, a mutant non-functional target gene (or a completely unrelated DNA sequence) flanked by DNA homologous to the endogenous target gene can be used, with or without a selectable marker and/or a negative selectable marker. Insertion of the DNA construct, via targeted homologous recombination, results in inactivation of the target gene. Such approaches are particularly suited where modifications to embryonic stem cells can be used to generate non-human animal offspring with an inactive target gene (e.g., see Thomas and Capecchi, 1987 and Thompson, 1989, *supra*; see also the "RNA interference" ("RNAi") technique of Grishok *et al.*, *Science* 287 (5462): 2494, 2000), and Dernburg *et al.*, *Genes Dev.* 14 (13): 1578, 2000).

As used herein, a "transgenic animal" is an animal that includes a transgene that is inserted into an embryonic cell and becomes a part of the genome of the animal that develops from that cell, or an offspring of such an animal. Any non-human animal that can be produced by transgenic technology is included in the invention, although mammals are preferred. Preferred mammals

WO 02/10406

PCT/US01/23734

include non-human primates, sheep, goats, horses, cattle, pigs, rabbits, and rodents, such as, guinea pigs, hamsters, rats, gerbils, and mice.

A "transgene" is a polynucleotide that comprises one or more selected sequences (*e.g.*, encoding ribozymes that cleave MPD mRNA, encoding an antisense molecule to an MPD mRNA, encoding a mutant MPD sequence, and the like) to be expressed in a transgenic animal. The polynucleotide is partly or entirely heterologous, *i.e.*, foreign, to the transgenic animal, or homologous to an endogenous gene of the transgenic animal, but which is designed to be inserted into the animal's genome at a location which differs from that of the natural gene. A transgene may include one or more promoters and any other DNA sequences, such as introns, necessary for expression of the selected DNA, all operably linked to the selected DNA, and may include an enhancer sequence.

The transgenic animal can be used in order to identify the impact of increased or decreased MPD levels on a particular pathway or phenotype. Protocols useful in producing such transgenic animals are known in the art (see, *e.g.*, Brinster, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438, 1985; Juvenisch, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1260, 1976; Hogan, *et al.*, 1986, Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Jahner, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6927, 1985; Van der Putten, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148; Steward, *et al.*, EMBO J., 6:383, 1987; Jahner, *et al.*, Nature, 298:623, 1982).

In another embodiment, Antibodies that are immunoreactive with the polypeptides of the invention are provided herein. The MPD polypeptides, fragments, variants, fusion polypeptides, and the like, as set forth above, can be employed as "immunogens" in producing antibodies immunoreactive therewith. Such antibodies specifically bind to the polypeptides via the antigen-binding sites of the antibody. Specifically binding antibodies are those that will specifically recognize and bind with MPD polypeptides, homologues, and variants, but not with other molecules. In a preferred embodiment, the antibodies are specific for polypeptides having an MPD amino acid sequence of the invention and do not cross-react with other polypeptides.

More specifically, the polypeptides, fragment, variants, fusion polypeptides, and the like contain antigenic determinants or epitopes that elicit the formation of antibodies. These antigenic determinants or epitopes can be either linear or conformational (discontinuous). Linear epitopes are composed of a single section of amino acids of the polypeptide, while conformational or discontinuous epitopes are composed of amino acids sections from different regions of the polypeptide chain that are brought into close proximity upon polypeptide folding. Epitopes can be identified by any of the methods known in the art. Additionally, epitopes from the polypeptides of the invention can be used as research reagents, in assays, and to purify specific binding antibodies from substances such as polyclonal sera or supernatants from cultured hybridomas. Such epitopes or variants thereof can be produced using techniques known in the art such as solid-phase

WO 02/10406

PCT/US01/23734

synthesis, chemical or enzymatic cleavage of a polypeptide, or using recombinant DNA technology.

Both polyclonal and monoclonal antibodies to the polypeptides of the invention can be prepared by conventional techniques. See, for example, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet *et al.* (eds.), Plenum Press, New York (1980); and *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988); Kohler and Milstein, (U.S. Pat. No. 4,376,110); the human B-cell hybridoma technique (Kosbor *et al.*, *Immunology Today* 4:72, 1983; Cole *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026, 1983); and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al.*, 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Hybridoma cell lines that produce monoclonal antibodies specific for the polypeptides of the invention are also contemplated herein. Such hybridomas can be produced and identified by conventional techniques. For the production of antibodies, various host animals may be immunized by injection with an MPD polypeptide, fragment, variant, or mutants thereof. Such host animals may include, but are not limited to, rabbits, mice, and rats, to name a few. Various adjuvants may be used to increase the immunological response. Depending on the host species, such adjuvants include, but are not limited to, Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (*Bacille Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum*. The monoclonal antibodies can be recovered by conventional techniques. Such monoclonal antibodies may be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, and any subclass thereof.

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Takeda *et al.*, *Nature*, 314:452, 1985) by splicing the genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used. A chimeric antibody is a molecule in which different portions are derived from different animal species, such as those having a variable region derived from a porcine mAb and a human immunoglobulin constant region. The monoclonal antibodies of the invention also include humanized versions of murine monoclonal antibodies. Such humanized antibodies can be prepared by known techniques and offer the advantage of reduced immunogenicity when the antibodies are administered to humans. Procedures for the production of chimeric and further engineered monoclonal antibodies include those described in Riechmann *et al.* (*Nature* 332:323, 1988), Liu *et al.* (*PNAS* 84:3439, 1987), Larrick *et al.* (*BioTechnology* 7:934, 1989), and Winter and Harris (*TIPS* 14:139, Jan, 1993). Procedures to generate antibodies transgenically can be found in GB 2,272,440, US Patent Nos. 5,569,825 and 5,545,806 and related patents claiming priority therefrom, all of which are incorporated by reference herein. Preferably, for use in humans, the antibodies are human or humanized; techniques for creating such human antibodies

WO 02/10406

PCT/US01/23734

are also known. Transgenic animals for making human antibodies are available from, for example, Medarex Inc. (Princeton, NJ) and Abgenix Inc. (Fremont, CA).

Antibody fragments, which recognize specific epitopes, may be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited to: the $F(ab')_2$ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the $(ab')_2$ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed (Huse *et al.*, Science, 246:1275, 1989) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity. Techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Pat. No. 4,946,778; Bird, Science 242:423, 1988; Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988; and Ward *et al.*, Nature 334:544, 1989) can also be adapted to produce single chain antibodies against polypeptides containing MPD amino acid sequences. In addition, antibodies to the MPD polypeptide can, in turn, be utilized to generate anti-idiotypic antibodies that "mimic" an MPD polypeptide and that may bind to the MPD polypeptide using techniques known to those skilled in the art. (See, *e.g.*, Greenspan & Bona, PASEB J 7(5):437, 1993; and Nissinoff, J. Immunol. 147(8):2429, 1991).

Screening procedures to identify such antibodies are known, and can involve immunoaffinity chromatography, for example. Antibodies can be screened for agonistic (*i.e.*, ligand-mimicking) properties. Such antibodies, upon binding to an MPD polypeptide on the cell surface, can induce biological effects (*e.g.*, transduction of biological signals) similar to the biological effects induced when the naturally occurring MPD binding partner binds to the polypeptide on the cell surface. Agonistic antibodies can be used to induce MPD mediated co-stimulatory pathways or intercellular communication.

In addition, antibodies that block binding of a polypeptide having an MPD polypeptide sequence of the invention to its binding partner or substrate can be used to inhibit MPD polypeptide mediated intercellular communication or co-stimulation that results from such binding and/or to identify integrin cognates of an MPD polypeptide. Such blocking antibodies can be identified using any suitable assay procedure, such as by testing antibodies for the ability to inhibit binding of an MPD polypeptide to certain cells expressing a binding partner (*e.g.*, an integrin) to the polypeptide. Alternatively, blocking antibodies can be identified in assays for the ability to inhibit a biological effect that results from binding of an MPD polypeptide to target cells. In one embodiment, a flow cytometric integrin mAb based binding inhibition assay is used to show binding of MPDdis-Fc polypeptides to integrins expressed on the surface of endothelial cells. Human endothelial cells can be used in such assay. Human endothelial cells express $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, β_1 , β_2 , α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , α_5 , and α_6 integrins. An MPDdis-Fc polypeptide is contacted with the endothelial cells. Monoclonal antibodies specific for human integrins $\alpha_3\beta_1$ (LM609, anti-CD51/61, Chemicon, Temecula, CA; Brooks *et al.*, Science 264:569, 1994), $\alpha_2\beta_1$ (BHA2.1, anti-CD49b,

WO 02/10406

PCT/US01/23734

- Chemicon; Wang *et al.*, Mol. Biol. of the Cell 9:865, 1998), $\alpha_5\beta_1$ (SAM-1, anti-CD49c, Biodesign; A. te Velde *et al.*, J. Immunol. 140:1548, 1988), $\alpha_5\beta_1$ (ASC-6, anti-CD49c, Chemicon; Pattaramalai *et al.*, Exp. Cell. Res. 222: 281, 1996), $\alpha_4\beta_1$ (HP2/1, anti-CD49d, Immunotech, Marseille, France; Workshop of the 4th International Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Vienna Austria, 1989, workshop number p091), $\alpha_4\beta_1$ (GoH3, anti-CD49f, Immunotech; Workshop 4th International Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens, workshop number p055), $\alpha_6\beta_4$ (439-9B, anti-CD104, Pharmingen, San Diego, CA; Schlossman *et al.*, 1995 Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, New York), and $\alpha_v\beta_3$ (MAB 1961, Chemicon; Weinaker, *et al.*, J. Biol. Chem. 269:6940, 1994) were shown to bind specifically to HMVEC-d. Each of these antibodies is known to specifically block binding of the indicated integrin to its ligands (*e.g.*, fibronectin, vitronectin, fibrinogen). The ability of integrin mAbs to inhibit the binding of MPDdis-Fe polypeptides reveals which integrins the disintegrin domain of an MPD polypeptide binds and, indirectly, which integrin binding activities the disintegrin domains are able to antagonize. MPDdis-Fe polypeptides that bind to select integrins are further tested for the ability to disrupt integrin-ligand interactions and to modulate endothelial cell function, angiogenesis, and other biological activities *in vitro* and *in vivo*.

- Disorders caused or exacerbated (directly or indirectly) by the interaction of MPD polypeptides with a cell surface-binding partner can thus be treated. A therapeutic method involves *in vivo* administration of a blocking antibody to a subject in an amount effective to inhibit MPD binding-mediated biological activity. As used herein, a "subject" can be any animal, preferably a mammal (*e.g.*, canine, feline, bovine, porcine, equine, primates, and the like), and most preferably a human. Monoclonal antibodies are generally preferred for use in such therapeutic methods. In one embodiment, an antigen-binding antibody fragment is employed. Compositions comprising an antibody against an MPD polypeptide, and a physiologically acceptable diluent, excipient, or carrier, are provided herein.

- Also provided herein are conjugates comprising a detectable (*e.g.*, diagnostic) or therapeutic agent attached to an anti-MPD polypeptide antibody. The conjugates find use in *in vitro* or *in vivo* procedures. The antibodies of the invention can also be used in assays to detect the presence of the polypeptides or fragments of the invention, either *in vitro* or *in vivo*. The antibodies also can be employed in purifying polypeptides or fragments of the invention by immunoaffinity chromatography.

- In another embodiment, rational drug design is used to produce structural analogs of biologically active polypeptides of interest or of small molecules with which they interact, *e.g.*, substrates, binding agents, inhibitors, agonists, antagonists, and the like. The methods provided herein can be used to fashion or identify agents which are more active or stable forms of the polypeptide or which enhance or interfere with the function of a polypeptide *in vivo* (Hodgson J,

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Biotechnology 9:19, 1991, incorporated herein by reference). In one approach, the three-dimensional structure of a polypeptide of the invention, a ligand or binding partner, or of a polypeptide-binding partner complex, is determined by x-ray crystallography, by nuclear magnetic resonance, or by computer homology modeling or, most typically, by a combination of these approaches. Relevant structural information is used to design analogous molecules, to identify efficient inhibitors, or to identify small molecules that may bind to a polypeptide of the invention. The use of ADAM polypeptide structural information, preferably MPD structural information, in molecular modeling software systems provides for the design of inhibitors or binding agents useful in modulating MPD activity. A particular method of the invention comprises analyzing the three dimensional structure of MPD polypeptides for likely binding sites of substrates or ligands, synthesizing a new molecule that incorporates a predictive reactive site, and assaying the new molecule as described further herein. Examples of algorithms, software, and methods for modeling substrates or binding agents based upon the three-dimensional structure of a protein are described in PCT publication WO107579A2, the disclosure of which is incorporated herein.

It is also possible to isolate a target-specific antibody, selected by a functional assay, as described further herein, and then to solve its crystal structure thus yielding a pharmacore upon which subsequent drug design can be based. It is possible to bypass polypeptide crystallography altogether by generating anti-idiotypic antibodies (anti-ids) to a functional, pharmacologically active antibody. As a mirror image of a mirror image, the binding site of the anti-ids would be expected to be an analog of the original receptor. The anti-id could then be used to identify and isolate peptides from banks of chemically or biologically produced peptides. The isolated peptides would then act as the pharmacore.

The invention provides methods for identifying agents that modulate MPD polypeptide activity or expression. Such methods included contacting a sample containing an MPD polypeptide or polynucleotide with a test agent under conditions that allow for the test agent and the polypeptide or polynucleotide to interact and measuring the expression or activity of an MPD polypeptide in the presence or absence of the test agent.

In one embodiment, a cell containing an MPD polynucleotide is contacted with a test agent under conditions such that the cell and test agent are allowed to interact. Such conditions typically include normal cell culture conditions consistent with the particular cell type being utilized and which are known in the art. It may be desirable to allow the test agent and cell to interact under conditions associated with increased temperature or in the presence of reagents that facilitate the uptake of the test agent by the cell. A control is treated similarly but in the absence of the test agent. Alternatively, the MPD activity or expression may be measured prior to contact with the test agent (e.g., the standard or control measurement) and then again following contact with the test agent. The treated cell is then compared to the control and a difference in the expression or

WO 02/10406

PCT/US01/23734

activity of MPD compared to the control is indicative of an agent that modulates MPD activity or expression.

When MPD expression is being measured, detecting the amount of mRNA encoding an MPD polypeptide in the cell can be quantified by, for example, PCR or Northern blot. Where a change in the amount of MPD polypeptide in the sample is being measured, detecting or
 5 quantifying MPD polypeptide can be performed using anti-MPD antibodies using known techniques.

A test agent can be any molecule typically used in the modulation of protein activity or expression and includes, for example, small molecules, chemicals, peptidomimetics, antibodies, peptides, polynucleotides (e.g., antisense or ribozyme molecules), and the like. Accordingly,
 10 agents developed by computer based drug design can be tested in the laboratory using the assay and methods described herein to determine the activity of the agent on the modulation of MPD activity or expression. Modulation of MPD includes an increase or decrease in activity or expression.

An MPD polypeptide of the invention (including fragments, variants, oligomers, and other forms) are useful in a variety of assays. For example, an MPD polypeptide of the invention can be used to identify binding partners of members of the ADAM family of polypeptides, which can also be used to modulate intercellular communication, co-stimulation, or immune cell activity. Alternatively, they can be used to identify non-binding-partner molecules or substances that
 20 modulate intercellular communication, co-stimulatory pathways, or immune cell activity.

MPD polypeptides and fragments thereof can be used to identify binding partners. For example, they can be tested for the ability to bind a candidate-binding partner in any suitable assay, such as a conventional binding assay. To illustrate, an MPD polypeptide or fragment thereof can be labeled with a detectable molecule (e.g., a radionuclide, a chromophore, and an enzyme that
 25 catalyzes a colorimetric or fluorometric reaction and the like). The labeled polypeptide is contacted with cells expressing the candidate-binding partner. The cells then are washed to remove unbound-labeled polypeptide, and the presence of cell-bound label is determined by a suitable technique, chosen according to the nature of the label.

In one embodiment, a binding partner integrin is identified by the use of anti-integrin antibodies. The ability of integrin mAbs to inhibit the binding of MPDdis-Fc polypeptides reveals which integrin the disintegrin domain binds and, indirectly, which integrin binding activities the disintegrin domain is able to antagonize. MPDdis-Fc polypeptides that bind to select integrins are further tested for the ability to disrupt integrin-ligand interactions and to modulate endothelial cell function, angiogenesis, and other biological activities *in vitro* and *in vivo*.
 30

In another example of a binding assay a recombinant expression vector containing the candidate binding partner cDNA is transfected into CV1-EBNA-1 cells. The cells are incubated for 1 hour at 37°C with various concentrations of, for example, a soluble MPD polypeptide/Fc fusion
 35

WO 02/10406

PCT/US01/23734

polypeptide. Cells are washed and incubated with a constant saturating concentration of a ^{125}I -mouse anti-human IgG. After washing, cells are released via trypsinization. The mouse anti-human IgG employed above is directed against the Fc region of human IgG and can be obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA. The antibody will bind to the Fc portion of any Fc polypeptide that has bound to the cells. Cell-bound ^{125}I -antibody is quantified on a Packard Autogamma counter.

Where an MPD polypeptide binds or potentially binds to another polypeptide (e.g., in a receptor-ligand interaction), the MPD polynucleotide can also be used in interaction trap assays (see, e.g., Gyunis *et al.*, Cell 75:791, 1993) to identify polynucleotides encoding the other polypeptide with which binding occurs or to identify inhibitors of the binding interaction. Polypeptides involved in these binding interactions can also be used to screen for peptide or small molecule inhibitors or agonists of the binding interaction.

Another type of suitable binding assay is a competitive binding assay. To illustrate, biological activity of a variant can be determined by assaying for the variant's ability to compete with the native polypeptide for binding to the candidate-binding partner. Competitive binding assays can be performed by conventional methodology. Reagents that can be employed in competitive binding assays include a radiolabeled MPD fragment or variant and intact cells expressing MPD (endogenous or recombinant) on the cell surface. Instead of intact cells, one could substitute a soluble binding partner/Fc fusion polypeptide bound to a solid phase through the interaction of Polypeptide A or Polypeptide G (on the solid phase) with the Fc moiety. Chromatography columns that contain Polypeptide A and G include those available from Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ.

Enzymatic assays can be used to measure metalloproteinase activity of MPD polypeptides. For example, the activity of an MPD metalloproteinase polypeptide can be measured by incubating a fluorescently labeled MPD metalloproteinase substrate with an MPD metalloproteinase polypeptide and measuring a change in the fluorescence or location of fluorescence. Development of fluorescently labeled substrates is known in the art.

The influence of MPD polypeptides, MPD fragments and antibodies on intercellular communication, co-stimulation, integrin binding, endothelial cell migration, angiogenesis or immune cell activity can be assayed by contacting a cell or a group of cells with a polynucleotide, polypeptide, agonist or antagonist, to induce, enhance, suppress, or arrest cellular communication, costimulation, integrin binding, endothelial cell migration, angiogenesis or activity in the target cells. Identification of MPD polypeptides, agonists or antagonists can be carried out via a variety of assays known to those skilled in the art. Included in such assays are those that evaluate the ability of an MPD polypeptide to influence intercellular communication, co-stimulation, integrin binding, endothelial cell migration, or angiogenesis. Such an assay would involve, for example, the analysis of cell-cell interactions (e.g., through integrin-related binding) in the presence of an MPD

WO 02/10406

PCT/US01/23734

polypeptide or soluble disintegrin fragment thereof. In such an assay, one would determine a rate of cell-cell interaction, cell matrix interaction, or integrin associated binding in the presence of a polypeptide having an MPD sequence and then determine if such binding or interaction is altered in the presence of, e.g., a soluble disintegrin MPD (MPDdis) sequence. Exemplary assays for this aspect of the invention includes endothelial migration assays. Other assays are known in the art.

In another aspect, the invention provides a method of detecting the ability of a test agent to affect the cell-cell interaction, cell-matrix interaction, integrin-associated binding activity, endothelial cell migratory activity, or angiogenic activity of the test agent on a cell or culture. In this aspect, the method comprises: (1) contacting a first group of target cells with a test agent including a polypeptide comprising an MPD sequence (e.g., SEQ ID NO:1-27; or a soluble MPD disintegrin polypeptide), a ligand or receptor for an MPD polypeptide, or fragment thereof, under conditions appropriate to the particular assay being used; (2) measuring the net rate of cell-cell interaction, cell-matrix interaction, integrin-associated binding activity, endothelial cell migratory activity, or angiogenic activity among the target cells; and (3) observing the net rate of cell-cell interaction, cell-matrix interaction, integrin-associated binding activity, endothelial cell migratory activity, or angiogenic activity among control cells containing an MPD polypeptide ligand or fragments thereof, in the absence of a test agent, under otherwise identical conditions as the first group of cells. In this embodiment, the net rate of intercellular communication or co-stimulation in the control cells is compared to that of the cells treated with both an MPD molecule as well as a test agent. The comparison will provide a difference in the net rate of cell-cell interaction, cell-matrix interaction, integrin-associated binding activity, endothelial cell migratory activity, or angiogenic activity indicative of an agent that modulates MPD activity. The test agent can function as an effector by either activating or up-regulating, or by inhibiting or down-regulating cell-cell interaction, cell-matrix interaction, integrin-associated binding, endothelial cell migratory activity, or angiogenic activity.

A polypeptide of the invention may exhibit cytokine production or inhibition activity, cell proliferation (either inducing or inhibiting), or cell differentiation (either inducing or inhibiting) activity. Many polypeptide factors discovered to date, including all known cytokines, have exhibited activity in one or more cell proliferation assays, and hence the assays serve as a convenient confirmation of cytokine activity. The activity of a polypeptide of the invention is evidenced by any one of a number of routine factor dependent cell proliferation assays for cell lines including, without limitation, 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BuF3, MC9/G, M+ (preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e and CMK. The activity of an MPD polypeptide of the invention may be measured by the following methods:

Assays for T-cell or thymocyte proliferation include, without limitation, those described in: Current Protocols in Immunology, Ed. by Coligan *et al.*, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, *In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19;

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Takai *et al.*, *J. Immunol.* 137:3494, 1986; Bertagnoli *et al.*, *J. Immunol.* 145:1706, 1990; Bertagnoli *et al.*, *Cell. Immunol.* 133:327, 1991; Bertagnoli *et al.*, *J. Immunol.* 149:3778, 1992; Bowman *et al.*, *J. Immunol.* 152: 1756, 1994.

5 Assays for cytokine production and/or proliferation of spleen cells, lymph node cells or thymocytes include, without limitation, those described in: Polyclonal T cell stimulation, Kruisheek, A. M. and Shevach, Vol 1 pp. 3.12.1-3.12.14, and Measurement of mouse and human Interferon γ , Schreiber, R. D. Vol 1 pp. 6.8.1-6.8.8. In *Current Protocols in Immunology*, E. M. Coligan eds. John Wiley and Sons, Toronto, 1994; Coligan eds., John Wiley and Sons, Toronto, 1994.

10 Assays for proliferation and differentiation of hematopoietic and lymphopoietic cells include, without limitation, those described in: Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4, Bottomly *et al.*, In *Current Protocols in Immunology*, Coligan eds. Vol 1 pp. 6.3.1-6.3.12, John Wiley and Sons, Toronto, 1991; deVries *et al.*, *J. Exp. Med.* 173:1205, 1991; Moreau *et al.*, *Nature* 336:690, 1988; Greenberger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2931, 15 1983; Measurement of mouse and human interleukin 6, Nordan, R. In *Current Protocols in Immunology*, Coligan eds. Vol 1 pp. 6.6.1-6.6.5, John Wiley and Sons, Toronto, 1991; Smith *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:1857, 1986; Measurement of human Interleukin 11, Bennett *et al.*, In *Current Protocols in Immunology*, Coligan eds. Vol 1 pp. 6.15.1 John Wiley and Sons, Toronto, 1991; Measurement of mouse and human Interleukin 9, Ciardetta *et al.*, In *Current*

20 Protocols in Immunology, Coligan eds. Vol 1 pp. 6.13.1, John Wiley and Sons, Toronto, 1991.

Assays for T-cell clone responses to antigens (which will identify, among others, polypeptides that affect APC-T cell interactions as well as direct T-cell effects by measuring proliferation and cytokine production) include, without limitation, those described in: *Current Protocols in Immunology*, Coligan eds., Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, *in vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function; Chapter 6, Cytokines and their cellular receptors; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Weinberger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6091, 1980; Weinberger *et al.*, *Eur. J. Immun.* 11:405, 1981; Takai *et al.*, *J. Immunol.* 137:3494, 1986; Takai *et al.*, *J. Immunol.* 140:508, 1988.

30 Assays for thymocyte or splenocyte cytotoxicity include, without limitation, *Current Protocols in Immunology*, Coligan eds., Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (*in vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function pp. 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Herrmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2488, 1981; Herrmann *et al.*, *J. Immunol.* 128:1968, 1982; Harada *et al.*, *J. Immunol.* 135:1564, 1985; Takai *et al.*, *J. Immunol.* 137:3494, 1986; Takai *et al.*, *J. Immunol.* 140:508, 1988; Bowman *et al.*, *J. Virol.* 35 61:1992; Bertagnoli *et al.*, *Cell. Imm.* 133:327, 1991; Brown *et al.*, *J. Immun.* 153:3079, 1994.

Assays for T-cell dependent IgG responses and isotype switching (which will identify, among others, polypeptides that modulate T-cell dependent antibody responses and that affect

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Th1/Th2 profiles) include, without limitation, those described in: Maliszewski, J. Immunol. 144:3028, 1990; and Assays for B cell function: *In vitro* antibody production, Mond, J. J. and Brunswick, M. In Current Protocols in Immunology. Coligan eds. Vol 1 pp. 3.8.1-3.8.16, Wiley and Sons, Toronto, 1994.

- 5 Mixed lymphocyte reaction (MLR) assays (which will identify, among others, polypeptides that generate predominantly Th1 and CTL responses) include, without limitation, those described in: Current Protocols in Immunology, Coligan eds., Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (*In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function pp 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Takai *et al.*, 1986, *supra*; Takai *et al.*, 1988, *supra*;
- 10 Bertagnoli *et al.*, J. Immunol. 149:3778, 1992.

- Dendritic cell-dependent assays (which will identify, among others, polypeptides expressed by dendritic cells that activate naive T-cells) include, without limitation, those described in: Guery *et al.*, J. Immunol. 134:536, 1995; Inaba *et al.*, J. of Exp. Med. 173:549, 1991; Macatonia *et al.*, J. Immunol. 154:5071, 1995; Porgador *et al.*, J. of Exp. Med. 182:255, 1995;
- 15 Nair *et al.*, J. Virol. 67:4062, 1993; Huang *et al.*, Science 264:961, 1994; Macatonia *et al.*, J. of Exp. Med. 169:1255, 1989; Bhardwaj *et al.*, J. Clin. Invest. 94:797, 1994; and Inaba *et al.*, J. of Exp. Med. 172:631, 1990.

- Assays for lymphocyte survival/apoptosis (which will identify, among others, polypeptides that prevent apoptosis after superantigen induction and polypeptides that regulate lymphocyte homeostasis) include, without limitation, those described in: Darzynkiewicz *et al.*, Cytometry 13:795, 1992; Gorczyca *et al.*, Leukemia 7:659, 1993; Gorczyca *et al.*, Cancer Research 53:1945, 1993; Itoh *et al.*, Cell 66:233, 1991; Zacharchuk, J. Immunol. 145:4037, 1990; Zamai *et al.*, Cytometry 14:891, 1993; Gorczyca *et al.*, Int. J. of Oncology 1:639, 1992.
- 20 Assays for polypeptides that influence early steps of T-cell commitment and development

- 25 include, without limitation, those described in: Antica *et al.*, Blood 84:111, 1994; Fine *et al.*, Cell. Immunol. 155:111, 1994; Galy *et al.*, Blood 85:2770, 1995; Toki *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:7548, 1991.

- Assays for embryonic stem cell differentiation (which will identify, among others, polypeptides that influence embryonic differentiation hematopoiesis) include, without limitation,
- 30 those described in: Johansson *et al.* Cell. Biol. 15:141, 1995; Keller *et al.*, Mol. and Cell. Biol. 13:473, 1993; McClanahan *et al.*, Blood 81:2903, 1993.

- Assays for stem cell survival and differentiation (which will identify, among others, polypeptides that regulate lympho-hematopoiesis) include, without limitation, those described in: Methycellulose colony forming assays, Freshney, M. G. In Culture of Hematopoietic Cells. R. I. Freshney, *et al.* eds. Vol pp. 265-268, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. 1994; Hirayama *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5907-5911, 1992; Primitive hematopoietic colony forming cells with high proliferative potential, McNiece, I. K. and Briddell, R. A. In Culture of Hematopoietic
- 35

WO 02/10406

PCT/US01/23734

- Cells. R. I. Freshney, *et al.* eds. Vol pp. 23-39, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. 1994; Neben *et al.*, *Exp. Hematol.* 22:353, 1994; Cobblestone area forming cell assay, Ploemacher, In Culture of Hematopoietic Cells. Freshney, *et al.* eds. Vol pp. 1-21, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. 1994; Long term bone marrow cultures in the presence of stromal cells, Spooncer *et al.* In Culture of Hematopoietic Cells. Freshney, *et al.* eds. Vol pp. 163-179, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. 1994; Long term culture initiating cell assay, Sutherland, In Culture of Hematopoietic Cells. Freshney, *et al.* eds. Vol pp. 139-162, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. 1994.
- Assays for tissue generation activity include, without limitation, those described in: Patent Publication No. WO95/16035 (bone, cartilage, tendon); Patent Publication No. WO95/05846 (nerve, neuron); Patent Publication No. WO91/07491 (skin, endothelium). Assays for wound healing activity include, without limitation, those described in: Winter, *Epidermal Wound Healing*, pp. 71-112 (Muitbach, and Rowe, eds.), Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, as modified by Eaglstein and Mertz, *J. Invest. Dermatol.* 71:382-84 (1978).
- Assays for activin/inhibin activity include, without limitation, those described in: Vale *et al.*, *Endocrinol.* 91:562, 1972; Ling *et al.*, *Nature* 321:779, 1986; Vale *et al.*, *Nature* 321:776, 1986; Mason *et al.*, *Nature* 318:659, 1985; Forage *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3091, 1986.
- Assays for cell movement and adhesion include, without limitation, those described in: Current Protocols in Immunology, Coligan eds., Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 6.12, Measurement of α and β Chemokines 6.12.1-6.12.28; Taub *et al.* *J. Clin. Invest.* 95:1370-1376, 1995; Lind *et al.* *APMIS* 103:140, 1995; Muller *et al.* *Eur. J. Immunol.* 25: 1744; Gruber *et al.* *J. Immunol.* 152:5860, 1994; Johnston *et al.* *J. Immunol.* 153: 1762, 1994.
- Assay for hemostatic and thrombolytic activity include, without limitation, those described in: Linet *et al.*, *J. Clin. Pharmacol.* 26:131, 1986; Burdick *et al.*, *Thrombosis Res.* 45:413, 1987; Humphrey *et al.*, *Fibrinolysis* 5:71, 1991; Schaub, *Prostaglandins* 35:467, 1988.
- Assays for receptor-ligand activity include, without limitation, those described in: Current Protocols in Immunology, Coligan eds., Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 7.28, Measurement of Cellular Adhesion under static conditions 7.28.1-7.28.22); Takai *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6864, 1987; Bierer *et al.*, *J. Exp. Med.* 168:1145, 1988; Rosenstein *et al.*, *J. Exp. Med.* 169:149, 1989; Stoltenberg *et al.*, *J. Immunol. Methods* 175:59, 1994; Stitt *et al.*, *Cell* 80:661, 1995.
- Assays for cadherin adhesive and invasive suppressor activity include, without limitation, those described in: Hortsch *et al.* *J. Biol. Chem.* 270(32):18809, 1995; Miyaki *et al.* *Oncogene* 11: 2547, 1995; Ozawa *et al.* *Cell* 63:1033, 1990.
- A polynucleotide encoding a polypeptide having an MPD sequence provided by the invention can be used for numerous diagnostic or other useful purposes. A polynucleotide of the

WO 02/10406

PCT/US01/23734

invention (e.g., a polynucleotide encoding SEQ ID NO:1-26 or 27) can be used as markers for tissues in which the corresponding polypeptide is preferentially expressed, as molecular weight markers on Southern gels, as chromosome markers or tags to identify chromosomes or to map related gene positions, to compare with endogenous DNA sequences in subjects to identify potential genetic disorders, as probes to hybridize and thus discover novel related polynucleotides, as a source of information to derive PCR primers for genetic fingerprinting, as a probe to "subtract-out" known polynucleotides in the process of discovering other novel nucleic acids, as an antigen to raise anti-DNA antibodies or elicit another immune response, and for gene therapy.

Probes and Primers. Among the uses of the disclosed MPD polynucleotides, and combinations of fragments thereof, is the use of fragments as probes or primers. Such fragments generally comprise at least about 17 contiguous nucleotides of a DNA sequence. In other embodiments, a DNA fragment comprises at least 30, or at least 60 contiguous nucleotides of a DNA sequence. The basic parameters affecting the choice of hybridization conditions and guidance for devising suitable conditions are set forth by Sambrook *et al.*, 1989 and are described in detail above. Using knowledge of the genetic code in combination with the amino acid sequences set forth above, sets of degenerate oligonucleotides can be prepared. Such oligonucleotides are useful as primers, e.g., in polymerase chain reactions (PCR), whereby DNA fragments are isolated and amplified. In certain embodiments, degenerate primers can be used as probes for non-human genetic libraries. Such libraries would include but are not limited to cDNA libraries, genomic libraries, and even electronic EST (express sequence tag) or DNA libraries. Homologous sequences identified by this method would then be used as probes to identify non-human homologues of the MPD sequence identified herein.

Chromosome Mapping. The polynucleotides encoding MPD polypeptides, and the disclosed fragments and combinations of these polynucleotides, can be used by those skilled in the art using known techniques to identify the human chromosome to which these sequences map. Useful techniques include, but are not limited to, using the sequence or portions, including oligonucleotides, as a probe in various known techniques such as radiation hybrid mapping (high resolution), *in situ* hybridization to chromosome spreads (moderate resolution), and Southern blot hybridization to hybrid cell lines containing individual human chromosomes (low resolution). The following web site provides additional information about radiation hybrid mapping: www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/human_STS_releases/july97/07-97.INTRO.html.

A polynucleotide encoding a polypeptide having an MPD polypeptide sequence of the invention, and the disclosed fragments and combinations of these polynucleotides can be used to analyze abnormalities associated with the genes corresponding to MPD polypeptides. This enables one to distinguish conditions in which this marker is rearranged or deleted. In addition, polynucleotides of the invention or a fragment thereof can be used as a positional marker to map other genes of unknown location. The polynucleotide can be used in developing treatments for any

WO 02/10406

PCT/US01/23734

disorder mediated (directly or indirectly) by defective, or insufficient amounts of, genes (*e.g.*, an MPD-associated disorder) corresponding to the polynucleotides of the invention. The polynucleotides and associated sequences disclosed herein permit the detection of defective genes, and the replacement thereof with normal genes. Defective genes can be detected in *in vitro* diagnostic assays, and by comparison of the polynucleotide sequences disclosed herein with that of a gene derived from a subject suspected of harboring a defect in this gene or having an MPD-associated disorder.

Uses of MPD polypeptides and peptide fragments thereof include, but are not limited to, the following: delivery agents; therapeutic and research reagents; molecular weight and isoelectric focusing markers; controls for peptide fragmentation; identification of unknown polypeptides; and preparation of antibodies.

The MPD polypeptides (*e.g.*, SEQ ID NO:1-26 or 27) of the invention can be used as polypeptide purification reagents. For example, MPD polypeptides can be attached to a solid support material and used to purify its binding partners (*e.g.*, an integrin molecule) by affinity chromatography. In particular embodiments, a polypeptide is attached to a solid support by conventional procedures. As one example, chromatography columns containing functional groups that will react with amino acid side chains of polypeptides are available (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ). In an alternative, an MPD-Fc polypeptide is attached to Polypeptide A- or Polypeptide G-containing chromatography columns through interaction with the Fc moiety. The polypeptide also finds use in purifying or identifying cells that express a binding partner on the cell surface. Polypeptides are bound to a solid phase such as a column chromatography matrix or a similar suitable substrate. For example, magnetic microspheres can be coated with the polypeptides and held in an incubation vessel through a magnetic field. Suspensions of cell mixtures containing the binding partner expressing cells are contacted with the solid phase having the polypeptides thereon. Cells expressing the binding partner on the cell surface bind to the polypeptides on the solid phase, and unbound cells then are washed away. Alternatively, the polypeptides can be conjugated to a detectable moiety, then incubated with cells to be tested for binding partner expression. After incubation, unbound-labeled matter is removed and the presence or absence of the detectable moiety on the cells is determined.

Carriers and Delivery Agents. The polypeptides also find use as carriers for delivering agents attached thereto to cells bearing identified binding partners (*e.g.*, an integrin). The polypeptides thus can be used to deliver diagnostic or therapeutic agents to such cells in *in vitro* or *in vivo* procedures. Detectable (diagnostic) and therapeutic agents that can be attached to a polypeptide include, but are not limited to, toxins, other cytotoxic agents, drugs, radionuclides, chromophores, enzymes that catalyze a colorimetric or fluorometric reaction, and the like, with the particular agent being chosen according to the intended application. Among the toxins are ricin, abrin, diphtheria toxin, *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, ribosomal inactivating polypeptides,

WO 02/10406

PCT/US01/23734

mycotoxins such as trichothecenes, and derivatives and fragments (e.g., single chains) thereof. Radionuclides suitable for diagnostic use include, but are not limited to, ^{125}I , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , and ^{76}Br . Examples of radionuclides suitable for therapeutic use are ^{131}I , ^{211}At , ^{77}Br , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{106}Pd , ^{64}Cu , and ^{67}Cu . Such agents can be attached to the polypeptide by any suitable conventional procedure. The polypeptide comprises functional groups on amino acid side chains that can be reacted with functional groups on a desired agent to form covalent bonds, for example. Alternatively, the polypeptide or agent can be derivatized to generate or attach a desired reactive functional group. The derivatization can involve attachment of one of the bifunctional coupling reagents available for attaching various molecules to polypeptides (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois). Of particular interest are soluble MPD disintegrins that can be used to target cells expressing a binding partner for the MPD disintegrin moiety (e.g., an integrin). Such soluble MPD disintegrins can be used to target reagents to cells expressing, for example, the disintegrin's cognate integrin. Similarly, and as discussed more fully below, antibodies specific for an MPD polypeptide can be labeled with a diagnostic or therapeutic agent and used to target the diagnostic or therapeutic to cells expressing an MPD polypeptide.

MPD polypeptides and MPD fragments (e.g., fragments having disintegrin and/or metalloproteinase activity) can be employed in modulating a biological activity of an ADAM polypeptide, particularly MPD polypeptide, in *in vitro* or *in vivo* procedures. Encompassed within the invention are domains of MPD polypeptides that act as modulators of native ADAM polypeptide function, including native MPD activity, when expressed as fragments or as components of fusion polypeptides. For example, a substantially purified polypeptide domain of the invention can be used to inhibit binding of an MPD polypeptide to endogenous binding partners. Such use effectively would block MPD interactions and inhibit MPD activities. In still another aspect of the invention, a soluble form of an MPD binding partner (e.g., a soluble integrin domain) is used to bind to, and competitively inhibit activation of the endogenous MPD polypeptide.

In another embodiment, the invention is directed to methods of inhibiting the binding of an integrin to its ligand, and thereby inhibiting the biological activity of the integrin, comprising contacting the integrin with an effective amount of an MPDdis polypeptide. The invention is further directed to methods of inhibiting endothelial cell migration and methods of inhibiting angiogenesis comprising administering an effective amount of an MPDdis polypeptide. In some embodiments the MPDdis polypeptide is in the form of a multimer, preferably a leucine zipper multimer or Fc polypeptide. Alternatively, substantially purified or modified MPD polypeptides of the invention can be administered to modulate interactions between MPD polypeptides and MPD binding partners that are not membrane-bound.

Antibodies that bind to MPD polypeptides can inhibit MPD polypeptide activity and may act as antagonists. For example, antibodies that specifically bind to one or more epitopes of an

WO 02/10406

PCT/US01/23734

MPD polypeptide, or epitope of conserved variants of MPD polypeptides, or fragments can be used to inhibit MPD activity. By "specifically bind" means that an antibody to an MPD polypeptide or fragment thereof will not cross-react with unrelated polypeptides. Preferably such an antibody will not cross-react with other members of the ADAM family.

5 In an alternative aspect, the invention further encompasses the use of agonists of MPD activity to treat or ameliorate the symptoms of a disease for which increased disintegrin activity is beneficial. In a preferred aspect, the invention entails administering compositions comprising an MPD polynucleotide or fragment thereof or a polypeptide comprising an MPD amino acid sequence (e.g., SEQ ID NO:1-26 or 27) or fragment thereof. The administering may be to cells *in* 10 *vitro*, to cells *ex vivo*, to cells *in vivo*, and/or to a multicellular organism. Preferred therapeutic forms include soluble forms of an MPD having disintegrin activity. Such a soluble MPD disintegrin polypeptide will bind to its binding partner (e.g., an integrin) and stimulate a biological activity associated with the binding partner.

In still another aspect of the invention, the compositions comprise administering a 15 polynucleotide encoding an MPD polypeptide for expression in a host organism for treatment of disease. Particularly preferred in this regard is expression in a human subject for treatment of a dysfunction associated with aberrant (e.g., decreased) endogenous activity of an MPD polypeptide. Furthermore, the invention encompasses the administration of compounds found to increase the endogenous activity of polypeptides comprising an MPD amino acid sequence to cells and/or 20 organisms. One example of compounds that increase MPD polypeptide activity are antibodies that bind to MPD polypeptides, preferably monoclonal antibodies, and increase or stimulate MPD polypeptide activity by causing constitutive intracellular signaling (or "ligand mimicking"), or by preventing the binding of a native inhibitor of MPD polypeptide activity.

Due to the multiplicity and interconnectedness of biological pathways and interactions, an 25 MPD polypeptide, fragment, variant, antagonist, agonist, antibody, and binding partner of the invention can be useful for treating medical conditions and diseases associated with cell-cell and cell matrix interactions (e.g., integrin-mediated disorders), endothelial migration, angiogenesis, inflammation, cancer, allergy, reproductive, neurological and vascular conditions as described further herein. The therapeutic molecule or molecules to be used will depend on the etiology of the 30 condition to be treated and the biological pathways involved, and will consider that different variants, antagonists, and binding partners of MPD polypeptides may have similar or different effects. For example, an MPD polypeptide or fragment thereof may act as an antagonist of a protein processing function of metalloproteinases (e.g., from other members of the ADAM family of polypeptides) by interacting with an ADAM binding partner and preventing the activity of the 35 metalloproteinase upon its substrate. Accordingly, an MPD may modulate protein processing, such as release of growth factors, adhesion proteins, and inflammatory factors.

WO 02/10406

PCT/US01/23734

The disclosed MPD polypeptides, fragments thereof, antibodies, compositions and combination therapies described herein are useful in medicines for treating bacterial, viral or protozoal infections, and complications resulting therefrom. Cardiovascular disorders are treatable with the disclosed MPD polypeptides, fragments thereof, antibodies, pharmaceutical compositions or combination therapies, including aortic aneurysms; arteritis; vascular occlusion; complications of coronary by-pass surgery; ischemia/reperfusion injury; heart disease; heart failure; and myocardial infarction. In addition, the MPD polypeptides, fragments thereof, antibodies, compositions and combination therapies of the invention can be used to treat chronic pain conditions, to treat various disorders of the endocrine system, conditions of the gastrointestinal system, disorders of the genitourinary system, and anemias and hematological disorders.

Due to the role of integrins (*e.g.*, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, β_1 , β_2 , α_4 , α_5 , α_6 , α_7 , and α_8 integrins) in cell proliferative disorders, including cancer and cancer cell metastasis, also provided herein are methods for using MPD polypeptides, fragments thereof, antibodies, compositions or combination therapies to treat various hematologic and oncologic disorders. For example, soluble MPD disintegrin domains can be used to treat various forms of cancer, including acute myelogenous leukemia, Epstein-Barr virus-positive nasopharyngeal carcinoma, glioma, colon, stomach, prostate, renal cell, cervical and ovarian cancers, lung cancer (SCLC and NSCLC), including cancer-associated cachexia, fatigue, asthenia, paraneoplastic syndrome of cachexia, and hypercalcemia by modulating integrin-associated interactions.

Additional diseases treatable with the polypeptides, fragments, antibodies, compositions or combination therapies of the invention are solid tumors, including sarcoma, osteosarcoma, and carcinoma, such as adenocarcinoma (*e.g.*, breast cancer) and squamous cell carcinoma. Administration of a soluble MPD disintegrin domain can modulate cell-cell and cell-matrix interactions of such tumor cells and/or modulate the angiogenesis and blood supply to such tumors.

In addition, the MPD polypeptides, fragments thereof, compositions or combination therapies are useful for treating leukemia, including acute myelogenous leukemia, chronic or acute lymphoblastic leukemia and hairy cell leukemia. Other malignancies with invasive metastatic potential that can be treated with the MPD polypeptides, fragments, antibodies, compositions and combination therapies, include multiple myeloma, various lymphoproliferative disorders such as autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS), chronic lymphoblastic leukemia, hairy cell leukemia, chronic lymphatic leukemia, peripheral T-cell lymphoma, small lymphocytic lymphoma, mantle cell lymphoma, follicular lymphoma, Burkitt's lymphoma, Epstein-Barr virus-positive T cell lymphoma, histiocytic lymphoma, Hodgkin's disease, diffuse aggressive lymphoma, acute lymphatic leukemias, T gamma lymphoproliferative disease, cutaneous B cell lymphoma, cutaneous T cell lymphoma (*i.e.*, mycosis fungoides), and Sézary syndrome.

WO 02/10406

PCT/US01/23734

A combination of at least one MPD polypeptide, fragment thereof, or antibody, and one or more anti-angiogenesis factors or other therapeutic agent(s) may be administered to the subject. The additional therapeutic agent(s) may be administered prior to, concurrently with, or following the administration of the MPD polypeptide, fragment thereof, or antibody. The use of more than one therapeutic agent is particularly advantageous when the subject that is being treated has a solid tumor. In some embodiments of the invention, the treatment further comprises treating the mammal with radiation. Radiation, including brachytherapy and teletherapy, may be administered prior to, concurrently with, or following the administration of the MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner and/or additional therapeutic agent(s).

In some embodiments the method includes the administration of, in addition to a MPD polypeptide, fragment thereof, or antibody, one or more therapeutics selected from the group consisting of alkylating agents, antimetabolites, vinca alkaloids and other plant-derived chemotherapeutics, antitumor antibiotics, antitumor enzymes, topoisomerase inhibitors, platinum analogs, adrenocortical suppressants, hormones and antihormones, antibodies, immunotherapeutics, radiotherapeutics, and biological response modifiers.

In some embodiments the method includes administration of, in addition to an MPD polypeptide, fragment thereof, or antibody, one or more therapeutics selected from the group consisting of cisplatin, cyclophosphamide, mechlorethamine, melphalan, bleomycin, carboplatin, fluorouracil, 5-fluorodeoxyuridine, methotrexate, taxol, asparaginase, vincristine, and vinblastine, lymphokines and cytokines such as interleukins, interferons (α , β or δ) and TNF, chlorambucil, busulfan, carmustine, lomustine, semustine, streptozocin, dacarbazine, cytarabine, mercaptopurine, thioguanine, vindesine, etoposide, teniposide, dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin, bleomycin, plicamycin, mitomycin, L-asparaginase, hydroxyurea, methylhydrazine, mitotane, tamoxifen, fluoxymesterone, IL-8 inhibitors, angiostatin, endostatin, kringle 5, angiopoietin-2 or other antagonists of angiopoietin-1, antagonists of platelet-activating factor, antagonists of basic fibroblast growth factor, and COX-2 inhibitors.

In some embodiments the method includes administration of, in addition to an MPD polypeptide, fragment thereof, or antibody, one or more therapeutic polypeptides, including soluble forms thereof, selected from the group consisting of Flt3 ligand (see, U.S. Patent No. 5,554,512), CD40 ligand (see, U.S. Patent No. 5,716,805), IL-2, IL-12, 4-1BB ligand (see, U.S. Patent No. 5,674,704), anti-4-1BB antibodies, TRAIL, TNF antagonists and TNF receptor antagonists including TNFR/Fc, Tek antagonists, TWEAK antagonists and TWEAK-R (see, U.S. Serial Numbers 60/172,878 and 60/203,347 and Feng *et al.*, Am. J. Pathol. 156(4):1253) antagonists including TWEAK-R/Fc, VEGF antagonists including anti-VEGF antibodies, VEGF receptor (including VEGF-R1 and VEGF-R2, also known as Flt1 and Flk1 or KDR) antagonists, CD148 (also referred to as DEP-1, FCRTF, and PTPRI, see Takahashi *et al.*, J. Am. Soc. Nephrol. 10:2135-45, 1999; and PCT Publication No. WO 00/15258, 23 March 2000) binding proteins, and

WO 02/10406

PCT/US01/23734

nectin-3 (see, Satoh-Horikawa *et al.*, J. Biol. Chem. 275(14):10291, 2000; GenBank accession numbers of human nectin-3 nucleic acid and polypeptide sequences are AF282874 and AAJ97597, respectively) antagonists.

In some preferred embodiments an MPD polypeptide, fragment thereof, or antibody of the invention is used as a component of, or in combination with, "metronomic therapy," such as that described by Browder *et al.* and Klement *et al.* (Cancer Research 60:1878, 2000; J. Clin. Invest. 105(8):R15, 2000; see also Barinaga, Science 288:245, 2000).

This invention provides compounds, compositions, and methods for treating a subject, preferably a mammalian subject, and most preferably a human subject, who is suffering from a medical disorder and in particular, an MPD-associated disorder. Such MPD-associated disorders include conditions caused (directly or indirectly) or exacerbated by binding between a polypeptide having an MPD sequence and its binding partner (*e.g.*, an integrin). For purposes of this disclosure, the terms "illness," "disease," "disorder," "medical condition," "abnormal condition" and the like are used interchangeably with the term "medical disorder." The terms "treat", "treating", and "treatment" used herein include curative, preventative (*e.g.*, prophylactic) and palliative or ameliorative treatment. For such therapeutic uses, MPD polypeptides and fragments, MPD polynucleotides encoding an MPD polypeptide, and/or agonists or antagonists of the MPD polypeptide such as antibodies can be administered to the subject in need through known means. Compositions of the invention can contain a polypeptide in any form described herein, such as native polypeptides, variants, derivatives, oligomers, and biologically active fragments. In particular embodiments, the composition comprises a soluble polypeptide or an oligomer comprising soluble MPD polypeptides (*e.g.*, a soluble MPD disintegrin domain).

In practicing the method of treatment or use of the invention, a therapeutically effective amount of a therapeutic agent of the invention is administered to a subject having a condition to be treated, preferably to treat or ameliorate diseases associated with the activity of an MPD polypeptide. "Therapeutic agent" includes without limitation any MPD polypeptide, fragment, and variant; polynucleotide encoding an MPD polypeptide, fragment, and variant; agonists or antagonists of the an MPD polypeptide such as antibodies; an MPD polypeptide binding partner; complexes formed from an MPD polypeptide, fragment, variant, and binding partner, and the like. As used herein, the term "therapeutically effective amount" means the total amount of each therapeutic agent or other active component of the pharmaceutical composition or method that is sufficient to show a meaningful subject benefit, *e.g.*, treatment, healing, prevention or amelioration of the relevant medical condition, or an increase in rate of treatment, healing, prevention or amelioration of such conditions. When applied to an individual therapeutic agent or active ingredient, administered alone, the term refers to that ingredient alone. When applied to a combination, the term refers to combined amounts of the ingredients that result in the therapeutic effect, whether administered in combination, serially or simultaneously. As used herein, the phrase

WO 02/10406

PCT/US01/23734

"administering a therapeutically effective amount" of a therapeutic agent means that the subject is treated with said therapeutic agent in an amount and for a time sufficient to induce an improvement, and preferably a sustained improvement, in at least one indicator that reflects the severity of the disorder. An improvement is considered "sustained" if the subject exhibits the improvement on at least two occasions separated by one or more weeks. The degree of improvement is determined based on signs or symptoms, and determinations may also employ questionnaires that are administered to the subject, such as quality-of-life questionnaires. Various indicators that reflect the extent of the subject's illness may be assessed for determining whether the amount and time of the treatment is sufficient. The baseline value for the chosen indicator or indicators is established by examination of the subject prior to administration of the first dose of the therapeutic agent. Preferably, the baseline examination is done within about 60 days of administering the first dose. If the therapeutic agent is being administered to treat acute symptoms, the first dose is administered as soon as practically possible after the injury has occurred. Improvement is induced by administering therapeutic agents such as an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner until the subject manifests an improvement over baseline for the chosen indicator or indicators. In treating chronic conditions, this degree of improvement is obtained by repeatedly administering this medicament over a period of at least a month or more, e.g., for one, two, or three months or longer, or indefinitely. A period of one to six weeks, or even a single dose, often is sufficient for treating acute conditions. Although the extent of the subject's illness after treatment may appear improved according to one or more indicators, treatment may be continued indefinitely at the same level or at a reduced dose or frequency. Once treatment has been reduced or discontinued, it later may be resumed at the original level if symptoms should reappear.

One skilled in the art will recognize that suitable dosages will vary, depending upon such factors as the nature and severity of the disorder to be treated, the subject's body weight, age, general condition, and prior illnesses and/or treatments, and the route of administration. Preliminary doses can be determined according to animal tests, and the scaling of dosages for human administration is performed according to art-accepted practices such as standard dosing trials. For example, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. The dosage will depend on the specific activity of the compound and can be readily determined by routine experimentation. A dose may be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC_{50} (i.e., the concentration of the test compound which achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture, while minimizing toxicities. Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Ultimately, the attending physician will decide the amount of polypeptide of the invention with which to treat each individual subject. Initially, the attending physician will administer low doses of polypeptide of the invention and observe the subject's response. Larger

WO 02/10406

PCT/US01/23734

doses of polypeptide of the invention may be administered until the optimal therapeutic effect is obtained for the subject, and at that point the dosage is not increased further. It is contemplated that the various pharmaceutical compositions used to practice the method of the invention should contain about 0.01 ng to about 100 mg (preferably about 0.1 ng to about 10 mg, more preferably about 0.1 microgram to about 1 mg) of a polypeptide of the invention per kg body weight. In one embodiment of the invention, an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner is administered one time per week to treat the various medical disorders disclosed herein. In another embodiment polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner is administered at least two times per week and in another embodiment at least three times per week. If injected, the effective amount of an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner per adult dose ranges from 1-20 mg/m², and preferably is about 5-12 mg/m². Alternatively, a flat dose may be administered whose amount may range from 5-100 mg/dose. Exemplary dose ranges for a flat dose to be administered by subcutaneous injection are 5-25 mg/dose, 25-50 mg/dose and 50-100 mg/dose. In one embodiment of the invention, the various indications described herein are treated by administering a preparation acceptable for injection containing an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner at 25 mg/dose, or alternatively, containing 50 mg per dose. The 25 mg or 50 mg dose may be administered repeatedly, particularly for chronic conditions. If a route of administration other than injection is used, the dose is appropriately adjusted in accord with standard medical practices. In many instances, an improvement in a subject's condition will be obtained by injecting a dose of about 25 mg of an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner one to three times per week over a period of at least three weeks, or a dose of 50 mg of an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner one or two times per week for at least three weeks (a treatment for longer periods may be necessary to induce the desired degree of improvement). For incurable chronic conditions, the regimen may be continued indefinitely, with adjustments being made to dose and frequency if such are deemed necessary by the subject's physician. The foregoing doses are examples for an adult subject who is a person who is 18 years of age or older. For pediatric subjects (age 4-17), a suitable regimen involves the subcutaneous injection of 0.4 mg/kg, up to a maximum dose of 25 mg of an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner, administered by subcutaneous injection one or more times per week. If an antibody against an MPD polypeptide is used as an MPD polypeptide antagonist, a preferred dose range is 0.1 to 20 mg/kg, and more preferably is 1-10 mg/kg. Another preferred dose range for an anti-MPD polypeptide antibody is 0.75 to 7.5 mg/kg of body weight. Humanized antibodies are preferred. Such antibodies may be injected or administered intravenously.

Compositions comprising an effective amount of an MPD polypeptide of the invention (from whatever source derived, including without limitation from recombinant and non-recombinant sources), in combination with other components such as a physiologically acceptable

WO 02/10406

PCT/US01/23734

diluent, carrier, or excipient, are provided herein. The term "pharmaceutically acceptable" means a non-toxic material that does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredient(s). Formulations suitable for administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions which may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats and solutes which render the formulation isotonic with the blood of the recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions which may include suspending agents or thickening agents. The polypeptides can be formulated according to known methods used to prepare pharmaceutically useful compositions. They can be combined in admixture, either as the sole active material or with other known active materials suitable for a given indication, with pharmaceutically acceptable diluents (e.g., saline, Tris-HCl, acetate, and phosphate buffered solutions), preservatives (e.g., thimerosal, benzyl alcohol, parabens), emulsifiers, solubilizers, adjuvants and/or carriers. Suitable formulations for pharmaceutical compositions include those described in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th ed. 1980, Mack Publishing Company, Easton, PA. In some embodiments the polypeptide may undergo pegylation to assist in adsorption or uptake. For example, such compositions can be complexed with polyethylene glycol (PEG), metal ions, or incorporated into polymeric compounds such as polyacetic acid, polyglycolic acid, hydrogels, dextran, and the like, or incorporated into liposomes, microemulsions, micelles, unilamellar or multilamellar vesicles, erythrocyte ghosts or spheroblasts. Suitable lipids for liposomal formulation include, without limitation, monoglycerides, diglycerides, sulfatides, lysolecithin, phospholipids, saponin, bile acids, and the like. Preparation of such liposomal formulations is within the level of skill in the art, as disclosed, for example, in U.S. Pat. No. 4,235,871; U.S. Pat. No. 4,501,728; U.S. Pat. No. 4,837,028; and U.S. Pat. No. 4,737,323, all of which are incorporated herein by reference. Such compositions will influence the physical state, solubility, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance, and are thus chosen according to the intended application, so that the characteristics of the carrier will depend on the selected route of administration. In one preferred embodiment of the invention, sustained-release forms of an MPD polypeptide are used. Sustained-release forms suitable for use in the disclosed methods include, but are not limited to, an MPD polypeptide that is encapsulated in a slowly-dissolving biocompatible polymer (such as the alginate microparticles described in U.S. Pat. No. 6,036,978), admixed with such a polymer (including topically applied hydrogels), and or encased in a biocompatible semi-permeable implant.

An MPD polypeptide of the invention may be active in multimers (e.g., heterodimers or homodimers) or complexes with itself or other polypeptides. As a result, pharmaceutical compositions of the invention may comprise a polypeptide of the invention in such multimeric or complexed form. The pharmaceutical composition of the invention may be in the form of a complex of the polypeptide(s) of invention. The invention further includes the administration of an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner concurrently with one or more

WO 02/10406

PCT/US01/23734

other drugs that are administered to the same subject in combination, each drug being administered according to a regimen suitable for that medicament. "Concurrent administration" encompasses simultaneous or sequential treatment with the components of the combination, as well as regimens in which the drugs are alternated, or wherein one component is administered long-term and the other(s) are administered intermittently. Components may be administered in the same or in separate compositions, and by the same or different routes of administration. Examples of components that may be included in the pharmaceutical composition of the invention are cytokines, lymphokines, or other hematopoietic factors such as: M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-17, IL-18, IFN, TNF α , TNF β , TNF γ , G-CSF, Meg-CSF, thrombopoietin, stem cell factor, and erythropoietin. The pharmaceutical composition may further contain other agents that either enhance the activity of the polypeptide or complement its activity or use in treatment. Such additional factors and/or agents may be included in the pharmaceutical composition to produce a synergistic effect with a polypeptide of the invention, or to minimize side effects. Conversely, an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner of the invention may be included in formulations with a particular cytokine, lymphokine, other hematopoietic factor, thrombolytic or anti-thrombotic factor, or anti-inflammatory agent to minimize side effects of the cytokine, lymphokine, other hematopoietic factor, thrombolytic or anti-thrombotic factor, or anti-inflammatory agent. Additional examples of drugs to be administered concurrently include but are not limited to antivirals, antibiotics, analgesics, corticosteroids, antagonists of inflammatory cytokines, non-steroidal anti-inflammatories, pentoxifylline, thalidomide, and disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) such as azathioprine, cyclophosphamide, cyclosporine, hydroxychloroquine sulfate, methotrexate, leflunomide, minocycline, penicillamine, sulfasalazine and gold compounds such as oral gold, gold sodium thiomalate, and aurothioglucose. Additionally, an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner may be combined with a second MPD polypeptide, antibody against an MPD polypeptide, or an MPD polypeptide-derived peptide that acts as a competitive inhibitor of a native an MPD polypeptide.

Any efficacious route of administration may be used to therapeutically administer an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner thereof, including those compositions comprising MPD polynucleotides. Parenteral administration includes injection, for example, via intra-articular, intravenous, intramuscular, intralesional, intraperitoneal or subcutaneous routes by bolus injection or by continuous infusion. Other routes include localized administration, *e.g.*, at a site of disease or injury. Other suitable means of administration include sustained release from implants; aerosol inhalation and/or insufflation; eyedrops; vaginal or rectal suppositories; buccal preparations; oral preparations, including pills, syrups, lozenges or chewing gum; and topical preparations such as lotions, gels, sprays, ointments or other suitable techniques. Alternatively, MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner may be delivered by implanting

WO 02/10406

PCT/US01/23734

cells that express the polypeptide, for example, by implanting cells that express an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner. Cells may also be cultured *ex vivo* in the presence of polypeptides of the invention in order to proliferate or to produce a desired effect on or activity in such cells. Treated cells can then be introduced *in vivo* for therapeutic purposes. In
 5 another embodiment, the subject's own cells are induced to produce an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner by transfection *in vivo* or *ex vivo* with a polynucleotide that encodes an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner. The polynucleotide can be introduced into the subject's cells, for example, by injecting naked
 10 DNA or liposome-encapsulated DNA that encodes an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner, or by other means of transfection. Polynucleotides of the invention may also be administered to subjects by other known methods for introduction of nucleic acids into a cell or organism (including, without limitation, in the form of viral vectors).

When a therapeutically effective amount of an MPD polypeptide, fragment thereof, antibody, or binding partner of the invention is administered orally, the polypeptide will typically
 15 be in the form of a tablet, capsule, powder, solution or elixir. When administered in tablet form, the pharmaceutical composition of the invention may additionally contain a solid carrier such as a gelatin or an adjuvant. The tablet, capsule, and powder contain from about 5 to 95% a polypeptide of the invention, and preferably from about 25 to 90% a polypeptide of the invention. When administered in liquid form, a liquid carrier such as water, petroleum, oils of animal or plant origin
 20 such as peanut oil, mineral oil, soybean oil, or sesame oil, or synthetic oils may be added. The liquid form of the pharmaceutical composition may further contain physiological saline solution, dextrose or other saccharide solution, or glycols such as ethylene glycol, propylene glycol or polyethylene glycol. When administered in liquid form, the pharmaceutical composition contains from about 0.5 to 90% by weight of a polypeptide of the invention, and preferably from about 1 to
 25 50% a polypeptide of the invention.

When a therapeutically effective amount of an MPD polypeptide, fragment, antibody, or binding agent of the invention is administered by intravenous, cutaneous or subcutaneous injection, the polypeptide will be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable aqueous solution. The preparation of such parenterally acceptable polypeptide solutions, having due regard
 30 to pH, isotonicity, stability, and the like, is within the skill in the art. A preferred pharmaceutical composition for intravenous, cutaneous, or subcutaneous injection should contain, in addition to a polypeptide of the invention, an isotonic vehicle such as Sodium Chloride Injection, Ringer's Injection, Dextrose Injection, Dextrose and Sodium Chloride Injection, Lactated Ringer's Injection, or other vehicle as known in the art. The pharmaceutical composition of the invention
 35 may also contain stabilizers, preservatives, buffers, antioxidants, or other additives known to those of skill in the art. The duration of intravenous therapy using the pharmaceutical composition of the invention will vary, depending on the severity of the disease being treated and the condition and

WO 02/10406

PCT/US01/23734

potential idiosyncratic response of each individual subject. It is contemplated that the duration of each application of a polypeptide of the invention will be in the range of 12 to 24 hours of continuous intravenous administration. Ultimately the attending physician will decide on the appropriate duration of intravenous therapy.

- 5 For compositions of the invention which are useful for tissue repair or regeneration, the therapeutic method includes administering a pyrogen-free, physiologically acceptable form of the composition topically, systemically, locally or in association with an implant or device. Further, the composition may desirably be encapsulated or injected in a viscous form for delivery to the site tissue damage. Additional useful agents may also optionally be included in the composition, as
- 10 described above, or may be administered simultaneously or sequentially with the composition in the methods of the invention. The compositions can include a matrix capable of delivering the polypeptide-containing composition to the site tissue damage, providing a structure for the developing tissue and optimally capable of being resorbed into the body. The choice of matrix material is based on biocompatibility, biodegradability, mechanical properties, cosmetic
- 15 appearance and interface properties. Potential matrices for the compositions include calcium sulfate, tricalciumphosphate, hydroxyapatite, polylactic acid, polyglycolic acid and polyanhydrides. Other potential matrices are nonbiodegradable and chemically defined, such as sintered hydroxyapatite, bioglass, aluminates, or other ceramics. Matrices may be comprised of combinations of any of the above mentioned types of material, such as polylactic acid and
- 20 hydroxyapatite or collagen and tricalciumphosphate. Progress can be monitored by periodic assessment of tissue/bone growth and/or repair, for example, X-rays, histomorphometric determinations and tetracycline labeling.

- In addition to human subjects, compositions comprising an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner is useful in the treatment of disease conditions in non-human
- 25 animals, such as pets (dogs, cats, birds, primates, and the like), domestic farm animals (horses, cattle, sheep, pigs, birds, and the like). In such instances, an appropriate dose may be determined according to the animal's body weight. For example, a dose of 0.2-1 mg/kg may be used. Alternatively, the dose is determined according to the animal's surface area, an exemplary dose ranging from 0.1-20 mg/m², or more preferably, from 5-12 mg/m². For small animals, such as dogs
- 30 or cats, a suitable dose is 0.4 mg/kg. In an embodiment, an MPD polypeptide, fragment, antibody, or MPD binding partner (preferably constructed from genes derived from the same species as the subject), is administered by injection or other suitable route one or more times per week until the animal's condition is improved, or it may be administered indefinitely.

- The invention also relates to the use an MPD polypeptide, fragment, and variant;
- 35 polynucleotide encoding an MPD polypeptide, fragment, and variant; agonists or antagonists of an MPD polypeptide such as antibodies; an MPD polypeptide binding partner; complexes formed

WO 02/10406

PCT/US01/23734

from an MPD polypeptide, fragment, variant, and binding partner, and the like, in the manufacture of a medicament for the prevention or therapeutic treatment of a disease or disorder.

Further encompassed by the invention are systems and methods for analyzing MPD polypeptides comprising identifying and/or characterizing one or more MPD polypeptides, encoding nucleic acids, and corresponding genes, these systems and methods preferably comprising a data set representing a set of one or more MPD molecules, or the use thereof. Accordingly, the invention provides a computer readable medium having stored thereon a member selected from the group consisting of a polypeptide comprising a sequence as set forth in SEQ ID Nos:1-26, or 27; and a set of polypeptide sequences wherein at least one of said sequences comprises a sequence as set forth in SEQ ID Nos:1-27.

One embodiment of the invention comprises a computing environment and a plurality of algorithms selectively executed to analyze a polypeptide or polynucleotide of the invention. Examples of analyses of an ADAM polypeptide include, without limitation, displaying the amino acid sequence of a polypeptide in the set, comparing the amino acid sequence of one polypeptide in the set to the amino acid sequence of another polypeptide in the set, predicting the structure of a polypeptide in the set, determining the nucleotide sequences of nucleic acids encoding a polypeptide in the set, and identifying a gene corresponding to a polypeptide in the set.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. All headings and subheadings provided herein are solely for ease of reading and should not be construed to limit the invention. The terms "a", "an" and "the" as used herein are meant to encompass the plural unless the context clearly dictates the singular form. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the invention, suitable methods and materials are described below. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting. The following examples are intended to illustrate particular embodiments and not to limit the scope of the invention.

EXAMPLE 1

Identification of MPD Polypeptides

A data set was received from Celera Genomics (Rockville, Maryland) containing amino acid sequences predicted to be encoded by the human genome. This data set was searched using a BLAST algorithm to identify ADAM family polypeptides. The polypeptides set forth in Figure 1 were identified as having substantially homology to metalloproteinase-disintegrin polypeptides, including the ADAM family of polypeptides.

WO 02/10406

PCT/US01/23734

EXAMPLE 2**RACE Analysis**

Polynucleotides encoding an MPD polypeptide are identified by rapid amplification of cDNA ends (RACE) analysis. All RACE products are cloned into vectors and sequenced. Sequence analysis of the RACE products provides a number of clones having substantially identical sequences. RACE Analysis kits are available from a number of companies including Roche Molecular Systems. Primers were designed based upon consensus sequences found by RACE product comparison.

A primer pair comprising nucleotides reverse transcribed from the polypeptide sequences of Figure 1 are used to PCR amplify a cDNA library from lymph node cells, bone marrow cells, as well as other cell types known in the art. The resulting PCR products are cloned and sequenced using standard protocols.

An analysis of the MPD sequences provided in Figure 1 demonstrate that all the sequence contain homology to metalloproteinase and/or disintegrin containing proteins, including members of the ADAM family of proteins. For example, SEQ ID Nos:4-5, 10, 14, 21-22, and 25-26 comprise the sequence HexGHxxGxxHD (SEQ ID NO:28) at residues 208 to 219, 15 to 26, 229 to 240, 555 to 566, 3 to 14, 269 to 280, and 154 to 165, respectively. SEQ ID NO:24 comprises a sequence that has substantial identity to the conserved HexGHxxGxxHD motif. Thus, a polypeptide comprising SEQ ID NO: 4, 5, 10, 14, 21, 22, 24, 25, or 26 is predicted to have metalloproteinase activity. SEQ ID Nos:4, 8, 10, 14, 18-19, 21, and 25, as well as some known metalloproteinases, share homology to a sequence comprising LNX(I/V)(A/V)LVGLE(V/I)WT and thus a polypeptide comprising SEQ ID NO: 4, 8, 10, 14, 18-19, 21, or 25 is predicted to have metalloproteinase activity. The invention also provides SEQ ID Nos:2, 3, 7, 9, 17, 20, and 27 which have a high degree of homology to the Testicular Metalloproteinase-like, Disintegrin-like, Cysteine rich (TMDC) protein family, including TMDC III, TMDC IVA, and TMDC IVC. Table 1, above, shows the relative identity of representative polypeptides of the invention with TMDC protein family members.

In addition, to the sequences above having homology to TMDC family members, a number of the polypeptides of Figure 1 have homology to the ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) family of proteins. Such polypeptides include metalloproteinase domains characterized as having the highly conserved HEXGHxxGxxHD motif (SEQ ID NO:28) and/or a LNX(I/V)(A/V)LVGLE(V/I)WT motif (SEQ ID NO:29). For example, SEQ ID Nos:4, 10, 14, 21, 25, and 26 comprise a sequence from about amino acids residues 65 to 274 of SEQ ID NO:4; 24 to 235 of SEQ ID NO:10; 85 to 290 of SEQ ID NO:14; 202 to 411 of SEQ ID NO:21; 123 to 332 of SEQ ID NO:25; and 118 to 215 of SEQ ID NO:26.

WO 02/10406

PCT/US01/23734

A number of polypeptides of Figure 1 have homology to disintegrin domain sequences typically characterized as containing a conserved motif having a sequence CGN(G/K)(L/V)(E/D)(G/N)EECDG (SEQ ID NO:30) (herein after the "CGN-GEEC" motif). For example, SEQ ID Nos:4, 10, 14, 21, and 24-26 contain the CGN-GEEC motif and thus a polypeptide comprising SEQ ID NO: 4, 10, 14, 21, 24, 25, or 26 is predicted to have disintegrin activity. SEQ ID NO:11 has a putative CGN-GEEC sequence at residues 43 to 57 and thus a polypeptide comprising SEQ ID NO:11 is predicted to have disintegrin activity. In addition, ADAM family of proteins are characterized as having a number of conserved cysteine residues in their disintegrin and cysteine-rich domains. For example, SEQ ID Nos:6, 8, 12, 13, 16, and 23, when aligned with a number of ADAM family members (e.g., ADAM 9 (accession no. NP 003807), align with the conserved cysteine residues in the disintegrin domain of such ADAM family members. Table 2, above, provides a summary of the relative domains and residues characterizing the domains of some of the polypeptides of the invention.

Variants of the MPD polypeptide sequences can be identified based upon the sequences provided herein. A number of variants are provided herein. Amino acid substitutions and other alterations (deletions, insertions, and the like) to MPD amino acid sequences are predicted to be more likely to alter or disrupt MPD polypeptide activities if they result in changes to the conserved residues of the amino acid sequences as shown in Figure 1, and particularly if those changes do not substitute an amino acid of similar structure (such as substitution of any one of the aliphatic residues - Ala, Gly, Leu, Ile, or Val - for another aliphatic residue). Conversely, if a change is made to an MPD amino acid sequence resulting in substitution of the residue at that position in an alignment from one of the other MPD polypeptide sequences, it is less likely that such an alteration will affect the function of the altered MPD polypeptide.

25

EXAMPLE 3**Monoclonal Antibodies That Bind Polypeptides of the Invention**

A substantially purified MPD polypeptide can be used to generate monoclonal antibodies immunoreactive therewith, using conventional techniques such as those described in U.S. Patent 4,411,993. Mice are immunized with an MPD polypeptide immunogen emulsified in complete Freund's adjuvant, and injected in amounts ranging from 10-100 µg subcutaneously or intraperitoneally. Ten to twelve days later, the immunized animals are boosted with additional MPD polypeptide emulsified in incomplete Freund's adjuvant. Mice are periodically boosted thereafter on a weekly to bi-weekly immunization schedule. Serum samples are periodically taken by retro-orbital bleeding or tail-tip excision to test for an MPD polypeptide antibody by dot blot assay, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) or inhibition of binding of an MPD polypeptide to an MPD polypeptide binding partner.

35

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Following detection of an appropriate antibody titer, positive animals are provided one last intravenous injection of an MPD polypeptide in saline. Three to four days later, the animals are sacrificed, spleen cells harvested, and spleen cells are fused to a murine myeloma cell line, e.g., NS1 or preferably P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580). Fusions generate hybridoma cells, which are plated in multiple microtiter plates in a HAT (hypoxanthine, aminopterin and thymidine) selective medium to inhibit proliferation of non-fused cells, myeloma hybrids, and spleen cell hybrids.

The hybridoma cells are screened by ELISA for reactivity against a substantially pure MPD polypeptide by adaptations of the techniques disclosed in Engvall *et al.* (*Immunochem.* 8:871, 1971) and in U.S. Patent 4,703,004. A preferred screening technique is the antibody capture technique described in Beckmann *et al.*, (*J. Immunol.* 144:4212, 1990). Positive hybridoma cells can be injected intraperitoneally into syngeneic BALB/c mice to produce ascites containing high concentrations of anti-MPD monoclonal antibody. Alternatively, hybridoma cells can be grown *in vitro* in flasks or roller bottles by various techniques. Monoclonal antibodies produced in mouse ascites can be purified by ammonium sulfate precipitation, followed by gel exclusion chromatography. Alternatively, affinity chromatography based upon binding of antibody to Polypeptide A or Polypeptide G can also be used, as can chromatography based upon binding to MPD polypeptide.

EXAMPLE 4

Chromosome mapping

The gene corresponding to an MPD polypeptide is mapped using PCR-based mapping strategies. Initial human chromosomal assignments are made using an MPD-specific PCR primers such as those described Example 8 and a BIOS Somatic Cell Hybrid PCRable DNA kit from BIOS Laboratories (New Haven, CT), following the manufacturer's instructions. More detailed mapping is performed using a Genebridge 4 Radiation Hybrid Panel (Research Genetics, Huntsville, AL (see, e.g., Walter, MA *et al.*, *Nature Genetics* 7:22-28, 1994). Data from this analysis is then submitted electronically to the MIT Radiation Hybrid Mapper (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>) following the instructions contained therein. This analysis yields specific genetic marker names which, when submitted electronically to NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/genemap), yield the specific chromosome interval.

EXAMPLE 5

Activity of MPD-Disintegrin Polypeptides In a Corneal Pocket Assay

To construct a polynucleotide encoding an MPD disintegrin domain fused to an Fc (an MPDdis-Fc polypeptide), a nucleic acid encoding a disintegrin domain such as amino acid residues of, for example, SEQ ID NO:6 from about residue 43 to 148; SEQ ID NO:8 from

WO 02/10406

PCT/US01/23734

about residue 1 to 366; SEQ ID NO:8 from about residue 38 to 366; SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:14 from about residue 1 to 622; SEQ ID NO:14 from about residue 84 to 622; SEQ ID NO:14 from about residue 299 to 622; SEQ ID NO:16; SEQ ID NO:21 from about residue 1 to 701; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:24 from about residue 278 to 435; SEQ ID NO:25 from about residue 1 to 627; SEQ ID NO:26; or SEQ ID NO:26 from about residue 224 to 383, beginning with the CGN-GEBC sequence and ending prior to a hydrophobic sequence indicative of a transmembrane domain are fused to a nucleic acid sequence encoding an Fc polypeptide. The construct can use the igKappa leader, which is cleaved by the signal peptidase after the C-terminal G (Glycine) amino acid. The soluble form of the molecule is then predicted to start after this residue. A few residues corresponding to codon(s) of the restriction site can be present at either end of the disintegrin domain used to link a disintegrin domain of to the Fc domain.

A mouse corneal pocket assay is used to quantitate the inhibition of angiogenesis by MPDdis-Fc polypeptides *in vivo*. In this assay, agents to be tested for angiogenic or anti-angiogenic activity are immobilized in a slow release form in a hydron pellet, which is implanted into micropockets created in the corneal epithelium of anesthetized mice. Vascularization is measured as the appearance, density, and extent of vessel in growth from the vascularized corneal limbus into the normally avascular cornea.

Hydron pellets, as described in Kenyon *et al.*, Invest Ophthalmol. & Visual Science 37:1625, 1996, incorporate sucralate with bFGF (90 ng/pellet), bFGF and IgG (11 µg/pellet, control), or bFGF and a range of concentrations of the agent to be tested (*e.g.*, MPDdis-Fc polypeptide). The pellets are surgically implanted into corneal stromal micropockets created by micro-dissection 1 mm medial to the lateral corneal limbus of 6-8 week old male C57BL mice. After five days, at the peak of neovascular response to bFGF, the corneas are photographed using a Zeiss slit lamp at an incident angle of 35-50° from the polar axis in the meridian containing the pellet. Images are digitized and processed by subtractive color filters (Adobe Photoshop 4.0) to delineate established microvessels by hemoglobin content. Image analysis software (Bioquant, Nashville, TN) is used to calculate the fraction of the corneal image that is vascularized, the vessel density within the vascularized area, and the vessel density within the total cornea. The inhibition of bFGF-induced corneal angiogenesis, as a function of the dose of MPD disintegrin-Fc polypeptide, is determined.

EXAMPLE 6

Inhibition of Neovascularization by MPD Disintegrin Polypeptides in a Murine Transplant Model

Survival of heterotopically transplanted cardiac tissue from one mouse donor to the ear skin of another genetically similar mouse requires adequate neovascularization by the transplanted

WO 02/10406

PCT/US01/23734

heart and the surrounding tissue, to promote survival and energy for cardiac muscle function. Inadequate vasculature at the site of transplant causes excessive ischemia to the heart, tissue damage, and failure of the tissue to engraft. Agents that antagonize factors involved in endothelial cell migration and vessel formation can decrease angiogenesis at the site of transplant, thereby limiting graft tissue function and ultimately engraftment itself. A murine heterotopic cardiac isograft model is used to demonstrate the antagonistic effects of MPDdis-Fc polypeptides on neovascularization.

Female BALB/c (≈ 12 weeks of age) recipients are given neonatal heart grafts from donor mice of the same strain. The donor heart tissue is grafted into the left ear pinnae of the recipient on day 0 and the mice are divided into two groups. The control group receives human IgG (Hu IgG) while the other group receives MPDdis-Fc, both intraperitoneally. The treatments are continued for five consecutive days. The functionality of the grafts is determined by monitoring visible pulsatile activity on days 7 and 14 post-engraftment. The inhibition of functional engraftment, as a function of the dose of MPDdis-Fc, is determined. The histology of the transplanted hearts is examined in order to visualize the effects of MPDdis-Fc on edema at the site of transplant and host and donor tissue vasculature (using, e.g., Factor VIII staining).

EXAMPLE 7

Treatment of Tumors with MPD Disintegrin (MPDdis) Polypeptides

MPDdis-Fc are tested in animal models of solid tumors. The effect of the MPDdis-Fc is determined by measuring tumor frequency and tumor growth. The biological activity of MPDdis-Fc is also demonstrated in other *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* assays known in the art, such as calcium mobilization assays and assays to measure platelet activation, recruitment, or aggregation.

EXAMPLE 8

Tissue Expression of MPD Polypeptides

Oligonucleotides corresponding to MPD polypeptide coding region can be used to assess MPD mRNA expression using a panel of human tissue and cell line cDNAs ("MTC cDNA," Clontech). The forward primer and reverse primer are designed to amplify a predicted coding region fragment of a desired length. Tissues and cell lines that expressed MPD mRNA, as evidenced by the presence of an amplified DNA fragment of the desired length are identified. Because an MPD polypeptide of the invention is not expressed in every tissue, the invention provides a method of tissue-typing by utilizing antibodies to the polypeptides of the invention or by utilizing oligonucleotide primers or probes specific for polynucleotides of the invention.

Accordingly, using a forward primer: 5'-CTGCTGCTGTGGCTGGGAGTG-3' (SEQ ID NO:43) and a reverse primer: 5'-GTCATACCCAAATTATGACCAAGCTCAGG-3' (SEQ ID NO:44) the following tissues were found to express an mRNA having a sequence encoding SEQ

WO 02/10406

PCT/US01/23734

DD NO:8: placenta, liver, kidney, pancreas, testis stomach, lymph node, heart, lung, colon adenocarcinoma, fetal liver, fetal lung, fetal spleen, fetal skeletal muscle, fetal thymus, fetal kidney, prostate, thymus, ovary, leukocyte, and esophagus.

5 Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be readily apparent to those of ordinary skill in the art in light of the teachings of this invention that certain changes and modifications may be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims.

WO 02/10406

PCT/US01/23734

CLAIMS

What is claimed is:

1. A substantially purified polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of:
 - (a) SEQ ID Nos: 3-4, and 6-27;
 - (b) fragments of SEQ ID NO:6 having disintegrin activity;
 - (c) fragments of SEQ ID NO:8 having disintegrin activity;
 - (d) fragments of SEQ ID NO:14 having disintegrin activity;
 - (e) fragments of SEQ ID NO:24 having metalloproteinase activity;
 - (f) fragments of SEQ ID NO:24 having disintegrin activity;
 - (g) SEQ ID NO:6 from about residue 43 to 148;
 - (h) SEQ ID NO:8 from about residue 1 to 366;
 - (i) SEQ ID NO:8 from about residue 38 to 366;
 - (j) SEQ ID NO:14 from about residue 1 to 622;
 - (k) SEQ ID NO:14 from about residue 84 to 622;
 - (l) SEQ ID NO:14 from about residue 299 to 622;
 - (m) SEQ ID NO:21 from about residue 1 to 701;
 - (n) SEQ ID NO:24 from about residue 1 to 277;
 - (o) SEQ ID NO:24 from about residue 278 to 435;
 - (p) SEQ ID NO:25 from about residue 1 to 332;
 - (q) SEQ ID NO:25 from about residue 1 to 627;
 - (r) SEQ ID NO:26 from about residue 1 to 215;
 - (s) SEQ ID NO:26 from about residue 118 to 215;
 - (t) SEQ ID NO:26 from about residue 224 to 383; and
 - (u) SEQ ID NO:27 from about residue 29 to 574.
2. A substantially purified polypeptide according to claim 1 having disintegrin activity.
3. A substantially purified polypeptide according to claim 1 having metalloproteinase activity.
4. A substantially purified polypeptide comprising a sequence that is at least 97% homologous to a sequence as set forth in SEQ ID NO:3-4, 6-11, 13-18, 20, or 23-27 wherein the polypeptide has a metalloproteinase or disintegrin activity.
5. A polypeptide of claim 1 linked to a second polypeptide, wherein the second polypeptide is a leucine zipper polypeptide, an Fc polypeptide, or a peptide linker moiety.

WO 02/10406

PCT/US01/23734

6. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 1.
7. An expression vector comprising a polynucleotide of claim 6.
8. A recombinant host cell comprising the polynucleotide of claim 6.
9. A method for producing a polypeptide, comprising culturing the host cell of claim 8 under conditions promoting expression of the polypeptide.
10. A polypeptide produced by culturing the host cell of claim 8 under conditions to promote expression of the polypeptide.
11. A substantially purified antibody that specifically binds to a polypeptide of claim 1.
12. The antibody of claim 11, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
13. The antibody of claim 11, wherein the antibody is a human or humanized antibody.
14. A method of designing an inhibitor or binding agent of a polypeptide of claim 1, comprising the steps of determining the three-dimensional structure of the polypeptide, analyzing the three-dimensional structure for binding sites of substrates or ligands, designing a molecule that is predicted to interact with the polypeptide, and determining the inhibitory or binding activity of the molecule.
15. A method for identifying an agent that modulates an activity of a polypeptide, comprising:
 - (a) contacting the agent with a polypeptide of claim 1 under conditions such that the agent and the polypeptide interact; and
 - (b) determining activity of the polypeptide in the presence of the agent compared to a control, wherein a change in activity is indicative of an agent that modulates the polypeptide's activity.
16. The method of claim 15, wherein the activity is selected from the group consisting of disintegrin activity, cell adhesion activity, angiogenic activity, metalloproteinase activity, and a combination thereof.
17. The method of claim 15, wherein the polypeptide has disintegrin activity.

WO 02/10406

PCT/US01/23734

18. The method of claim 15, wherein the agent is selected from the group consisting of an antibody, a small molecule, a peptide, and a peptidomimetic.
19. A method for modulating angiogenesis in a cell or mammal, comprising contacting or administering to the cell or mammal a polypeptide of claim 1 in an amount effective to modulate disintegrin activity.
20. The method of claim 19, wherein the cell is contacted *in vitro*.
21. The method of claim 19, wherein the cell is contacted *in vivo*.
22. A method for modulating endothelial cell migration, comprising contacting the endothelial cell with a polypeptide of claim 1.
23. A method of inhibiting the binding of an integrin to a ligand comprising contacting or administering to a cell or mammal that expresses the integrin an effective amount of a polypeptide of claim 2 having disintegrin activity.
24. The method of claim 23, wherein the mammal is afflicted with a condition selected from the group consisting of ocular disorders; malignant and metastatic conditions; inflammatory diseases; osteoporosis and other conditions mediated by accelerated bone resorption; restenosis; inappropriate platelet activation, recruitment, or aggregation; thrombosis; and a condition requiring tissue repair or wound healing.
25. The method of claim 19 or 23, wherein the polypeptide is in the form of a multimer.
26. The method of claim 25, wherein the multimer is a dimer or trimer.
27. The method of claim 25, wherein the multimer comprises an Fc polypeptide, a leucine zipper, or a peptide linker.
28. A system for analyzing polypeptides or polynucleotides comprising
a data set representing a set of one or more polypeptides of claim 1;
a computer; and

WO 02/10406

PCT/US01/23734

a computer algorithm in an executable format on the computer for analyzing the polypeptides.

WO 02/10406

PCT/US01/23734

FIGURE 1

```

>SEQ ID NO:1
XLCTBECVHG RCVSPDTCHEPFGWGGPDCS SX

>SEQ ID NO:2
MFLLLALLTE LGR LQAHEQS EGIFLHVTVP RKIKSNDSEV SERKMIYIIT IDGQPYTLHL
GKQSLPQNF LVYTYNETGS LHSVSPYFMM HCHYQGYAAE FPNSEVTLST
CSGLRGFLQF ENISYGIEPV ESSARFEHII YQMKNNDFNV SILAVNYSHI WQKQPYKYVP
LNSQVTIIL
ML

>SEQ ID NO:3
MTKEALPMDG PYTPDCYYL GYLEEVPQSM VTIDTCYGGI RGIMKLDLA
YEKPLQDSR RFEHVVSQIV AEPNATVPTF RDGDNEETDF LFSEANNSMN PRISNSLYSS
HRGNKGHVQ CSNSYYHYG NITTCSEVV QMFSLIDSIV

>SEQ ID NO:4
GLITLSRNAS YYLRPWPPRG SKDFSTHEIF RMEQLLTWKI TCGHRDPGNK
AGMTSLPGGP QSRGRREARR TRKYLELYIV ADHTLFLTRH RNLNHTKQRL
LEVANYVDQL LRTLDIQVAL TGLEVWTERD RSRVTQDANA TLWAFLQWRR
GLWAQRPBDS AQLTGRAFV GATVGLAPVE GMCRAESSGG VSTDHSELP
GAAATMAHEI GHSGLSHDP DGCCVEAAAE SGGCVMAAAT GHPPPRVFA
CSRRQLRAFF RKGGGACLSN AFDGCLPVFP ALCGNGFVEA GEECDGPGQ
ECRDLCCFAH NCSLRPGAQC AHGDCVVRCL LKPA GALCRQ AMGDCDLPEF
CTGTSSHCFP DVYLLDGSFC ARGSGYCRDG ACTLEQQCQ QLWPGGSHEA
PEACFQVVNS AGDAHGNCQG DSEGHFLPCA GRDALCGKLQ CQGGKPSLLA
PHMVPVDSTV HLDGQEVTCR GALALPSAQL DLLGLGLVEP GTQCGPRMVC
QSRRCRKNAF QELQRCLTAC HSHGVCSNSH NCHCAPGWAP PFCDKPGFOG
SMDSGPVQAE KHDTELLAMI LSVLLPLLP AGLA WCCYRL PGAHLQRCSW
GCRRD PACSG PKDGPHRDIF LGGVHPMELG PTATGQWPPL APGSPADHH
NIYPPPLPD PENSHEPSSH PEKPLPAVSP DPQGGG

>SEQ ID NO:5
DHSENAIGVA ATMAHEMGNH FGMTHDSADC CSAADGGC IMAAATX

>SEQ ID NO:6
MNSKGDQFGN CGISTSPGSS YVRCSDGNIF CGKLCSGIT GLPKINLQHT MIQVPQGDGS
CWSMDAYMST DIPDEGDVHN GTYCAPNKVC LNSACTDKTP VISACNPEKT
CNGKGVCNLD GHCHCNEGHA PPDCTAGSG GSVDSGPPX

>SEQ ID NO:7
MRQAEARVTL RAPLLLLGLW VLLTPVRCST GHPSWHYASS KVVPRKETH
HOKDLQFLGW LSYSLHFGGQ RHIIIMRRKII LLWPRHLLVT TQDDQGALQM
DDPYTPDCY YLSYLEEVPL SMVTVD MCCG GLRGIMKLDL LAYEIKPLQD
SRRLHVSQI VAEFNATGPT ERDGDNEETN PLFSEANDSM NPRISNWLYS
SHRGNKGYV QCSNSYCRVD DNITTCSEVV QMFSLDSI VQNDLRYIT
YLLTYNNCD PAPVNDYRV SAMFTYFRIT FEDTPRVHSP TLLIKEAPHE CNYEPQRPIQ
NICDLBYCH GTTVTCANF YMQDGTFCPE EGICYHGNCT DRNVLCRVF
GVSAEEAPEV CYDINLESYR FGHCTRRQTA LNNQACAGID KFCGRQLQCT
VTHLPRLQEH VSFHESVTGG PQCPGLDHR ATDTTDVGCY IDGTPCVHGN
FCNNTRCNAT ITSLOYDCRP EKCSHROVCN NRRNCHCHIG WDPPLCLRRG
AGGSVDSGPP PKTRSVKQS QQSVMYLRVV FGRITYFIIA LLFGMATNV

```

WO 02/10406

PCT/US01/23734

FIGURE 1 (continued)

>SEQ ID NO:8

MRVSEALVH VRPHLLWL GVLFSSGWL QGLCQHQSLEFVVPLRLT
 GADRGITDQG WLSYGLQVGS QSHTSNVQEE VLMLYQKADA FYIPLGAI
 VVGLIWTQE NFITMDTAGV GLKEICKWKQ TSPNSCIPHD VAHLIVKRSY
 GITLGLANVG TTPSVVEVCR QESSEWDLPE WFNGTSECA EDVCLQDGP
 CKGSQHCYEK RCNNCDEQCR QIFGQVRCEV TDILCGRVEC ENMQEIPLLR
 DHTSLRTHF IGVTCDWITGY RMGISTDYG DVKDATECGS EHVCMHRKCV
 TMSLLNSTCL PVTNMRPVC NNKHCHCCR EWKPPDCLRE GIBGSVDSGT
 TTPRKKGENE VCKQGV

>SEQ ID NO:9

MTKGPCRRIT PFVPRDCYYD CYLEGVPGSV ATLDTCRGGL RGMLQVDDLT
 YEIKPLEAFS KFEYVVSLLV SEERPOEVS RCKTEGEEDQ ESEK

>SEQ ID NO:10

FEHSKPTTRD WALQFTQTK KRPRRMKRED LNSMKYVELY LVADYLEFQK
 NRRDQDATKH KLEIANYVD KPYRSINRI ALVGLVWTH GNMCEVSENP
 YSTLWSHLSW RRKLLAQKYH DNAQLTGMFS FHGTTIGLAP LMANCSVYQS
 GGVNMDHSEN AIGVAATMAH EMGHNFGMTH DSADCSASA ADGGCIMA
 TGHFFPKVFN GCNRRELDYR LQSGGGMCLS NMPDTRMLYG GRRCGNGYJE
 DGEBCDCGEE EECNNPCNA SNTCLRFGAE CAHGSCCHQC KLLAPGTLR
 EQARQCDLPE FCTGKSPHCP TNFYQMDGTP CEGGQAYCYN GMCLTYQEQC
 QQLWGPARGP APDLCEKVN VAGDTFGNCG KDMNGEHRKC NMRDAKCGKI
 QQQSSEARPL ESNAVPIIT IMNGRQIQ RGTHTVYRGP EBGDMLDPLG
 VMTGTGCGYN HICFEGQCRN TSFETEGCG KKCNGHGVN NNQCHCLPG
 WAPPFCTNTPG HIGSIDS GPM PPSVGPVVA GVLVAHLVLA VLMMLYYCCR
 QNNKLQQLKP SALPSKLRQO PSCPFVSN SGTGHANPTF KLQTPQGRK
 VELDLVQVI NTPEILKPS QPFRPPPDY LRGGSPAPL PAHLSRAARN SPGPGSQIER
 TESSRRPFS RPIPPA'NCI VSQDFSRPP POKALPANPV PGRSLRPG GASPLRPGA
 GPQQRPLAA LAPKRVWKC NLKTQDQFS Q

>SEQ ID NO:11

QSNGVKTFSS CSLRSFQNEI SNVGVKCLQN KPQMCKKSPK PFCGNGRLEG
 NEICDCGTEA ILQSGVECRP KAHPEDIAE NCNGSSPECG PDI TLINGLS CKNNKFCYD
 GDCHDLARC ESVPKX

>SEQ ID NO:12

MDLSLHVASL CLPHHPSAQ LKPA GALCRQ AMGDCDLPEF CTGTSSHCPP
 DVYLLDGSPC ARGSGYCWGD ACPLEQQCQ QLWGP GSHA PEACFQVNS
 AGDAHGNCQ DSEGHFLPCA
 RX

>SEQ ID NO:13

FKPANMICRK SVGKECDFTE YCNGDLPYCL PDTYVRDGEY CDSSGGAFCQ
 GKCRTPDKQC DDLIGRX

>SEQ ID NO:14

MWREFIHLPL LLATVLDLRG LLHLENASYG IEPLQMSSH EHIYRMDDV
 YKEPLKCGVS NKDIEKETAK DEBBPFSMT QLLRRRAVL PQTRYVELFI

WO 02/10406

PCT/US01/23734

FIGURE 1 (continued)

VVDKERYDMM GRNQTAVREE MLLANYLDS MYIMLNIRIV LVGLEIWTNG
 NLINIVGGAG DVLGNFVQWR EKFLITRRRH DSAQLVLKKG FGGTAGMAFV
 GTVCSRSAG QINVFQITV ETTASIVAHE LGHNLGMNHD DORDCSGAK
 SCIMNSGASG SRNFSSCSAE DFEKLTNLKG GNCLLNPKP DEAYSAPSCG
 NKLVDAGBEC DCGTPKECEL DPCCGSGTCK LKSFACAYG DCKDCRFLP
 GGTLCRGKTS ECDVPEYCNG SSQPCQPDVF KNGYPCQNN KAYCYNGMCQ
 YYDAQCQVIF GSKAKAAPKD CHIVNSKGD RFGNCGFSGN EYKKCATGLS
 LKPHAPFLST MLQEAQRQTG TYLGGSVCCM KSDCRIVTLV KNALCGKLQC
 ENVQEIFVFG IVPATITPS RGTCKWGVDF QLGSDVPDPG MYNEGKCGA
 GKICRNFGCV DASVLNYDCD VQKKCHGHGV CNSNKNCHCE NGWAPPNCET
 KGYGGSVDSG PTYNEMNTAL RDGLLVFFFL IVPLIVCDYF YLHQEGSTVE
 KLLQKEBITN

>SEQ ID NO:15
 ECCLAPCCEG STCKLKSFAE CAYGDCKDCR

>SEQ ID NO:16
 FKPANMICRK SVGKECDFTE YCNGDLPYCL PDITYVRDGEY CDSGGAFCFQ
 GKCRITFAQTM

>SEQ ID NO:17
 VYCFHDPGWP RFTSSBIVP RKPVPHKRGV EMPDQLSYSM RFRGQRHVH
 MKLKKNMMPR HLPVFTDNDQ GAMQENYPFV PRDCYDYCYL EGVPGSAATL
 DTCRGLHGM LQ

>SEQ ID NO:18
 FYRPLNIRIV LVGVEVWNDM DKCSVSQDPP TSPQFMDWR KMKLIJPRKSH DNAQLVX

>SEQ ID NO:19
 FYRPLNIRIV LVGVEVWNDM DKCSVSQDPP TSLHEFLDWR KMKLIJPRKSH DNAQLVX

>SEQ ID NO:20
 MTDVGRVIDG TPCVHGNFCN NTRCNATITS LGYDCRLEKC SERGVCNNRR
 NCHCHIGWDF PLCLRRGAGG SVDSGPPPKR TCSLRQSQQS EMYLRVVFGR
 IYAFUALLF GTATNVQTYQ DHHRAHPLSA RARPPSLAQF HVSQPVSPS SPPKQMPDLG
 HCSAQGAV

>SEQ ID NO:21
 MGWRPRRARG TPLLLLLLLL LLWPVPGAGV LQGHIPGQPV TPHWVLDGQP
 WRTVSLIEPV SKPDMGLVAL BAEGQELLE LEKNHRLAP GYIETHYGPD
 GQPVVLAPNH TDHCHYQGRV ROPDSWVVL CTCSGMSGLI TLRNASYYL
 RPWPVPRGSKD FSTHEIFRMS QLLTWKGTGG HRDPGNKAGM TSLPGGPQR
 GRREARRTRK YLELYIVADH TLELTRHRNL NHTKQRLLEV ANYVDQLRT
 LDIQVALTGL EVWTERDRSR VTQDANATLW AFLQWRRGLW AQRPHDSAL
 LTGRAFOGAT VGLAPVEGMC RAESSGGVST DHSLEPIGAA ATMAHEIGHS
 LGLSHDFDGC CVEAAAESGG CVMAAATGHP FPRVFSACSR RQLRAFFRKG
 GGACLSNAPD PGLPVPPALC GNGFVEAGEE CDCGPGQECR DLCCFAHNCS
 LRPGAQCAHG DCCVRCULKP AGALCRQAMG DCDLPEFCTG TSSHCPPDVF
 LLDGSPCARG SGYCVWDGACF TLEQQCQQLW GPQSHPAPEA CFQVYNSAGD
 AHGNCQDSE GHFLPCAGRD ALCGKLQCGG OKPSLLAPHM VPVJSTVBLD
 GQEVTCRGAL ALPSAQDLGL GLGLVEPGTG CGPRMVCQSR RCRKNAPQEL
 QRCLTACHSH GVCNSNHCH CAPGWAPPFC DKPGFGGMD SGPVQAENHD
 TLLAMILSV LPLLPAGAL AWCCYRLPGA HLQRCSWGCR RDPACSGPKD

WO 02/10406

PCT/US01/23734

FIGURE 1 (continued)

QPHRDHPLGG VHPMELGPTA TGQFWPLDPE NSHEPSSHPE KPLPAVSPDP
QDQVQMPRSC LW

>SEQ ID NO:22

MAHTEGHSLG LSHDPDGCCV EAAAESGGCV MAAATGYAX

>SEQ ID NO:23

MRDREQLRPG LGAGWAEGLA SHGEPEDGHW CVLGALTHLS LFGKSTLCTE
ECVHGRCVSP DTCHCEPGWG GPDCCSDLER MGRWELLSP MLSSRLSRIK
QLQMNRKAI TLTVPVQLC QARGPSQTRL GRLLPASVPP RRNGKGEEAG
AGEFRPCGSP DLQQDEDDAG KQQPMETPEH QLKGSWSFPP HLYPPPTHVP
VMLLPGHSPN WEPEPVMVQI MRNDRSPMQL QGLSGESTRH TGRSAVEMSD SLS

>SEQ ID NO:24

LNVTAVHRO CSKTASHVPS SGASHWTWWD ACRPQSILSS ASVINSYDEN
DIRHSPKLLV QKTDIKLFP RYEMHIVVD KNLYSKTVTL BGFSVVMTQL
LGINLGLTYD DYNCCNCPGA TCVMNKAMG ELQFENISYG IEPVSSARF
EHYQMKNN DPNVSILAVN YSHWQKDDQI YKVPNSQYP DAJGLBOFSV
IIAQLLGLNV GLTYDDITQC FCLRATCIMN HEAVSASGRK IFSNCSMHDY
RYFVSKFEET CLQKLSNLQP LHQNQPVCON GHLESNEECD CGNKNLSIAG
TPCRKSIDPE CDFTEYCNCT SSNCVPTDYA LNGRLCKLGT AYCNGQCQT
TDNQCAKIFG KGAQGAFFAC FKEVNSLHER SENCCKNSQ PLPCRKYVI
ILVIVNASLD IDLQVNSSL VPQGVVLMME IFRNL

SEQ ID NO:25

CSSEGSFKLQ HELIPQWKT SESPVREKHP LKABLRVMAE GRELILDEK NSITAFITAR
GLITVSSNLS YVIEPLPDSK GQHLIYRSEH LKPPPGNCGF EHSKPTTRDW ALQFTQQTKK
RPRRMKREDI NSMKYVVELYL VADYLEFQKN RRDQDATKHK LIBIANYVDK
FYRLNIRIA LVGLEVWTHG NMCEVSENPI STLWSFLSWR RKLLAQKYHD
NAQLITGMSF HGTTIGLAPL MAMCSVYQSG GVNMDHSENA IGVAATMAHE
MGHNFGMTHD SADCCSASAA DGGCMAAAT OHPEPKVFNQ CNRELDRYL
QSGGGMCLSN MPDTRMLYGG RRCGNGYLED GEECDGEEE ECNNPCCNAS
NCTLRPGAEC AHGSCCHQCK LLAPGTLCRE QARQCDLPEF CTGKSPHCPT
NFVQMDGTPC EGGQAYCYNG MCLTYQECCQ QLWGPGARPA PDLCEKVN
AGDTFGNCGK DMNGEHRKCN MRDAKCGKIQ CQSEARPLE SNAVPHDTI
IMNQRQICR GTHVYRGPEB EGDMLDPGLY MTGKCGYNH ICFEGQCRNT
SFEETEGCGK KONDHGVCCN NQNHCLPGW APPCNTFGH GGSIDSGMP
PESVGPVAG VLVAILVLAV LMLMYCCRO NNLGLQLKPS ALPSKLROQF
RVSONSGTH ANPTFKLQTP QGKRKVNTP EILRKPSQP PRPPDYLRG LLQASAAPEG
TPGKPSARPQ EPPQARRCIP TAAPWCWPSA VPASGSTCPK EGMEDLQFEN
WGPVPSVTV LTTCTALLD TQESHQANW K

SEQ ID NO:26

DLLEDFVYV TYNKEGLIT DHPNQNCH YRGYVEGVHN SSIALSDCFG
LRGLLHLJNA SYGHEPLQNS SHFEHIYRM DDVYKEPLKC GVSNDIEKE TAKDEEEEP
SMTQLRRRR AVLPQTRYVE LFIVVDKERF GQITVETPAS IVAHELGHNL
GMNHDDGRDC SCGAKSCBMN SGASGSRNES SCSAEDFEKL TLNKGNCIL
NPKPDEAYS APSCGNKLVD AGEBCDCTP KSFYVHRNVN WTLAAKEVPV
SLNHLSVHM VTVVKTVGFC QPDVFIQNGY PCQNKAYCY NGMCQYDAQ
CQVFGSKAK AAPKDCFEBV NSKODRFGNC GFSGNEYKCC ATGPPPPQPK
VSSQGNLIPA RPAPAPFLYS SLT

WO 02/10406

PCT/US01/23734

FIGURE 1 (continued)

>SEQ ID NO:27
MRQAEVRVTLRAPLLLLGLWALLAPVRCSQGRPLWHYASS EGVIPRKETH
HGKGLQFPGWLSHSLRFGGQ RHVIHMRKKHLLWPRHLLVTQDDQGALPM
DGPYIFPCY YLGYLEBVPO SMVTIDTCYG GLRGIMKLDL LA YEIKPLQD
SRREHVVVSQIVAEFNATVP TFRDGDNEET DPLRSEANNS MNPRISNSLY SSHRGNIKGH
VQCSNSYYHI YGNITTCSE VVQMPSLIDS IVQNIDLWYY IYLLITYNNR DPAPVNQYRI
QSAMFTYFKT TFFDTTHVHS STILLKDAPIESNYEPERPI QNICDLPEYC HGTTVTCFAN
FYMQDGTLCMEEGYCYHGNC TDRNVLCAM FGVSAEDAPE VCYDINLESY
RFGHCIRQQT YLSYQACTGIDKPCGGLQCT NVTHLPQLQE HVSEHISVRG
GFQCFRLDEH HATDMDTVGR VIDGTFCVHG NFNNTNRCNA TTITSLGYDCR
LEKCSHRGVC NNRNCHCHG QWDPPCLRR GAGGSVDSOP PPKRTRSLRQ
SQQSEMYLRV VFGRIYAFIL ALLEGATNV QTYQDHHRLG RDSY

WO 02/10406

PCT/US01/23734

SEQUENCE LISTING

<110> Immunex Corporation
Black, Roy A
Dubose, Robert F
Wiley, Steve R

<120> METALLOPROTEINASE-DISINTEGRIN POLYPEPTIDES AND METHODS OF MAKING AND USE THEREOF

<130> 6120-WO

<140> TO BE ASSIGNED

<141> 2001-07-27

<150> US 60/221,838

<151> 2000-07-28

<160> 44

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 32

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(32)

<223> X at residue 1 and 32 can be any amino acid or any series of amino acids

<400> 1

Xaa Leu Cys Thr Glu Glu Cys Val His Gly Arg Cys Val Ser Pro Asp
1 5 10 15

Thr Cys His Cys Glu Pro Gly Trp Gly Gly Pro Asp Cys Ser Ser Xaa
20 25 30

<210> 2

<211> 182

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Met Phe Leu Leu Leu Ala Leu Leu Thr Glu Leu Gly Arg Leu Gln Ala
1 5 10 15

His Glu Gly Ser Glu Gly Ile Phe Leu His Val Thr Val Pro Arg Lys
20 25 30

Ile Lys Ser Asn Asp Ser Glu Val Ser Glu Arg Lys Met Ile Tyr Ile
35 40 45

Ile Thr Ile Asp Gly Gln Pro Tyr Thr Leu His Leu Gly Lys Gln Ser
50 55 60

Phe Leu Pro Gln Asn Phe Leu Val Tyr Thr Tyr Asn Glu Thr Gly Ser
65 70 75 80

Leu His Ser Val Ser Pro Cys Phe Met Met His Cys His Tyr Gln Gly
85 90 95

Tyr Ala Ala Glu Phe Pro Asn Ser Phe Val Thr Leu Ser Ile Cys Ser
100 105 110

Gly Leu Arg Gly Phe Leu Gln Phe Glu Asn Ile Ser Tyr Gly Ile Glu
115 120 125

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Pro Val Glu Ser Ser Ala Arg Phe Glu His Ile Ile Tyr Gln Met Lys
 130 135 140

Asn Asn Asp Pro Asn Val Ser Ile Leu Ala Val Asn Tyr Ser His Ile
 145 150 155 160

Trp Gln Lys Asp Gln Pro Tyr Lys Val Pro Leu Asn Ser Gln Val Thr
 165 170 175

Val Ile Ile Leu Met Leu
 180

<210> 3
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 3

Met Thr Lys Glu Ala Leu Pro Met Asp Gly Pro Tyr Ile Pro Pro Asp
 1 5 10 15

Cys Tyr Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu Val Pro Gln Ser Met Val Thr
 20 25 30

Ile Asp Thr Cys Tyr Gly Gly Leu Arg Gly Ile Met Lys Leu Asp Asp
 35 40 45

Leu Ala Tyr Glu Ile Lys Pro Leu Gln Asp Ser Arg Arg Phe Glu His
 50 55 60

Val Val Ser Gln Ile Val Ala Glu Pro Asn Ala Thr Val Pro Thr Phe
 65 70 75 80

Arg Asp Gly Asp Asn Glu Glu Thr Asp Pro Leu Phe Ser Glu Ala Asn
 85 90 95

Asn Ser Met Asn Pro Arg Ile Ser Asn Ser Leu Tyr Ser Ser His Arg
 100 105 110

Gly Asn Ile Lys Gly His Val Gln Cys Ser Asn Ser Tyr Tyr His Ile
 115 120 125

Tyr Gly Asn Ile Thr Thr Cys Ser Lys Glu Val Val Gln Met Phe Ser
 130 135 140

Leu Ile Asp Ser Ile Val
 145 150

<210> 4
 <211> 686
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 4

Gly Leu Ile Thr Leu Ser Arg Asn Ala Ser Tyr Tyr Leu Arg Pro Trp
 1 5 10 15

Pro Pro Arg Gly Ser Lys Asp Phe Ser Thr His Glu Ile Phe Arg Met
 20 25 30

Glu Gln Leu Leu Thr Trp Lys Gly Thr Cys Gly His Arg Asp Pro Gly
 35 40 45

Asn Lys Ala Gly Met Thr Ser Leu Pro Gly Gly Pro Gln Ser Arg Gly
 50 55 60

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Arg Arg Glu Ala Arg Arg Thr Arg Lys Tyr Leu Glu Leu Tyr Ile Val
 65 70 75 80
 Ala Asp His Thr Leu Phe Leu Thr Arg His Arg Asn Leu Asn His Thr
 85 90 95
 Lys Gln Arg Leu Leu Glu Val Ala Asn Tyr Val Asp Gln Leu Leu Arg
 100 105 110
 Thr Leu Asp Ile Gln Val Ala Leu Thr Gly Leu Glu Val Trp Thr Glu
 115 120 125
 Arg Asp Arg Ser Arg Val Thr Gln Asp Ala Asn Ala Thr Leu Trp Ala
 130 135 140
 Phe Leu Gln Trp Arg Arg Gly Leu Trp Ala Gln Arg Pro His Asp Ser
 145 150 155
 Ala Glu Leu Leu Thr Gly Arg Ala Phe Gln Gly Ala Thr Val Gly Leu
 165 170 175
 Ala Pro Val Glu Gly Met Cys Arg Ala Glu Ser Ser Gly Gly Val Ser
 180 185 190
 Thr Asp His Ser Glu Leu Pro Ile Gly Ala Ala Ala Thr Met Ala His
 195 200 205
 Glu Ile Gly His Ser Leu Gly Leu Ser His Asp Pro Asp Gly Cys Cys
 210 215 220
 Val Glu Ala Ala Ala Glu Ser Gly Gly Cys Val Met Ala Ala Ala Thr
 225 230 235 240
 Gly His Pro Phe Pro Arg Val Phe Ser Ala Cys Ser Arg Arg Gln Leu
 245 250 255
 Arg Ala Phe Phe Arg Lys Gly Gly Gly Ala Cys Leu Ser Asn Ala Pro
 260 265 270
 Asp Pro Gly Leu Pro Val Pro Pro Ala Leu Cys Gly Asn Gly Phe Val
 275 280 285
 Glu Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Pro Gly Gln Glu Cys Arg Asp
 290 295 300
 Leu Cys Cys Phe Ala His Asn Cys Ser Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys
 305 310 315 320
 Ala His Gly Asp Cys Cys Val Arg Cys Leu Leu Lys Pro Ala Gly Ala
 325 330 335
 Leu Cys Arg Gln Ala Met Gly Asp Cys Asp Leu Pro Glu Phe Cys Thr
 340 345 350
 Gly Thr Ser Ser His Cys Pro Pro Asp Val Tyr Leu Leu Asp Gly Ser
 355 360 365
 Pro Cys Ala Arg Gly Ser Gly Tyr Cys Arg Asp Gly Ala Cys Pro Thr
 370 375 380
 Leu Glu Gln Gln Cys Gln Gln Leu Trp Gly Pro Gly Ser His Pro Ala
 385 390 395 400
 Pro Glu Ala Cys Phe Glu Val Val Asn Ser Ala Gly Asp Ala His Gly
 405 410 415

WO 02/10406

PCT/US01/23734

```

Asn Cys Gly Gln Asp Ser Glu Gly His Phe Leu Pro Cys Ala Gly Arg
420                               425                               430
Asp Ala Leu Cys Gly Lys Leu Gln Cys Gln Gly Gly Lys Pro Ser Leu
435                               440                               445
Leu Ala Pro His Met Val Pro Val Asp Ser Thr Val His Leu Asp Gly
450                               455                               460
Gln Glu Val Thr Cys Arg Gly Ala Leu Ala Leu Pro Ser Ala Gln Leu
465                               470                               475
Asp Leu Leu Gly Leu Gly Leu Val Glu Pro Gly Thr Gln Cys Gly Pro
485                               490                               495
Arg Met Val Cys Gln Ser Arg Arg Cys Arg Lys Asn Ala Phe Gln Glu
500                               505                               510
Leu Gln Arg Cys Leu Thr Ala Cys His Ser His Gly Val Cys Asn Ser
515                               520                               525
Asn His Asn Cys His Cys Ala Pro Gly Trp Ala Pro Pro Phe Cys Asp
530                               535                               540
Lys Pro Gly Phe Gly Gly Ser Met Asp Ser Gly Pro Val Gln Ala Glu
545                               550                               555
Asn His Asp Thr Phe Leu Leu Ala Met Leu Leu Ser Val Leu Leu Pro
565                               570                               575
Leu Leu Pro Gly Ala Gly Leu Ala Trp Cys Cys Tyr Arg Leu Pro Gly
580                               585                               590
Ala His Leu Gln Arg Cys Ser Trp Gly Cys Arg Arg Asp Pro Ala Cys
595                               600                               605
Ser Gly Pro Lys Asp Gly Pro His Arg Asp His Pro Leu Gly Gly Val
610                               615                               620
His Pro Met Glu Leu Gly Pro Thr Ala Thr Gly Gln Pro Trp Pro Leu
625                               630                               635
Ala Pro Gly Ser Pro Ala Asp His Ile His Asn Ile Tyr Pro Pro Pro
645                               650                               655
Phe Leu Pro Asp Pro Glu Asn Ser His Glu Pro Ser Ser His Pro Glu
660                               665                               670
Lys Pro Leu Pro Ala Val Ser Pro Asp Pro Gln Gly Gly Ser
675                               680                               685

<210> 5
<211> 47
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> X at position 47 can be any amino acid or a series of any amino a
cids

<400> 5
Asp His Ser Glu Asn Ala Ile Gly Val Ala Ala Thr Met Ala His Glu
1 5 10 15

```

WO 02/10406

PCT/US01/23734

```

Met Gly His Asn Phe Gly Met Thr His Asp Ser Ala Asp Cys Cys Ser
      20      25      30
Ala Ser Ala Ala Asp Gly Gly Cys Ile Met Ala Ala Ala Thr Xaa
      35      40      45
<210> 6
<211> 149
<212> PRT
<213> homo sapiens
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (149)..(149)
<223> X at position 149 can be any amino acid or a series of any amino
      acids
<400> 6
Met Asn Ser Lys Gly Asp Gln Phe Gly Asn Cys Gly Ile Ser Thr Ser
1      5      10      15
Pro Gly Ser Gln Tyr Val Arg Cys Ser Asp Gly Asn Ile Phe Cys Gly
      20      25      30
Lys Leu Ile Cys Ser Gly Ile Thr Gly Leu Pro Lys Ile Asn Leu Gln
      35      40      45
His Thr Met Ile Gln Val Pro Gln Gly Asp Gly Ser Cys Trp Ser Met
      50      55      60
Asp Ala Tyr Met Ser Thr Asp Ile Pro Asp Glu Gly Asp Val His Asn
      65      70      75      80
Gly Thr Tyr Cys Ala Pro Asn Lys Val Cys Leu Asn Ser Ala Cys Thr
      85      90      95
Asp Lys Thr Pro Val Ile Ser Ala Cys Asn Pro Glu Lys Thr Cys Asn
      100      105      110
Gly Lys Gly Val Cys Asn Asp Leu Gly His Cys His Cys Asn Glu Gly
      115      120      125
His Ala Pro Pro Asp Cys Val Thr Ala Gly Ser Gly Gly Ser Val Asp
      130      135      140
Ser Gly Pro Pro Xaa
      145
<210> 7
<211> 559
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 7
Met Arg Gln Ala Glu Ala Arg Val Thr Leu Arg Ala Pro Leu Leu Leu
1      5      10      15
Leu Gly Leu Trp Val Leu Leu Thr Pro Val Arg Cys Ser Gln Gly His
      20      25      30
Pro Ser Trp His Tyr Ala Ser Ser Lys Val Val Ile Pro Arg Lys Glu
      35      40      45
Thr His His Gly Lys Asp Leu Gln Phe Leu Gly Trp Leu Ser Tyr Ser
      50      55      60

```

WO 02/10406

PCT/US01/23734

```

Leu His Phe Gly Gly Gln Arg His Ile Ile His Met Arg Arg Lys His
65          70          75          80
Leu Leu Trp Pro Arg His Leu Leu Val Thr Thr Gln Asp Asp Gln Gly
85          90          95
Ala Leu Gln Met Asp Asp Pro Tyr Ile Pro Pro Asp Cys Tyr Tyr Leu
100         105         110
Ser Tyr Leu Glu Glu Val Pro Leu Ser Met Val Thr Val Asp Met Cys
115         120         125
Cys Gly Gly Leu Arg Gly Ile Met Lys Leu Asp Asp Leu Ala Tyr Glu
130         135         140
Ile Lys Pro Leu Gln Asp Ser Arg Arg Leu Glu His Val Ser Gln Ile
145         150         155         160
Val Ala Glu Pro Asn Ala Thr Gly Pro Thr Phe Arg Asp Gly Asp Asn
165         170         175
Glu Glu Thr Asn Pro Leu Phe Ser Glu Ala Asn Asp Ser Met Asn Pro
180         185         190
Arg Ile Ser Asn Trp Leu Tyr Ser Ser His Arg Gly Asn Ile Lys Gly
195         200         205
Cyr Val Gln Cys Ser Asn Ser Tyr Cys Arg Val Asp Asp Asn Ile Thr
210         215         220
Thr Cys Ser Lys Glu Val Val Gln Met Phe Ser Leu Ser Asp Ser Ile
225         230         235         240
Val Gln Asn Ile Asp Leu Arg Tyr Tyr Ile Tyr Leu Leu Thr Ile Tyr
245         250         255
Asn Asn Cys Asp Pro Ala Pro Val Asn Asp Tyr Arg Val Gln Ser Ala
260         265         270
Met Phe Thr Tyr Phe Arg Thr Thr Phe Phe Asp Thr Phe Arg Val His
275         280         285
Ser Pro Thr Leu Leu Ile Lys Glu Ala Pro His Glu Cys Asn Tyr Glu
290         295         300
Pro Gln Arg Pro Ile Gln Asn Ile Cys Asp Leu Pro Glu Tyr Cys His
305         310         315         320
Gly Thr Thr Val Thr Cys Pro Ala Asn Phe Tyr Met Gln Asp Gly Thr
325         330         335
Pro Cys Thr Glu Glu Gly Tyr Cys Tyr His Gly Asn Cys Thr Asp Arg
340         345         350
Asn Val Leu Cys Lys Val Ile Phe Gly Val Ser Ala Glu Glu Ala Pro
355         360         365
Glu Val Cys Tyr Asp Ile Asn Leu Glu Ser Tyr Arg Phe Gly His Cys
370         375         380
Thr Arg Arg Gln Thr Ala Leu Asn Asn Gln Ala Cys Ala Gly Ile Asp
385         390         395         400
Lys Phe Cys Gly Arg Leu Gln Cys Thr Ser Val Thr His Leu Pro Arg
405         410         415
Leu Gln Glu His Val Ser Phe His His Ser Val Thr Gly Gly Phe Gln
420         425         430

```

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Cys Phe Gly Leu Asp Asp His Arg Ala Thr Asp Thr Thr Asp Val Gly
 435 440 445
 Cys Val Ile Asp Gly Thr Pro Cys Val His Gly Asn Phe Cys Asn Asn
 450 455 460
 Thr Arg Cys Asn Ala Thr Ile Thr Ser Leu Gly Tyr Asp Cys Arg Pro
 465 470 475 480
 Glu Lys Cys Ser His Arg Gly Val Cys Asn Asn Arg Arg Asn Cys His
 485 490 495
 Cys His Ile Gly Trp Asp Pro Pro Leu Cys Leu Arg Arg Gly Ala Gly
 500 505 510
 Gly Ser Val Asp Ser Gly Pro Pro Pro Lys Ile Thr Arg Ser Val Lys
 515 520 525
 Gln Ser Gln Gln Ser Val Met Tyr Leu Arg Val Val Phe Gly Arg Ile
 530 535 540
 Tyr Thr Phe Ile Ile Ala Leu Leu Phe Gly Met Ala Thr Asn Val
 545 550 555
 <210> 8
 <211> 366
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 8
 Met Arg Ala Val Ser Glu Ala Leu Val His Val Arg Phe Ile His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Trp Leu Gly Val Phe Leu Phe Phe Ser Gly Trp Leu Gln Ile
 20 25 30
 Gly Leu Cys Gln His Gln Ser Leu Pro Glu Val Val Ile Pro Leu Arg
 35 40 45
 Ile Thr Gly Ala Asp Arg Gly Thr Asp Thr Gln Gly Trp Leu Ser Tyr
 50 55 60
 Gly Leu Gln Val Gly Ser Gln Ser His Thr Ser Asn Val Gln Glu Glu
 65 70 75 80
 Val Leu Met Leu Tyr Gln Lys Ala Asp Ala Phe Tyr Ile Pro Leu Gly
 85 90 95
 Ala Ile Val Thr Val Val Gly Leu Glu Ile Trp Thr Gln Glu Asn Phe
 100 105 110
 Ile Thr Met Asp Thr Ala Gly Val Gly Leu Lys Glu Ile Cys Lys Trp
 115 120 125
 Lys Gln Thr Ser Phe Asn Ser Cys Ile Pro His Asp Val Ala His Leu
 130 135 140
 Ile Val Lys Arg Ser Tyr Gly Ile Thr Leu Gly Leu Ala Asn Val Gly
 145 150 155 160
 Thr Ile Met Pro Ser Val Glu Val Cys Arg Gln Glu Ser Ser Glu Trp
 165 170 175
 Asp Leu Pro Glu Trp Phe Asn Gly Thr Ser His Glu Cys Ala Glu Asp
 180 185 190

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Val Cys Leu Gln Asp Gly Ile Pro Cys Lys Gly Ser Gly His Cys Tyr
 195 200 205
 Glu Lys Arg Cys Asn Asn Cys Asp Glu Glu Cys Arg Gln Ile Phe Gly
 210 215 220
 Gln Val Arg Cys Glu Val Thr Asp Ile Leu Cys Gly Arg Val Glu Cys
 225 230 235 240
 Glu Asn Met Gln Glu Ile Pro Leu Leu Arg Asp His Ser Thr Leu His
 245 250 255
 Arg Thr His Phe Ile Gly Val Thr Cys Trp Asp Thr Gly Tyr Arg Met
 260 265 270
 Gly Ile Ser Thr Pro Asp Ile Gly Asp Val Lys Asp Ala Thr Glu Cys
 275 280 285
 Gly Ser Glu His Val Cys Met His Arg Lys Cys Val Thr Met Ser Leu
 290 295 300
 Leu Asn Ser Thr Cys Leu Pro Val Thr Cys Asn Met Arg Pro Val Cys
 305 310 315 320
 Asn Asn Lys His His Cys His Cys Cys Arg Glu Trp Lys Pro Pro Asp
 325 330 335
 Cys Leu Arg Glu Gly Thr Glu Gly Ser Val Asp Ser Gly Thr Thr Thr
 340 345 350
 Pro Arg Lys Lys Gly Glu Asn Glu Val Cys Lys Gln Gly Val
 355 360 365
 <210> 9
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 9
 Met Thr Lys Gly Pro Cys Arg Arg Thr Thr Pro Phe Val Pro Arg Asp
 1 5 10 15
 Cys Tyr Tyr Asp Cys Tyr Leu Glu Gly Val Pro Gly Ser Val Ala Thr
 20 25 30
 Leu Asp Thr Cys Arg Gly Gly Leu Arg Gly Met Leu Gln Val Asp Asp
 35 40 45
 Leu Thr Tyr Glu Ile Lys Pro Leu Glu Ala Phe Ser Lys Phe Glu Tyr
 50 55 60
 Val Val Ser Leu Leu Val Ser Glu Glu Arg Pro Gly Glu Val Ser Arg
 65 70 75 80
 Cys Lys Thr Glu Gly Glu Glu Ile Asp Gln Glu Ser Glu Lys
 85 90
 <210> 10
 <211> 751
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 10
 Phe Glu His Ser Lys Pro Thr Thr Arg Asp Trp Ala Leu Gln Phe Thr
 1 5 10 15

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Gln Gln Thr Lys Lys Arg Pro Arg Arg Met Lys Arg Glu Asp Leu Asn
 20 25 30
 Ser Met Lys Tyr Val Glu Leu Tyr Leu Val Ala Asp Tyr Leu Glu Phe
 35 40 45
 Gln Lys Asn Arg Arg Asp Gln Asp Ala Thr Lys His Lys Leu Ile Glu
 50 55 60
 Ile Ala Asn Tyr Val Asp Lys Phe Tyr Arg Ser Leu Asn Ile Arg Ile
 65 70 75
 Ala Leu Val Gly Leu Glu Val Trp Thr His Gly Asn Met Cys Glu Val
 85 90 95
 Ser Glu Asn Pro Tyr Ser Thr Leu Trp Ser Phe Leu Ser Trp Arg Arg
 100 105 110
 Lys Leu Leu Ala Gln Lys Tyr His Asp Asn Ala Gln Leu Ile Thr Gly
 115 120 125
 Met Ser Phe His Gly Thr Thr Ile Gly Leu Ala Pro Leu Met Ala Met
 130 135 140
 Cys Ser Val Tyr Gln Ser Gly Gly Val Asn Met Asp His Ser Glu Asn
 145 150 155 160
 Ala Ile Gly Val Ala Ala Thr Met Ala His Glu Met Gly His Asn Phe
 165 170 175
 Gly Met Thr His Asp Ser Ala Asp Cys Cys Ser Ala Ser Ala Ala Asp
 180 185 190
 Gly Gly Cys Ile Met Ala Ala Ala Thr Gly His Pro Phe Pro Lys Val
 195 200 205
 Phe Asn Gly Cys Asn Arg Arg Glu Leu Asp Arg Tyr Leu Gln Ser Gly
 210 215 220
 Gly Gly Met Cys Leu Ser Asn Met Pro Asp Thr Arg Met Leu Tyr Gly
 225 230 235 240
 Gly Arg Arg Cys Gly Asn Gly Tyr Leu Glu Asp Gly Glu Glu Cys Asp
 245 250 255
 Cys Gly Glu Glu Glu Glu Cys Asn Asn Pro Cys Cys Asn Ala Ser Asn
 260 265 270
 Cys Thr Leu Arg Pro Gly Ala Glu Cys Ala His Gly Ser Cys Cys His
 275 280 285
 Gln Cys Lys Leu Leu Ala Pro Gly Thr Leu Cys Arg Glu Gln Ala Arg
 290 295 300
 Gln Cys Asp Leu Pro Glu Phe Cys Thr Gly Lys Ser Pro His Cys Pro
 305 310 315 320
 Thr Asn Phe Tyr Gln Met Asp Gly Thr Pro Cys Glu Gly Gly Gln Ala
 325 330 335
 Tyr Cys Tyr Asn Gly Met Cys Leu Thr Tyr Gln Glu Gln Cys Gln Gln
 340 345 350
 Leu Trp Gly Pro Gly Ala Arg Pro Ala Pro Asp Leu Cys Phe Glu Lys
 355 360 365
 Val Asn Val Ala Gly Asp Thr Phe Gly Asn Cys Gly Lys Asp Met Asn
 370 375 380

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Gly Glu His Arg Lys Cys Asn Met Arg Asp Ala Lys Cys Gly Lys Ile
 385 390 395 400
 Gln Cys Gln Ser Ser Glu Ala Arg Pro Leu Glu Ser Asn Ala Val Pro
 405 410 415
 Ile Asp Thr Thr Ile Ile Met Asn Gly Arg Gln Ile Gln Cys Arg Gly
 420 425 430
 Thr His Val Tyr Arg Gly Pro Glu Glu Glu Gly Asp Met Leu Asp Pro
 435 440 445
 Gly Leu Val Met Thr Gly Thr Lys Cys Gly Tyr Asn His Ile Cys Phe
 450 455 460
 Glu Gly Gln Cys Arg Asn Thr Ser Phe Phe Glu Thr Glu Gly Cys Gly
 465 470 475 480
 Lys Lys Cys Asn Gly His Gly Val Cys Asn Asn Asn Gln Asn Cys His
 485 490 495
 Cys Leu Pro Gly Trp Ala Pro Pro Phe Cys Asn Thr Pro Gly His Gly
 500 505 510
 Gly Ser Ile Asp Ser Gly Pro Met Pro Pro Glu Ser Val Gly Pro Val
 515 520 525
 Val Ala Gly Val Leu Val Ala Ile Leu Val Leu Ala Val Leu Met Leu
 530 535 540
 Met Tyr Tyr Cys Cys Arg Gln Asn Asn Lys Leu Gly Gln Leu Cys Pro
 545 550 555 560
 Ser Ala Leu Pro Ser Lys Leu Arg Gln Gln Phe Ser Cys Pro Phe Arg
 565 570 575
 Val Ser Gln Asn Ser Gly Thr Gly His Ala Asn Pro Thr Phe Lys Leu
 580 585 590
 Gln Thr Pro Gln Gly Lys Arg Lys Val Phe Leu Asp Leu Cys Val Gln
 595 600 605
 Val Ile Asn Thr Pro Glu Ile Leu Arg Lys Pro Ser Gln Pro Pro Pro
 610 615 620
 Arg Pro Pro Pro Asp Tyr Leu Arg Gly Gly Ser Pro Pro Ala Pro Leu
 625 630 635 640
 Pro Ala His Leu Ser Arg Ala Ala Arg Asn Ser Pro Gly Pro Gly Ser
 645 650 655
 Gln Ile Glu Arg Thr Glu Ser Ser Arg Pro Pro Pro Ser Arg Pro
 660 665 670
 Ile Pro Pro Ala Pro Asn Cys Ile Val Ser Gln Asp Phe Ser Arg Pro
 675 680 685
 Arg Pro Pro Gln Lys Ala Leu Pro Ala Asn Pro Val Pro Gly Arg Arg
 690 695 700
 Ser Leu Pro Arg Pro Gly Gly Ala Ser Pro Leu Arg Pro Pro Gly Ala
 705 710 715 720
 Gly Pro Gln Gln Ser Arg Pro Leu Ala Ala Leu Ala Pro Lys Arg Val
 725 730 735

WO 02/10406

PCT/US01/23734

```

Trp Lys Thr Cys Asn Leu Lys Thr Gly Asp Gln Phe Gln Ser Gln
      740              745              750

<210> 11
<211> 127
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (127)..(127)
<223> X at position 127 can be any amino acid or a series of any amino
      acids

<400> 11
Gln Ser Asn Gly Val Lys Thr Phe Ser Ser Cys Ser Leu Arg Ser Phe
1      5              10              15
Gln Asn Phe Ile Ser Asn Val Gly Val Lys Cys Leu Gln Asn Lys Pro
      20              25              30
Gln Met Gln Lys Lys Ser Pro Lys Pro Val Cys Gly Asn Gly Arg Leu
      35              40              45
Glu Gly Asn Glu Ile Cys Asp Cys Gly Thr Glu Ala Ile Leu Gln Ser
      50              55              60
Gly Val Glu Cys Arg Pro Lys Ala His Pro Glu Cys Asp Ile Ala Glu
      65              70              75              80
Asn Cys Asn Gly Ser Ser Pro Glu Cys Gly Pro Asp Ile Thr Leu Ile
      85              90              95
Asn Gly Leu Ser Cys Lys Asn Asn Lys Phe Ile Cys Tyr Asp Gly Asp
      100             105             110
Cys His Asp Leu Asp Ala Arg Cys Glu Ser Val Phe Gly Lys Xaa
      115             120             125

<210> 12
<211> 122
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (122)..(122)
<223> X at position 122 can be any amino acid or a series of any amino
      acids

<400> 12
Met Asp Leu Ser Leu His Val Ala Ser Leu Cys Leu Pro His His Pro
1      5              10              15
Ser Pro Ala Gln Leu Lys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Arg Gln Ala Met
      20              25              30
Gly Asp Cys Asp Leu Pro Glu Phe Cys Thr Gly Thr Ser Ser His Cys
      35              40              45
Pro Pro Asp Val Tyr Leu Leu Asp Gly Ser Pro Cys Ala Arg Gly Ser
      50              55              60
Gly Tyr Cys Trp Asp Gly Ala Cys Pro Thr Leu Glu Gln Gln Cys Gln
      65              70              75              80

```

WO 02/10406

PCT/US01/23734

```

Gln Leu Trp Gly Pro Gly Ser His Pro Ala Pro Glu Ala Cys Phe Gln
      85                      90                      95
Val Val Asn Ser Ala Gly Asp Ala His Gly Asn Cys Gly Gln Asp Ser
      100                    105                    110
Glu Gly His Phe Leu Pro Cys Ala Arg Xaa
      115                      120

<210> 13
<211> 67
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (67)..(67)
<223> X at position 67 can be any amino acid or a series of any amino a
cids

<400> 13
Phe Lys Pro Ala Asn Met Ile Cys Arg Lys Ser Val Gly Cys Gln Cys
1      5      10      15
Asp Phe Thr Glu Tyr Cys Asn Gly Asp Leu Pro Tyr Cys Leu Pro Asp
      20      25      30
Thr Tyr Val Arg Asp Gly Glu Tyr Cys Asp Ser Gly Gly Ala Phe Cys
      35      40      45
Phe Gln Gly Lys Cys Arg Thr Phe Asp Lys Gln Cys Asp Asp Leu Ile
      50      55      60
Gly Arg Xaa
      65

<210> 14
<211> 660
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Met Trp Arg Glu Phe Ile Ile His Pro Leu Leu Ala Thr Val Leu
1      5      10      15
Asp Leu Arg Gly Leu Leu His Leu Glu Asn Ala Ser Tyr Gly Ile Glu
      20      25      30
Pro Leu Gln Met Ser Ser His Phe Glu His Ile Ile Tyr Arg Met Asp
      35      40      45
Asp Val Tyr Lys Glu Pro Leu Lys Cys Gly Val Ser Asn Lys Asp Ile
      50      55      60
Glu Lys Glu Thr Ala Lys Asp Glu Glu Glu Glu Pro Pro Ser Met Thr
      65      70      75      80
Gln Leu Leu Arg Arg Arg Arg Ala Val Leu Pro Gln Thr Arg Tyr Val
      85      90      95
Glu Leu Phe Ile Val Val Asp Lys Glu Arg Tyr Asp Met Met Gly Arg
      100     105     110

```

WO 02/10406

PCT/US01/23734

```

Asn Gln Thr Ala Val Arg Glu Glu Met Ile Leu Leu Ala Asn Tyr Leu
115 120 125
Asp Ser Met Tyr Ile Met Leu Asn Ile Arg Ile Val Leu Val Gly Leu
130 135 140
Glu Ile Trp Thr Asn Gly Asn Leu Ile Asn Ile Val Gly Gly Ala Gly
145 150 155 160
Asp Val Leu Gly Asn Phe Val Gln Trp Arg Glu Lys Phe Leu Ile Thr
165 170 175
Arg Arg Arg His Asp Ser Ala Gln Leu Val Leu Lys Lys Gly Phe Gly
180 185 190
Gly Thr Ala Gly Met Ala Phe Val Gly Thr Val Cys Ser Arg Ser His
195 200 205
Ala Gly Gly Ile Asn Val Phe Gly Gln Ile Thr Val Glu Thr Phe Ala
210 215 220
Ser Ile Val Ala His Glu Leu Gly His Asn Leu Gly Met Asn His Asp
225 230 235 240
Asp Gly Arg Asp Cys Ser Cys Gly Ala Lys Ser Cys Ile Met Asn Ser
245 250 255
Gly Ala Ser Gly Ser Arg Asn Phe Ser Ser Cys Ser Ala Glu Asp Phe
260 265 270
Glu Lys Leu Thr Leu Asn Lys Gly Gly Asn Cys Leu Leu Asn Ile Pro
275 280 285
Lys Pro Asp Glu Ala Tyr Ser Ala Pro Ser Cys Gly Asn Lys Leu Val
290 295 300
Asp Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Thr Pro Lys Glu Cys Glu Leu
305 310 315 320
Asp Pro Cys Cys Glu Gly Ser Thr Cys Lys Leu Lys Ser Phe Ala Glu
325 330 335
Cys Ala Tyr Gly Asp Cys Cys Lys Asp Cys Arg Phe Leu Pro Gly Gly
340 345 350
Thr Leu Cys Arg Gly Lys Thr Ser Glu Cys Asp Val Pro Glu Tyr Cys
355 360 365
Asn Gly Ser Ser Gln Phe Cys Gln Pro Asp Val Phe Ile Gln Asn Gly
370 375 380
Tyr Pro Cys Gln Asn Asn Lys Ala Tyr Cys Cys Asn Gly Met Cys Gln
385 390 395 400
Tyr Tyr Asp Ala Gln Cys Gln Val Ile Phe Gly Ser Lys Ala Lys Ala
405 410 415
Ala Pro Lys Asp Cys Phe Ile Glu Val Asn Ser Lys Gly Asp Arg Phe
420 425 430
Gly Asn Cys Gly Phe Ser Gly Asn Glu Tyr Lys Lys Cys Ala Thr Gly
435 440 445
Leu Ser Leu Lys Phe His Ala Pro Phe Leu Ser Thr Met Leu Gln Glu
450 455 460
Ala Val Arg Gln Thr Thr Tyr Leu Gly Gly Ser Val Cys Cys Met
465 470 475 480

```

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Lys Ser Asp Cys Arg Ile Val Thr Leu Val Lys Asn Ala Leu Cys Gly
 485 490 495
 Lys Leu Gln Cys Glu Asn Val Gln Glu Ile Pro Val Phe Gly Ile Val
 500 505 510
 Pro Ala Ile Ile Gln Thr Pro Ser Arg Gly Thr Lys Cys Trp Gly Val
 515 520 525
 Asp Phe Gln Leu Gly Ser Asp Val Pro Asp Pro Gly Met Val Asn Glu
 530 535 540
 Gly Thr Lys Cys Gly Ala Gly Lys Ile Cys Arg Asn Phe Gln Cys Val
 545 550 555 560
 Asp Ala Ser Val Leu Asn Tyr Asp Cys Asp Val Gln Lys Lys Cys His
 565 570 575
 Gly His Gly Val Cys Asn Ser Asn Lys Asn Cys His Cys Glu Asn Gly
 580 585 590
 Trp Ala Pro Pro Asn Cys Glu Thr Lys Gly Tyr Gly Gly Ser Val Asp
 595 600 605
 Ser Gly Pro Thr Tyr Asn Glu Met Asn Thr Ala Leu Arg Asp Gly Leu
 610 615 620
 Leu Val Phe Phe Phe Leu Ile Val Pro Leu Ile Val Cys Asp Tyr Phe
 625 630 635 640
 Tyr Leu His Gln Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Leu Leu Gln Lys Glu
 645 650 655
 Glu Ile Thr Asn
 660
 <210> 15
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 15
 Glu Cys Glu Leu Ala Pro Cys Cys Glu Gly Ser Thr Cys Lys Leu Lys
 1 5 10 15
 Ser Phe Ala Glu Cys Ala Tyr Gly Asp Cys Cys Lys Asp Cys Arg
 20 25 30
 <210> 16
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 16
 Phe Lys Pro Ala Asn Met Ile Cys Arg Lys Ser Val Gly Lys Glu Cys
 1 5 10 15
 Asp Phe Thr Glu Tyr Cys Asn Gly Asp Leu Pro Tyr Cys Leu Pro Asp
 20 25 30
 Thr Tyr Val Arg Asp Gly Glu Tyr Cys Asp Ser Gly Gly Ala Phe Cys
 35 40 45
 Phe Gln Gly Lys Cys Arg Thr Phe Ala Gln Thr Met
 50 55 60

WO 02/10406

PCT/US01/23734

```

<210> 17
<211> 112
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 17
Val Tyr Cys Phe His Asp Pro Pro Gly Trp Arg Phe Thr Ser Ser Glu
1      5      10
Ile Val Ile Pro Arg Lys Val Pro His Lys Arg Gly Gly Val Glu Met
20     25     30
Pro Asp Gln Leu Ser Tyr Ser Met Arg Phe Arg Gly Gln Arg His Val
35     40     45
Ile His Met Lys Leu Lys Lys Asn Met Met Pro Arg His Leu Pro Val
50     55     60
Phe Thr Asp Asn Asp Gln Gly Ala Met Gln Glu Asn Tyr Pro Phe Val
65     70     75     80
Pro Arg Asp Cys Tyr Tyr Asp Cys Tyr Leu Glu Gly Val Pro Gly Ser
85     90     95
Ala Ala Thr Leu Asp Thr Cys Arg Gly Gly Leu His Gly Met Leu Gln
100    105    110

<210> 18
<211> 57
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> X at position 57 can be any amino acid or a series of any amino a
cids

<400> 18
Phe Tyr Arg Pro Leu Asn Ile Arg Ile Val Leu Val Gly Val Glu Val
1      5      10     15
Trp Asn Asp Met Asp Lys Cys Ser Val Ser Gln Asp Pro Phe Thr Ser
20     25     30
Pro Pro Gln Phe Met Asp Trp Arg Lys Met Lys Leu Leu Pro Arg Lys
35     40     45
Ser His Asp Asn Ala Gln Leu Val Xaa
50     55

<210> 19
<211> 57
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> X at position 57 can be any amino acid or a series of any amino a
cids

```

WO 02/10406

PCT/US01/23734

<400> 19

Phe Cys Arg Pro Leu Asn Ile Arg Ile Val Leu Val Gly Val Glu Val
1 5 10 15

Trp Asn Asp Met Asp Lys Cys Ser Val Ser Gln Asp Pro Phe Thr Ser
20 25 30

Leu His Glu Phe Leu Asp Trp Arg Lys Met Lys Leu Ile Pro Arg Lys
35 40 45

Ser His Asp Asn Ala Gln Leu Val Xaa
50 55

<210> 20

<211> 168

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 20

Met Thr Asp Val Gly Arg Val Ile Asp Gly Thr Pro Cys Val His Gly
1 5 10 15

Asn Phe Cys Asn Asn Thr Arg Cys Asn Ala Thr Ile Thr Ser Leu Gly
20 25 30

Tyr Asp Cys Arg Leu Glu Lys Cys Ser His Arg Gly Val Cys Asn Asn
35 40 45

Arg Arg Asn Cys His Cys His Ile Gly Trp Asp Pro Pro Leu Cys Leu
50 55 60

Arg Arg Gly Ala Gly Gly Ser Val Asp Ser Gly Pro Pro Pro Lys Arg
65 70 75 80

Thr Cys Ser Leu Arg Gln Ser Gln Gln Ser Glu Met Tyr Leu Arg Val
85 90 95

Val Phe Gly Arg Ile Tyr Ala Phe Ile Ile Ala Leu Leu Phe Gly Thr
100 105 110

Ala Thr Asn Val Gln Thr Tyr Gln Asp His His Arg Ala His Pro Leu
115 120 125

Ser Ala Arg Ala Arg Pro Pro Ser Leu Ala Gln Pro His Ile Val Ser
130 135 140

Gly Pro Val Ser Pro Ser Pro Pro Lys Gln Met Pro Asp Leu Gly
145 150 155 160

His Cys Ser Ala Gln Gly Ala Val
165

<210> 21

<211> 812

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 21

Met Gly Trp Arg Pro Arg Arg Ala Arg Gly Thr Pro Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Trp Pro Val Pro Gly Ala Gly Val Leu Gln
20 25 30

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Gly His Ile Pro Gly Gln Pro Val Thr Pro His Trp Val Leu Asp Gly
 35 40 45
 Gln Pro Trp Arg Thr Val Ser Leu Glu Glu Pro Val Ser Lys Pro Asp
 50 55 60
 Met Gly Leu Val Ala Leu Glu Ala Glu Gly Gln Glu Leu Leu Glu
 65 70 75 80
 Leu Glu Lys Asn His Arg Leu Leu Ala Pro Gly Tyr Ile Glu Thr His
 85 90 95
 Tyr Gly Pro Asp Gly Gln Pro Val Val Leu Ala Pro Asn His Thr Asp
 100 105 110
 His Cys His Tyr Gln Gly Arg Val Arg Gly Phe Pro Asp Ser Trp Val
 115 120 125
 Val Leu Cys Thr Cys Ser Gly Met Ser Gly Leu Ile Thr Leu Ser Arg
 130 135 140
 Asn Ala Ser Tyr Tyr Leu Arg Pro Trp Pro Pro Arg Gly Ser Lys Asp
 145 150 155 160
 Phe Ser Thr His Glu Ile Phe Arg Met Glu Gln Leu Leu Thr Trp Lys
 165 170 175
 Gly Thr Cys Gly His Arg Asp Pro Gly Asn Lys Ala Gly Met Thr Ser
 180 185 190
 Leu Pro Gly Gly Pro Gln Ser Arg Gly Arg Arg Glu Ala Arg Arg Thr
 195 200 205
 Arg Lys Tyr Leu Glu Leu Tyr Ile Val Ala Asp His Thr Leu Phe Leu
 210 215 220
 Thr Arg His Arg Asn Leu Asn His Thr Lys Gln Arg Leu Leu Glu Val
 225 230 235 240
 Ala Asn Tyr Val Asp Gln Leu Leu Arg Thr Leu Asp Ile Gln Val Ala
 245 250 255
 Leu Thr Gly Leu Glu Val Trp Thr Glu Arg Asp Arg Ser Arg Val Thr
 260 265 270
 Gln Asp Ala Asn Ala Thr Leu Trp Ala Phe Leu Gln Trp Arg Arg Gly
 275 280 285
 Leu Trp Ala Gln Arg Pro His Asp Ser Ala Gln Leu Leu Thr Gly Arg
 290 295 300
 Ala Phe Gln Gly Ala Thr Val Gly Leu Ala Pro Val Glu Gly Met Cys
 305 310 315 320
 Arg Ala Glu Ser Ser Gly Gly Val Ser Thr Asp His Ser Glu Leu Pro
 325 330 335
 Ile Gly Ala Ala Ala Thr Met Ala His Glu Ile Gly His Ser Leu Gly
 340 345 350
 Leu Ser His Asp Pro Asp Gly Cys Cys Val Glu Ala Ala Glu Ser
 355 360 365
 Gly Gly Cys Val Met Ala Ala Ala Thr Gly His Pro Phe Pro Arg Val
 370 375 380
 Phe Ser Ala Cys Ser Arg Arg Gln Leu Arg Ala Phe Phe Arg Lys Gly
 385 390 395 400

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Gly Gly Ala Cys Leu Ser Asn Ala Pro Asp Pro Gly Leu Pro Val Pro
 405 410 415
 Pro Ala Leu Cys Gly Asn Gly Phe Val Glu Ala Gly Glu Glu Cys Asp
 420 425 430
 Cys Gly Pro Gly Gln Glu Cys Arg Asp Leu Cys Cys Phe Ala His Asn
 435 440 445
 Cys Ser Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala His Gly Asp Cys Cys Val
 450 455 460
 Arg Cys Leu Leu Lys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Arg Gln Ala Met Gly
 465 470 475 480
 Asp Cys Asp Leu Pro Glu Phe Cys Thr Gly Thr Ser Ser His Cys Pro
 485 490 495
 Pro Asp Val Tyr Leu Leu Asp Gly Ser Pro Cys Ala Arg Gly Ser Gly
 500 505 510
 Tyr Cys Trp Asp Gly Ala Cys Pro Thr Leu Glu Gln Gln Cys Gln Gln
 515 520 525
 Leu Trp Gly Pro Gly Ser His Pro Ala Pro Glu Ala Cys Phe Gln Val
 530 535 540
 Val Asn Ser Ala Gly Asp Ala His Gly Asn Cys Gly Gln Asp Ser Glu
 545 550 555 560
 Gly His Phe Leu Pro Cys Ala Gly Arg Asp Ala Leu Cys Gly Lys Leu
 565 570 575
 Gln Cys Gln Gly Lys Pro Ser Leu Leu Ala Pro His Met Val Pro
 580 585 590
 Val Asp Ser Thr Val His Leu Asp Gly Gln Glu Val Thr Cys Arg Gly
 595 600 605
 Ala Leu Ala Leu Pro Ser Ala Gln Leu Asp Leu Leu Gly Leu Gly Leu
 610 615 620
 Val Glu Pro Gly Thr Gln Cys Gly Pro Arg Met Val Cys Gln Ser Arg
 625 630 635 640
 Arg Cys Arg Lys Asn Ala Phe Gln Glu Leu Gln Arg Cys Leu Thr Ala
 645 650 655
 Cys His Ser His Gly Val Cys Asn Ser Asn His Asn Cys His Cys Ala
 660 665 670
 Pro Gly Trp Ala Pro Pro Phe Cys Asp Lys Pro Gly Phe Gly Gly Ser
 675 680 685
 Met Asp Ser Gly Pro Val Gln Ala Glu Asn His Asp Thr Phe Leu Leu
 690 695 700
 Ala Met Leu Leu Ser Val Leu Leu Pro Leu Leu Pro Gly Ala Gly Leu
 705 710 715 720
 Ala Trp Cys Cys Tyr Arg Leu Pro Gly Ala His Leu Gln Arg Cys Ser
 725 730 735
 Trp Gly Cys Arg Arg Asp Pro Ala Cys Ser Gly Pro Lys Asp Gly Pro
 740 745 750

WO 02/10406

PCT/US01/23734

His Arg Asp His Pro Leu Gly Gly Val His Pro Met Glu Leu Gly Pro
 755 760 765
 Thr Ala Thr Gly Gln Pro Trp Pro Leu Asp Pro Glu Asn Ser His Glu
 770 775 780
 Pro Ser Ser His Pro Glu Lys Pro Leu Pro Ala Val Ser Pro Asp Pro
 785 790 795 800
 Gln Asp Gln Val Gln Met Pro Arg Ser Cys Leu Trp
 805 810
 <210> 22
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (39)..(39)
 <223> X at position 39 can be any amino acid or a series of any amino acids
 <400> 22
 Met Ala His Glu Ile Gly His Ser Leu Gly Leu Ser His Asp Pro Asp
 1 5 10 15
 Gly Cys Cys Val Glu Ala Ala Ala Glu Ser Gly Gly Cys Val Met Ala
 20 25 30
 Ala Ala Thr Gly Tyr Ala Xaa
 35
 <210> 23
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 23
 Met Arg Asp Arg Glu Gln Leu Arg Pro Gly Leu Gly Ala Gly Trp Ala
 1 5 10 15
 Glu Gly Leu Ala Ser His Gly Glu Pro Glu Asp Gly His Trp Cys Val
 20 25 30
 Leu Gly Ala Leu Thr His Leu Ser Leu Phe Gly Lys Ser Thr Leu Cys
 35 40 45
 Thr Glu Glu Cys Val His Gly Arg Cys Val Ser Pro Asp Thr Cys His
 50 55 60
 Cys Glu Pro Gly Trp Gly Gly Pro Asp Cys Ser Ser Asp Leu Glu Arg
 65 70 75 80
 Met Gly Arg Trp Glu Leu Leu Leu Ser Pro Met Leu Ser Ser Arg Leu
 85 90 95
 Ser Arg Leu Lys Gln Leu Gln Met Asn His Arg Lys Ala Ile Thr Leu
 100 105 110
 Thr Val Pro Arg Val Gln Leu Cys Gln Ala Arg Gly Pro Ser Gln Thr
 115 120 125
 Arg Leu Gly Arg Leu Leu Pro Ala Ser Val Pro Pro Arg Arg Asn Gly
 130 135 140

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Lys Gly Glu Glu Ala Gly Ala Gly Glu Pro Arg Pro Cys Gly Ser Pro
 145 150 155 160
 Asp Leu Cys Gln Asp Glu Asp Gln Ala Gly Lys Gly Gln Pro Met Glu
 165 170 175
 Thr Pro Glu His Gln Leu Lys Gly Ser Trp Ser Phe Pro Pro His Leu
 180 185 190
 Tyr Pro Pro Pro Thr His Val Pro Val Met Leu Leu Pro Gly His Ser
 195 200 205
 Pro Asn Trp Glu Pro Glu Pro Trp Met Val Gln Ile Met Arg Asn Asp
 210 215 220
 Arg Ser Pro Met Gln Leu Gln Gly Leu Ser Gly Glu Ser Thr Arg His
 225 230 235 240
 Thr Gly Arg Ser Ala Val Glu Met Ser Asp Ser Leu Ser
 245 250

 <210> 24
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

 <400> 24
 Leu Asn Val Ser Thr Ala Val His Arg Gln Gly Ser Lys Thr Ala Ser
 1 5 10 15
 His Val Pro Ser Ser Gly Ala Ser His Trp Thr Trp Asp Ala Cys
 20 25 30
 Arg Pro Gln Ser Ile Leu Ser Ser Ala Ser Val Ile Asn Ser Tyr Asp
 35 40 45
 Glu Asn Asp Ile Arg His Ser Lys Pro Leu Leu Val Gln Lys Thr Asp
 50 55 60
 Phe Ile Lys Leu Phe Pro Arg Tyr Ile Glu Met His Ile Val Val Asp
 65 70 75 80
 Lys Asn Leu Tyr Ser Lys Thr Val Thr Leu Glu Gly Phe Ser Val Val
 85 90 95
 Met Thr Gln Leu Leu Gly Ile Asn Leu Gly Leu Thr Tyr Asp Asp Ile
 100 105 110
 Tyr Asn Cys Asn Cys Pro Gly Ala Thr Cys Val Met Asn Ser Lys Ala
 115 120 125
 Met Gly Phe Leu Gln Phe Glu Asn Ile Ser Tyr Gly Ile Glu Pro Val
 130 135 140
 Glu Ser Ser Ala Arg Phe Glu His Ile Ile Tyr Gln Met Lys Asn Asn
 145 150 155 160
 Asp Pro Asn Val Ser Ile Leu Ala Val Asn Tyr Ser His Ile Trp Gln
 165 170 175
 Lys Asp Gln Pro Tyr Lys Val Pro Leu Asn Ser Gln Tyr Pro Asp Ala
 180 185 190
 Ile Gly Leu Glu Gly Phe Ser Val Ile Ile Ala Gln Leu Leu Gly Leu
 195 200 205

WO 02/10406

PCT/US01/23734

```

Asn Val Gly Leu Thr Tyr Asp Asp Ile Thr Gln Cys Phe Cys Leu Arg
210                               215                               220
Ala Thr Cys Ile Met Asn His Glu Ala Val Ser Ala Ser Gly Arg Lys
225                               230                               235                               240
Ile Phe Ser Asn Cys Ser Met His Asp Tyr Arg Tyr Phe Val Ser Lys
245                               250                               255
Phe Glu Thr Lys Cys Leu Gln Lys Leu Ser Asn Leu Gln Pro Leu His
260                               265                               270
Gln Asn Gln Pro Val Cys Gly Asn Gly Ile Leu Glu Ser Asn Glu Glu
275                               280                               285
Cys Asp Cys Gly Asn Lys Asn Leu Ser Ile Ala Gly Thr Pro Cys Arg
290                               295                               300
Lys Ser Ile Asp Pro Glu Cys Asp Phe Thr Glu Tyr Cys Asn Gly Thr
305                               310                               315                               320
Ser Ser Asn Cys Val Pro Asp Thr Tyr Ala Leu Asn Gly Arg Leu Cys
325                               330                               335
Lys Leu Gly Thr Ala Tyr Cys Tyr Asn Gly Gln Cys Gln Thr Thr Asp
340                               345                               350
Asn Gln Cys Ala Lys Ile Phe Gly Lys Gly Ala Gln Gly Ala Pro Phe
355                               360                               365
Ala Cys Phe Lys Glu Val Asn Ser Leu His Glu Arg Ser Glu Asn Cys
370                               375                               380
Gly Phe Lys Asn Ser Gln Pro Leu Pro Cys Glu Arg Lys Tyr Val Ile
385                               390                               395                               400
Ile Leu Val Ile Val Asn Ala Ser Leu Asp Ile Asp Leu Gln Ile Val
405                               410                               415
Asn Ser Ser Leu Val Pro Gln Gly Val Val Leu Met Met Glu Ile Phe
420                               425                               430
Arg Asn Leu
435
<210> 25
<211> 811
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 25
Gly Ser Glu Glu Gly Ser Pro Lys Leu Gln His Glu Leu Ile Ile Pro
1                               5                               10                               15
Gln Trp Lys Thr Ser Glu Ser Pro Val Arg Glu Lys His Pro Leu Lys
20                               25                               30
Ala Glu Leu Arg Val Met Ala Glu Gly Arg Glu Leu Ile Leu Asp Leu
35                               40                               45
Glu Lys Asn Glu Ile Thr Ala Phe Thr Thr Ala Arg Gly Leu Ile Thr
50                               55                               60
Val Ser Ser Asn Leu Ser Tyr Val Ile Glu Pro Leu Pro Asp Ser Lys
65                               70                               75                               80

```

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Gly Gln His Leu Ile Tyr Arg Ser Glu His Leu Lys Pro Pro Gly
 85 90 95
 Asn Cys Gly Phe Glu His Ser Lys Pro Thr Thr Arg Asp Trp Ala Leu
 100 105 110
 Gln Phe Thr Gln Gln Thr Lys Lys Arg Pro Arg Arg Met Lys Arg Glu
 115 120 125
 Asp Leu Asn Ser Met Lys Tyr Val Glu Leu Tyr Leu Val Ala Asp Tyr
 130 135 140
 Leu Glu Phe Gln Lys Asn Arg Arg Asp Gln Asp Ala Thr Lys His Lys
 145 150 155 160
 Leu Ile Glu Ile Ala Asn Tyr Val Asp Lys Phe Tyr Arg Ser Leu Asn
 165 170 175
 Ile Arg Ile Ala Leu Val Gly Leu Glu Val Trp Thr His Gly Asn Met
 180 185 190
 Cys Glu Val Ser Glu Asn Pro Cys Ser Thr Leu Trp Ser Phe Leu Ser
 195 200 205
 Trp Arg Arg Lys Leu Leu Ala Gln Lys Tyr His Asp Asn Ala Gln Leu
 210 215 220
 Ile Thr Gly Met Ser Phe His Gly Thr Thr Ile Gly Leu Ala Pro Leu
 225 230 235 240
 Met Ala Met Cys Ser Val Tyr Gln Ser Gly Gly Val Asn Met Asp His
 245 250 255
 Ser Glu Asn Ala Ile Gly Val Ala Ala Thr Met Ala His Glu Met Gly
 260 265 270
 His Asn Phe Gly Met Thr His Asp Ser Ala Asp Cys Cys Ser Ala Ser
 275 280 285
 Ala Ala Asp Gly Gly Cys Ile Met Ala Ala Ala Thr Gly His Pro Phe
 290 295 300
 Pro Lys Val Phe Asn Gly Cys Asn Arg Arg Glu Leu Asp Arg Tyr Leu
 305 310 315 320
 Gln Ser Gly Gly Gly Met Cys Leu Ser Asn Met Pro Asp Thr Arg Met
 325 330 335
 Leu Tyr Gly Gly Arg Arg Cys Gly Asn Gly Tyr Leu Glu Asp Gly Glu
 340 345 350
 Glu Cys Asp Cys Gly Glu Glu Glu Glu Cys Asn Asn Pro Cys Cys Asn
 355 360 365
 Ala Ser Asn Cys Thr Leu Arg Pro Gly Ala Glu Cys Ala His Gly Ser
 370 375 380
 Cys Cys His Gln Cys Lys Leu Leu Ala Pro Gly Thr Leu Cys Arg Glu
 385 390 395 400
 Gln Ala Arg Gln Cys Asp Leu Pro Glu Phe Cys Thr Gly Lys Ser Pro
 405 410 415
 His Cys Pro Thr Asn Phe Tyr Gln Met Asp Gly Thr Pro Cys Glu Gly
 420 425 430
 Gly Gln Ala Cys Cys Tyr Asn Gly Met Cys Leu Thr Tyr Gln Glu Gln
 435 440 445

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Cys Gln Gln Leu Trp Gly Pro Gly Ala Arg Pro Ala Pro Asp Leu Cys
 450 455 460
 Phe Glu Lys Val Asn Val Ala Gly Asp Thr Phe Gly Asn Cys Gly Lys
 465 470 475 480
 Asp Met Asn Gly Glu His Arg Lys Cys Asn Met Arg Asp Ala Lys Cys
 485 490 495
 Gly Lys Ile Gln Cys Gln Ser Ser Glu Ala Arg Pro Leu Glu Ser Asn
 500 505 510
 Ala Val Pro Ile Asp Thr Thr Ile Ile Met Asn Gly Arg Gln Ile Gln
 515 520 525
 Cys Arg Gly Thr His Val Tyr Arg Gly Pro Glu Glu Glu Gly Asp Met
 530 535 540
 Leu Asp Pro Gly Leu Val Met Thr Gly Thr Lys Cys Gly Tyr Asn His
 545 550 555 560
 Ile Cys Phe Glu Gly Gln Cys Arg Asn Thr Ser Phe Phe Glu Thr Glu
 565 570 575
 Gly Cys Gly Lys Lys Cys Asn Asp His Gly Val Cys Asn Asn Asn Gln
 580 585 590
 Asn Cys His Cys Leu Pro Gly Trp Ala Pro Pro Phe Cys Asn Thr Pro
 595 600 605
 Gly His Gly Gly Ser Ile Asp Ser Gly Pro Met Pro Pro Glu Ser Val
 610 615 620
 Gly Pro Val Val Ala Gly Val Leu Val Ala Ile Leu Val Leu Ala Val
 625 630 635 640
 Leu Met Leu Met Tyr Tyr Cys Cys Arg Glu Asn Asn Lys Leu Gly Gln
 645 650 655
 Leu Lys Pro Ser Ala Leu Pro Ser Lys Leu Arg Gln Gln Phe Arg Val
 660 665 670
 Ser Gln Asn Ser Gly Thr Gly His Ala Asn Pro Thr Phe Lys Leu Gln
 675 680 685
 Thr Pro Gln Gly Lys Arg Lys Val Ile Asn Thr Pro Glu Ile Leu Arg
 690 695 700
 Lys Pro Ser Gln Pro Pro Pro Arg Pro Pro Pro Asp Tyr Leu Arg Gly
 705 710 715 720
 Leu Leu Gln Ala Ser Ala Ala Pro Glu Gly Thr Pro Gly Lys Pro Ser
 725 730 735
 Ala Arg Pro Gln Glu Pro Pro Gln Ala Arg Cys Ile Pro Thr Ala
 740 745 750
 Ala Pro Trp Cys Trp Pro Ser Ala Val Pro Ala Ser Gly Ser Thr Cys
 755 760 765
 Pro Lys Glu Gly Met Glu Asp Leu Gln Phe Glu Asn Trp Gly Pro Val
 770 775 780
 Pro Lys Ser Val Ile Val Leu Thr Thr Cys Ile Thr Ala Leu Leu Asp
 785 790 795 800

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Thr Gln Glu Ser His Gly Asn Ala Asn Trp Lys
 805 810
 <210> 26
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 26
 Asp Leu Leu Pro Glu Asp Phe Val Val Tyr Thr Tyr Asn Lys Glu Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Ile Thr Asp His Pro Asn Ile Gln Asn His Cys His Tyr Arg
 20 25 30
 Gly Tyr Val Glu Gly Val His Asn Ser Ser Ile Ala Leu Ser Asp Cys
 35 40 45
 Phe Gly Leu Arg Gly Leu Leu His Leu Glu Asn Ala Ser Tyr Gly Ile
 50 55 60
 Glu Pro Leu Gln Asn Ser Ser His Phe Glu His Ile Ile Tyr Arg Met
 65 70 75 80
 Asp Asp Val Tyr Lys Glu Pro Leu Lys Cys Gly Val Ser Asn Lys Asp
 85 90 95
 Ile Glu Lys Glu Thr Ala Lys Asp Glu Glu Glu Glu Pro Pro Ser Met
 100 105 110
 Thr Gln Leu Leu Arg Arg Arg Arg Ala Val Leu Pro Gln Thr Arg Tyr
 115 120 125
 Val Glu Leu Phe Ile Val Val Asp Lys Glu Arg Phe Gly Gln Ile Thr
 130 135 140
 Val Glu Thr Phe Ala Ser Ile Val Ala His Glu Leu Gly His Asn Leu
 145 150 155 160
 Gly Met Asn His Asp Asp Gly Arg Asp Cys Ser Cys Gly Ala Lys Ser
 165 170 175
 Cys Ile Met Asn Ser Gly Ala Ser Gly Ser Arg Asn Phe Ser Ser Cys
 180 185 190
 Ser Ala Glu Asp Phe Glu Lys Leu Thr Leu Asn Lys Gly Gly Asn Cys
 195 200 205
 Leu Leu Asn Ile Pro Lys Pro Asp Glu Ala Tyr Ser Ala Pro Ser Cys
 210 215 220
 Gly Asn Lys Leu Val Asp Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Thr Pro
 225 230 235 240
 Lys Ser Phe Tyr Val His Arg Asn Val Asn Trp Thr Leu Ala Ala Lys
 245 250 255
 Glu Val Pro Val Ser Leu Asn His Leu Leu Ser Val His Met Val Thr
 260 265 270
 Val Val Lys Thr Val Gly Phe Cys Gln Pro Asp Val Phe Ile Gln Asn
 275 280 285
 Gly Tyr Pro Cys Gln Asn Asn Lys Ala Tyr Cys Tyr Asn Gly Met Cys
 290 295 300

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Gln Tyr Tyr Asp Ala Gln Cys Gln Val Ile Phe Gly Ser Lys Ala Lys
 305 310 315 320
 Ala Ala Pro Lys Asp Cys Phe Ile Glu Val Asn Ser Lys Gly Asp Arg
 325 330 335
 Phe Gly Asn Cys Gly Phe Ser Gly Asn Glu Tyr Lys Lys Cys Ala Thr
 340 345 350
 Gly Pro Pro Pro Gln Pro Lys Val Ser Ser Gln Gly Asn Leu Ile
 355 360 365
 Pro Ala Arg Pro Ala Pro Ala Pro Pro Leu Tyr Ser Ser Leu Thr
 370 375 380

 <210> 27
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

 <400> 27
 Met Arg Gln Ala Glu Val Arg Val Thr Leu Arg Ala Pro Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Gly Leu Trp Ala Leu Leu Ala Pro Val Arg Cys Ser Gln Gly Arg
 20 25 30
 Pro Leu Trp His Tyr Ala Ser Ser Glu Val Val Ile Pro Arg Lys Glu
 35 40 45
 Thr His His Gly Lys Gly Leu Gln Phe Pro Gly Trp Leu Ser His Ser
 50 55 60
 Leu Arg Phe Gly Gly Gln Arg His Val Ile His Met Arg Arg Lys His
 65 70 75 80
 Leu Leu Trp Pro Arg His Leu Leu Val Thr Thr Gln Asp Asp Gln Gly
 85 90 95
 Ala Leu Pro Met Asp Gly Pro Tyr Ile Pro Pro Asp Cys Tyr Tyr Leu
 100 105 110
 Gly Tyr Leu Glu Glu Val Pro Gln Ser Met Val Thr Ile Asp Thr Cys
 115 120 125
 Tyr Gly Gly Leu Arg Gly Ile Met Lys Leu Asp Asp Leu Ala Tyr Glu
 130 135 140
 Ile Lys Pro Leu Gln Asp Ser Arg Arg Phe Glu His Val Val Ser Gln
 145 150 155 160
 Ile Val Ala Glu Pro Asn Ala Thr Val Pro Thr Phe Arg Asp Gly Asp
 165 170 175
 Asn Glu Glu Thr Asp Pro Leu Phe Ser Glu Ala Asn Asn Ser Met Asn
 180 185 190
 Pro Arg Ile Ser Asn Ser Leu Tyr Ser Ser His Arg Gly Asn Ile Lys
 195 200 205
 Gly His Val Gln Cys Ser Asn Ser Tyr Tyr His Ile Tyr Gly Asn Ile
 210 215 220
 Thr Thr Cys Ser Lys Glu Val Val Gln Met Phe Ser Leu Ile Asp Ser
 225 230 235 240

WO 02/10406

PCT/US01/23734

```

Ile Val Gln Asn Ile Asp Leu Trp Tyr Tyr Ile Tyr Leu Leu Thr Ile
245 250 255
Tyr Asn Asn Arg Asp Pro Ala Pro Val Asn Gln Tyr Arg Ile Gln Ser
260 265 270
Ala Met Phe Thr Tyr Phe Lys Thr Thr Phe Phe Asp Thr Phe His Val
275 280 285
His Ser Ser Thr Leu Leu Ile Lys Asp Ala Pro His Glu Ser Asn Tyr
290 295 300
Glu Pro Glu Arg Pro Ile Gln Asn Ile Cys Asp Leu Pro Glu Tyr Cys
305 310 315 320
His Gly Thr Thr Val Thr Cys Pro Ala Asn Phe Tyr Met Gln Asp Gly
325 330 335
Thr Leu Cys Met Glu Glu Gly Tyr Cys Tyr His Gly Asn Cys Thr Asp
340 345 350
Arg Asn Val Leu Cys Lys Ala Met Phe Gly Val Ser Ala Glu Asp Ala
355 360 365
Pro Glu Val Cys Tyr Asp Ile Asn Leu Glu Ser Tyr Arg Phe Gly His
370 375 380
Cys Ile Arg Gln Gln Thr Tyr Leu Ser Tyr Gln Ala Cys Thr Gly Ile
385 390 395 400
Asp Lys Phe Cys Gly Gly Leu Gln Cys Thr Asn Val Thr His Leu Pro
405 410 415
Gln Leu Gln Glu His Val Ser Phe His His Ser Val Arg Gly Gly Phe
420 425 430
Gln Cys Phe Arg Leu Asp Glu His His Ala Thr Asp Met Thr Asp Val
435 440 445
Gly Arg Val Ile Asp Gly Thr Pro Cys Val His Gly Asn Phe Cys Asn
450 455 460
Asn Thr Arg Cys Asn Ala Thr Ile Thr Ser Leu Gly Tyr Asp Cys Arg
465 470 475 480
Leu Glu Lys Cys Ser His Arg Gly Val Cys Asn Asn Arg Arg Asn Cys
485 490 495
His Cys His Ile Gly Trp Asp Pro Pro Leu Cys Leu Arg Arg Gly Ala
500 505 510
Gly Gly Ser Val Asp Ser Gly Pro Pro Pro Lys Arg Thr Arg Ser Leu
515 520 525
Arg Gln Ser Gln Gln Ser Glu Met Tyr Leu Arg Val Val Phe Gly Arg
530 535 540
Ile Tyr Ala Phe Ile Ile Ala Leu Leu Phe Gly Thr Ala Thr Asn Val
545 550 555 560
Gln Thr Tyr Gln Asp His His Arg Leu Gly Arg Asp Ser Tyr
565 570

```

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

WO 02/10406

PCT/US01/23734

```

<220>
<223> Conserved Motif Sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> X is any amino acid

<400> 28
His Glu Xaa Gly His Xaa Xaa Gly Xaa Xaa His Asp
1          5          10

<210> 29
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Conserved Motif Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(14)
<223> X at position 4 is any amino acid; X at position 5 and 12 is either I or V; X at position 6 is A or V

<400> 29
Leu Asn Ile Xaa Xaa Xaa Leu Val Gly Leu Glu Xaa Trp Thr
1          5          10

<210> 30
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Conserved Motif Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(9)
<223> X at residue 4 is G or K; X at residue 5 is any amino acid; X at residue 6 is S or V; X at residue 7 is E or D; and X at residue 9 is any amino acid

<400> 30
Cys Gly Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Asn Glu Glu Cys Asp Cys Gly
1          5          10          15

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker Moiety

<400> 31
Gly Gly Gly Gly Ser
1          5

<210> 32
<211> 6
<212> PRT

```

WO 02/10406

PCT/US01/23734

```

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Linker Moiety

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> X is one or more repeats of GGGS

<400> 32
Gly Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker Moiety

<400> 33
Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser
1 5 10

<210> 34
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker Moiety

<400> 34
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

<210> 35
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker Moiety

<400> 35
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 36
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker Moiety

<400> 36

```

WO 02/10406

PCT/US01/23734

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 37
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Linker Moiety

<400> 37

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe
 1 5 10

<210> 38
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Localization Sequence

<400> 38

Lys Lys Lys Arg Lys
 1 5

<210> 39
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Localization Sequence

<400> 39

Met Leu Phe Thr Ser Ser Leu Phe Thr Arg Arg Val Gln Pro Ser Leu
 1 5 10 15

Phe Arg Asn Ile Leu Arg Leu Gly Ser Thr
 20 25

<210> 40
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Localization Sequence

<400> 40

Lys Asp Glu Leu
 1

<210> 41
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Localization Sequence

WO 02/10406

PCT/US01/23734

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> X is any amino acid

<400> 41
Cys Ala Ala Xaa
1

<210> 42
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Localization Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> X is any amino acid

<400> 42
Cys Cys Xaa Xaa
1

<210> 43
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward Primer Sequence

<400> 43
ctgctgctgt ggctgggagt g

<210> 44
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse Primer Sequence

<400> 44
gtcataccca aattatgacc aagctcagg
```

21

29

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/010406 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/57
9/64, C07K 15/00, G01N 33/58, A61K 38/23, G06F
15/00, 19/00, C12Q 1/57
- (21) International Application Number: PCT/US01/23734
- (22) International Filing Date: 27 July 2001 (27.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/221,838 28 July 2000 (28.07.2000) US
- (71) Applicant *for all designated States except US*: IMMUNEX CORPORATION [US/US]; 51 University Street, Seattle, WA 98101 (US).
- (72) Inventors; and
(73) Inventors/Applicants *for US only*: DUROSE, Robert, F. [US/US]; 6151 156th Place SE, Bellevue, WA 98006 (US); WILEY, Steven, R. [US/US]; 1311 11th Avenue West 8th, Seattle, WA 98119 (US); BLACK, Roy, A. [US/US]; 8003 30th Avenue NE, Seattle, WA 98115 (US).
- (74) Agent: BAKER, Joseph, R.; Immunex Corporation, Law Department, 51 University Street, Seattle, WA 98101 (US).
- (81) Designated States (*national*): AF, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KZ, LA, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO (*sub*): GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW; Eurasian (*sub*): AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM; European (*sub*): AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, SI, TR; OAPI (*sub*): BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, NG, TD, TG.
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 16 January 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/010406 A3

(54) Title: METALLOPROTEINASE-DISINTEGRIN POLYPEPTIDES AND METHODS OF MAKING AND USE THEREOF

(57) Abstract: Provided is a new disintegrin polypeptide, methods of making such polypeptides, and methods of using them to treat disintegrin-associated disorders and conditions and to identify agents that modulate Metalloproteinase-Disintegrin polypeptide activities.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/23734
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/57 C12N9/64 C07K16/40 G01N33/68 A61K38/43 G06F15/00 G06F19/00 C12Q1/37		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N A61K G06F		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Search criteria base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Division of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PERRY A C F ET AL: "ANALYSIS OF TRANSCRIPTS ENCODING NOVEL MEMBERS OF THE MAMMALIAN METALLOPROTEASE-LIKE, DISINTEGRIN-LIKE, CYSTEINE-RICH (MDC) PROTEINFAMILY AND THEIR EXPRESSION IN REPRODUCTIVE AND NON-REPRODUCTIVE MONKEY TISSUES" BIOCHEMICAL JOURNAL, PORTLAND PRESS, LONDON, GB, vol. 312, no. PART 1, 15 November 1995 (1995-11-15), pages 239-244, XP002069782 ISSN: 0264-6021 the whole document	1-4, 6-18, 28
Y	---	5,19-27
	---	-/-
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. "E" earlier document or published or written prior art document. "L" document which may have been previously cited or which is cited to establish the priority date of a claim. "U" document relating to an oral disclosure, use, sale, or other information. "P" document published prior to the international filing date but after the priority date cited.		
Date of the actual completion of the international search: 3 July 2002		
Date of filing of the international search report: 23 10 2002		
Name and mailing address of the ISA: European Patent Office, P.O. Box 2911, Patentstr. 2, 8001 Zurich, Switzerland, Tel. (+41) 70 300 9000, Telex 31 051 epo ch, Fax (+41) 70 300 9000		
Authorized officer: VAN DER SCHAAAL C.A.		

* Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 01/23734

C: (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE MEDLINE [Online] June 2000 (2000-06) ZHOU Q ET AL: "Contortrostatin, a dimeric disintegrin from Agkistrodon contortrix contortrix, inhibits breast cancer progression." Database accession no. NLM19966001 XP002203869 abstract & BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT. NETHERLANDS JUN 2000, vol. 61, no. 3, June 2000 (2000-06), pages 249-260, ISSN: 0167-6806 the whole document	19-22
Y	NATH DEEPA ET AL: "Meltrin gamma (ADAM-9) mediates cellular adhesion through alpha5beta1 integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility." JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 113, no. 12, June 2000 (2000-06), pages 2319-2328, XP002203866 ISSN: 0021-9533 the whole document	5,22-27
A	KUNTZ I D ET AL: "STRUCTURE-BASED MOLECULAR DESIGN" ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 27, no. 5, May 1994 (1994-05), pages 117-123, XP000885741 ISSN: 0001-4842 the whole document	14,28
E	WO 01 94416 A (BURGESS CATHERINE ;MALYANKAR URIEL M (US); SPYTEK KIMBERLY A (US);) 13 December 2001 (2001-12-13) SEQ ID NO 10 claims	1-4, 6-13,15, 19-24
E	WO 01 83782 A (PLOWMAN GREGORY D ;PAYNE VILLIA (US); SUGEN INC (US); WHYTE DAVID () 8 November 2001 (2001-11-08) SEQ 52 claims	1-4,6-9, 15,16,18

Form PCT/ISA/2102 (cont. of sheet 1 of 1) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/23734
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 19-21-27 are (partially) directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. ☐ Claims Nos.: because they relate in parts to the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no MINIMUM International Search can be carried out, specifically:	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
see additional sheet	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.: see Invention 1. on extra sheet	
Remark on Protest	
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/US 01/23734

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims 1-28 partially

Polypeptides comprising SEQ ID NO 3 or 27, nucleic acids encoding the polypeptides, antibodies against them and their uses

Invention 2-23: Claims 1-28 partially

Polypeptides comprising SEQ ID NO 4, 6-25 or 26, nucleic acids encoding the polypeptides, antibodies against them and their uses.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No.
PCT/US 01/23734

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0194416	A	13-12-2001	AU WO	6681301 A 0194416 A2		17-12-2001 13-12-2001
WO 0183782	A	08-11-2001	AU WG	5947301 A 0183782 A2		12-11-2001 08-11-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 27/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 35/04	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 1 2 N 1/15	Z T D
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/06	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/48	Z
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/48	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	E
// C 1 2 P 21/08	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72)発明者 ドゥボーズ, ロバート・エフ

アメリカ合衆国ワシントン州98006, ベルヴァー, ワンハンドレッドアンドフィフティシックス・プレース・サウスイースト 6151

(72)発明者 ウィリー, スティーブン・アール

アメリカ合衆国ワシントン州98119, シアトル, イレブンス・アベニュー・ウエスト・ナンバー6 1511

(72)発明者 ブラック, ロイ・エイ

アメリカ合衆国ワシントン州98115, シアトル, サーティース・アベニュー・ノースイースト 8062

Fターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02 FB03 JA01

4B024 AA01 AA03 BA14 BA53 BA80 CA04 EA04 GA03 GA11 HA15

4B064 AG01 AG27 CA01 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01

4B065 AA19X AA26X AA46X AA72X AA73X AA80X AA90X AA91X AA93Y AA94X

AB01 AC14 BA02 BA08 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA21 BA22 BA23 CA25 DC50 NA14

ZA332 ZA362 ZA542 ZA892 ZA972 ZB112 ZB262 ZC022
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 DA89 EA20
FA72 FA73 FA74