

(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2009-504183

(P2009-504183A)

(43) 公表日 平成21年2月5日 (2009. 2. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 5
<b>C 1 2 N 5/10 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 5/00 B	4 B 0 2 4
<b>G 0 1 N 33/50 (2006. 01)</b>	G 0 1 N 33/50 Z	4 B 0 6 5
<b>G 0 1 N 33/15 (2006. 01)</b>	G 0 1 N 33/15 Z	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 45/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 585 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-526937 (P2008-526937)  
 (86) (22) 出願日 平成18年7月18日 (2006. 7. 18)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年4月8日 (2008. 4. 8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/027777  
 (87) 国際公開番号 W02007/021423  
 (87) 国際公開日 平成19年2月22日 (2007. 2. 22)  
 (31) 優先権主張番号 60/708, 312  
 (32) 優先日 平成17年8月15日 (2005. 8. 15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 596168317  
 ジェネンテック・インコーポレーテッド  
 GENENTECH, INC.  
 アメリカ合衆国カリフォルニア・9408  
 0-4990・サウス・サン・フランシス  
 コ・ディーエヌエー・ウェイ・1  
 (71) 出願人 506374476  
 レキシコン ファーマシューティカルズ,  
 インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 テキサス 77381,  
 ザ ウッドランズ, テクノロジー フ  
 オレスト プレイス 8800  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子破壊、それに関連する組成物および方法

## (57) 【要約】

本発明は、遺伝子機能の特徴づけに関するトランスジェニック動物ならびに組成物および方法に関する。具体的には、本発明により、種々の遺伝子の破壊が含まれているトランスジェニックマウスが提供される。このようなインビボにおける研究および特徴づけは、遺伝子破壊に関連する疾患または機能障害（例えば、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨の代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常）の予防、寛解または矯正に有用な治療薬および／または処置法の価値ある同定および発見を提供し得る。

MLPCASCLPQSLHALLMLLGLSSPQDSSEPOSTTCTDGYNDPDSQHRDVEECLET  
 FRACKSRKCIINTEGOTLCLPRALAVITLLESDPFPFVFAQHNDPCPGYBPQDSQCV  
 IYDSCQALSDCRPSQDCHLPGSTQCTCPGVKTPSCVDIDCKRYKQNRQVLLPGS  
 FKQCEPQQLGPNNSQVVDNRCDMAAPCQSCQPSGOTFLCRHQGYLHNDGFSQDI  
 DECSYSTLCQTRVNRGPFSCHPQSTQLATLQDI DECSGASQSGRAQCVNRG  
 QVACVDNRQVSTIQVNRSLCPASFLCRQPSIVRGVDTUSGRSVPAQVFQIQT  
 SVYGRAYDAEQTRAGSGQGTIRQLNVVRLVLARFVTPGPREYVLDLDAQVRLMGR  
 ASSVLELVFGATF

Signal sequence: Amino acids 1-25  
 N-glycosylation sites: Amino acids 198-202; 394-398  
 N-myristoylation sites: Amino acids  
 76-82; 145-151; 182-186;  
 222-228; 290-296; 305-311; 371-377;  
 381-387  
 Aspartic acid and asparagine hydroxylation sites:  
 140-152; 177-189; 217-229; 258-270

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型を同定する方法であって、本方法は、

(a) PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子が破壊されたゲノムを有する非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

(b) 該非ヒトトランスジェニック動物の生理学的特徴を測定する工程；および

(c) 該測定された生理学的特徴を性別一致野生型動物の生理学的特徴と比較する工程を含み、

ここで、該野生型動物の該生理学的特徴と異なる該非ヒトトランスジェニック動物の該生理学的特徴を、該非ヒトトランスジェニック動物における該遺伝子の破壊から生じる表現型と同定する、方法。

## 【請求項 2】

前記非ヒトトランスジェニック動物が、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊についてヘテロ接合性である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

性別一致野生型同腹仔と比較した場合の前記非ヒトトランスジェニック動物によって示される前記表現型が、以下：神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異

10

20

30

40

50

常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常のうちの少なくとも1つである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である、請求項3に記載の方法。

【請求項6】

前記神経障害が、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである、請求項3に記載の方法。

10

【請求項7】

前記神経障害が、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である、請求項3に記載の方法。

【請求項8】

前記神経障害が、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である、請求項3に記載の方法。

【請求項9】

前記神経障害が、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏または感覚障害である、請求項3に記載の方法。

20

【請求項10】

前記眼の異常が、網膜の異常である、請求項3に記載の方法。

【請求項11】

前記眼の異常が、視覚問題または失明と一致する、請求項3に記載の方法。

【請求項12】

前記網膜の異常が、網膜色素変性症と一致する、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

前記網膜の異常が、網膜変性症または網膜の形成異常を特徴とする、請求項10に記載の方法。

30

【請求項14】

前記網膜の異常が、網膜の形成異常、未熟児網膜症を含む様々な網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜/脈絡膜血管新生、隅角血管新生（ルベオシス）、眼球の血管新生性疾患、血管再狭窄、動静脈奇形（AVM）、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺肥大（グレーブス病を含む）、角膜および他の組織の移植、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖；網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイデレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ・マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー・ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケーン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症（*dysplasia spondyloepiphyseal congenita*）、フリン・エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス・シェンベルク病（*Albers-Schönberg disease*）、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンブルグ症候群、アラジール症候群（*Alagille syndrome*）、筋緊張性ジストロフィー、オリブ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群（*Pierre-Marie disease*）、スティックラー症候群、カロチン血症（*carotinemia*）、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、バッセン・コルンツヴァイク症候群、無リボタンパク質血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症また

40

50

はマンノシドーシスと一致する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

前記眼の異常が、白内障である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 16】

前記白内障が、全身性疾患（例えば、ヒトダウン症候群、ハレルマン - ストレフ症候群（Hallerman - Streiff syndrome）、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー（Trisomy）13 - 15、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症（hypoparathyroidism）またはコンラーディ症候群）と一致する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記発達異常が、胚性致死または生存能低下を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 18】

前記心臓血管、内皮または血管形成の障害が、動脈疾患（例えば、真性糖尿病；乳頭浮腫；視神経萎縮；アテローム性動脈硬化症；アングナ；急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大および鬱血性心不全などの心不全；高血圧症；炎症性血管炎；レイノー病およびレイノー現象；動脈瘤ならびに動脈再狭窄）；静脈およびリンパの障害（例えば、血栓静脈炎、リンパ管炎およびリンパ浮腫）；末梢血管疾患；癌（例えば、血管腫瘍、例えば、血管腫（毛細管および海綿状）、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮腫、カボジ肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫）；腫瘍血管新生；外傷（例えば、創傷、熱傷および他の組織の傷害）、移植片固定、瘢痕；虚血再灌流傷害；関節リウマチ；脳血管疾患；急性腎不全などの腎疾患または骨粗鬆症である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 19】

前記免疫障害が、全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus）；関節リウマチ；若年性慢性関節炎；脊椎関節症；全身硬化症（強皮症）；特発性炎症性筋障害（皮膚筋炎、多発性筋炎）；シェーグレン症候群；全身性血管炎；サルコイドーシス；自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症）；自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症）；甲状腺炎（グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）；真性糖尿病；免疫媒介性腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）；中枢および末梢神経系の脱髄疾患（例えば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー）；肝胆疾患（例えば、感染性肝炎（A 型、B 型、C 型、D 型、E 型肝炎および他の非肝向性（non-hepatotropic）のウイルスによる肝炎）、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎）；炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎；クローン病）；グルテン過敏性腸症およびホイップル病；水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬；アレルギー性疾患（例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹）；肺の免疫学的疾患（例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎）；または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 20】

前記骨代謝の異常または障害が、関節炎、骨粗鬆症または大理石骨病である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 21】

前記非ヒトトランスジェニック動物が、性別一致野生型同腹仔と比較して、以下の生理学的特徴：

オープンフィールド試験中の不安様応答の増大；オープンフィールド試験中の不安の低減；オープンフィールド試験中の自発運動活性の低下；ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム（明期中の活性の低下）；歩行回数の減少を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；概日リズムを有しない機能低下；歩行回数の増加を含むホームケージ

10

20

30

40

50

活動性試験中の異常な概日リズム；ストレス誘導性高体温の増大；ストレス誘導性高体温の低下；反転スクリーン試験中の運動協調性の低下；尾懸垂における不動の増加（抑鬱様応答の増大）；尾懸垂試験中の抑鬱様応答の増大；尾懸垂試験中の不動性の増大または抑鬱様応答の減少；プレパルス抑制試験中の驚愕応答の低下；難聴を示唆する無驚愕応答；もしくは難聴；感覚運動ゲーティング／注意の低下を伴うプレパルス抑制の低下；ホットプレート試験における反応性の低下；ホットプレート試験における反応までの時間の減少；眼科学的異常；平均動静脈比の増大；瞳孔拡大薬である塩酸シクロペントレートに対する抵抗性；細目；白斑を伴う細目；白内障；網膜変性症；視力障害；基礎体温の低下；心拍数の減少；平均収縮期血圧の上昇；インスリン感度の増大；平均絶食時血清中グルコースレベルの上昇；平均血清中グルコースレベルの低下；平均血清中コレステロールレベルの上昇；平均血清中コレステロールレベルの低下；平均血清中トリグリセリドレベルの上昇；平均血清中トリグリセリドレベルの低下；耐糖能の増大；耐糖能障害；平均血清中インスリンレベルの低下；平均血清中カルシウムの上昇；ウロビリノーゲンの上昇、顕著な脂肪血；アルブミン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、リン、およびカリウムレベルの上昇；平均血清中アルカリホスファターゼレベルの上昇；血中尿素窒素の上昇；顆粒球の割合の増大；全白血球（WBC）数の増加；平均絶対好中球数の増大；好中球減少症；絶対リンパ球数の増加；絶対単球数の増加；脾臓中の単球およびDC（CD11b<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>c<sup>+</sup>）の増加；平均血小板数の増加；リンパ節中のナチュラルキラー（NK）細胞の上昇；好中球数の減少；ナチュラルキラー（NK）細胞の減少；平均赤血球（RBC）数、ヘモグロビン濃度、およびヘマトクリットの減少；平均の赤血球分布幅の増大；平均小体容積および平均小体へのグロビンの減少；平均血小板数の減少および血小板の容積の増大；リンパ節中のB細胞数の増加；パイアー斑におけるB細胞のサブタイプの増加；リンパ節中のB細胞のパーセンテージの上昇；CD25<sup>+</sup>細胞の増加；胸腺DNの増加、DP<sup>+</sup>T細胞の減少；リンパ節中のCD19<sup>+</sup>細胞の増加；骨髓細胞中のCD117の増加；CD4細胞の平均パーセンテージの上昇；CD8細胞の増加およびB細胞中での減少；腹腔洗浄におけるCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>LowCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>LowおよびCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの低下；骨髓中のB220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；脾臓中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞の増加；CD4およびCD8細胞のCD62hi、CD44intサブセットの増加；末梢CD117細胞の増加；パイアー斑中のTcRbeta<sup>+</sup>/CD38の増加、胸腺中のTcRbeta<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；リンパ節中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>HiCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>MedCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；脾臓中のCD62L<sup>+</sup>HiCD44<sup>+</sup>DimCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの低下；リンパ節および脾臓中のCD4およびCD8細胞の平均パーセンテージの低下；メモリーT細胞の増加（CD62L<sup>+</sup>loCD44<sup>+</sup>hiの増加）；T細胞：B細胞比の低下；ナイーブT細胞の減少；腹腔洗浄中のCD117細胞の減少；CD8細胞の平均パーセンテージの低下、卵白アルブミン負荷に対するIgG1応答の増大；卵白アルブミン負荷に対するIgG2a応答の増大；LPS負荷に対する平均血清IL-6応答の増大；LPS負荷に対するTNF $\alpha$ 応答の増大；LPS負荷に対する血清MCP-1応答の増大；平均血清中IgMレベルの増大；血清IgAの増加；平均血清IgG1の増大；平均血清IgG3の増大；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG1応答の低下；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG2a応答の低下；平均血清IgAレベルの低下；血清IgG2aレベルの低下；血清IgG3レベルの低下；皮膚線維芽細胞増殖速度の増大；皮膚線維芽細胞増殖速度の低下；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの増加；平均体重の増加；平均体長の増大；総組織質量（TTM）の増加；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の増加；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性

10

20

30

40

50

密度の増加；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの減少；平均体重の減少；平均体長の低減；総組織質量（TTM）の減少；除脂肪体重（LBM）の減少；大腿骨の骨塩密度（BMD）の減少；椎骨の骨塩密度（BMD）の減少；全身、大腿、および脊椎の骨塩密度（BMD）の減少；骨塩量（BMC）の減少；骨塩密度指標の減少；体積測定による骨塩密度（vBMD）の減少；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の減少；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の減少；大理石骨病；骨粗鬆症；様々な組織における慢性炎症；両側水腎症（中程度から重症）および炎症；「洋ナシ型の腹部」、左右対称に腫大した腎臓（多嚢胞性の腎疾患を示唆する）；コルチ器官の変性；肝細胞機能不全障害；胆道閉塞；組織球の浸潤を特徴とする肝脾腫大症；小腸、リンパ節、および脾臓中の組織球増殖症；脾腫、リンパ節腫脹症、およびリンパ節腫脹症；咽頭扁桃腺および扁桃腺の過形成；軽度～中程度の過剰な延髄造血；ホモ接合性マウスは小さく、乾燥しており、そして少ない皮下脂肪の蓄積を示す；脂肪欠乏症；潰瘍性大腸炎；基底膜上の内蝸牛有毛細胞および外蝸牛有毛細胞細胞の両方の完全な欠失を特徴とする、内耳の感覚蝸牛有毛細胞のびまん性の顕著な変性；胃粘膜過形成および慢性的な炎症；胃重量の増加；精巣の精子形成障害；精巣上体の精液過少症および精子欠損；男性不妊症；リソソーム蓄積症；貧血；成長遅延；生存能力の低下；リンパ球の減少および脂肪欠乏症を伴う周産期致死性；ホモ接合性胚性致死；ならびにヘテロ接合性胚性致死のうちの少なくとも1つを示す、請求項1に記載の方法。

10

#### 【請求項22】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子が破壊されたゲノムを有する非ヒトトランスジェニック動物由来の単離細胞。

20

30

#### 【請求項23】

マウス細胞である、請求項22に記載の単離細胞。

#### 【請求項24】

前記マウス細胞が、胚性幹細胞である、請求項23に記載の単離細胞。

#### 【請求項25】

性別一致野生型同腹仔と比較して、前記非ヒトトランスジェニック動物が以下の表現型：神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常のうちの少なくとも1つを示す、請求項22に記載の単離細胞。

40

#### 【請求項26】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO101

50

96、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型を調節する薬剤を同定する方法であって、該方法は：

(a) PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子が破壊されたゲノムを有する非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

(b) (a) の非ヒトトランスジェニック動物の生理学的特徴を測定する工程；

(c) (b) の測定された生理学的特徴を性別一致野生型動物の生理学的特徴と比較する工程であって、ここで、該野生型動物の該生理学的特徴と異なる該非ヒトトランスジェニック動物の該生理学的特徴を、該非ヒトトランスジェニック動物における該遺伝子の破壊から生じる表現型と同定する、工程；

(d) (a) の非ヒトトランスジェニック動物に試験薬剤を投与する工程；および

(e) 該試験薬剤が、該非ヒトトランスジェニック動物における遺伝子破壊と関連する該同定された表現型を調節するか否かを判定する工程を含む、方法。

【請求項 27】

前記遺伝子破壊と関連する前記表現型が、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常または障害；脂質代謝障害；または発達異常を含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

前記神経障害が、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 31】

前記神経障害が、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 32】

前記神経障害が、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 33】

前記神経障害が、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏または感覚障害である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 34】

前記眼の異常が、網膜の異常である、請求項 27 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 35】

前記眼の異常が、視覚問題または失明と一致する、請求項 27 に記載の方法。

## 【請求項 36】

前記網膜の異常が、網膜色素変性症と一致する、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 37】

前記網膜の異常が、網膜変性症または網膜の形成異常を特徴とする、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 38】

前記網膜の異常が、網膜の形成異常、未熟児網膜症を含む様々な網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜/脈絡膜血管新生、隅角血管新生（ルベオース）、眼球の血管新生性疾患、血管再狭窄、動静脈奇形（A V M）、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺肥大（グレーブス病を含む）、角膜および他の組織の移植、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖；網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイデレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ - マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー - ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケーン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症、フリン - エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス - シェーンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンプルグ症候群、アラジール症候群、筋緊張性ジストロフィー、オリブ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、パッセン - コルンツヴァイク症候群、無リボタンパク質血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症またはマンノシドーシスと一致する、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 39】

前記眼の異常が、白内障である、請求項 27 に記載の方法。

## 【請求項 40】

前記白内障が、全身性疾患（例えば、ヒトダウン症候群、ハレルマン - ストレフ症候群、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー 13 - 15、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症またはコンラディ症候群）と一致する、請求項 39 に記載の方法。

## 【請求項 41】

前記発達異常が、胚性致死または生存能低下を含む、請求項 27 に記載の方法。

## 【請求項 42】

前記心臓血管、内皮または血管形成の障害が、動脈疾患（例えば、真性糖尿病；乳頭浮腫；視神経萎縮；アテローム性動脈硬化症；アングナ；急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大および鬱血性心不全などの心不全；高血圧症；炎症性血管炎；レイノー病およびレイノー現象；動脈瘤ならびに動脈再狭窄）；静脈およびリンパの障害（例えば、血栓性静脈炎、リンパ管炎およびリンパ浮腫）；末梢血管疾患；癌（例えば、血管腫瘍、例えば、血管腫（毛細管および海綿状）、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮腫、カポジ肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫）；腫瘍血管新生；外傷（例えば、創傷、熱傷および他の組織の傷害）、移植片固定、瘢痕；虚血再灌流傷害；関節リウマチ；脳血管疾患；急性腎不全などの腎疾患または骨粗鬆症である、請求項 27 に記載の方法。

## 【請求項 43】

前記免疫障害が、全身性エリテマトーデス；関節リウマチ；若年性慢性関節炎；脊椎関節症；全身硬化症（強皮症）；特発性炎症性筋障害（皮膚筋炎、多発性筋炎）；シェーグレン症候群；全身性血管炎；サルコイドーシス；自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症）；自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、

10

20

30

40

50



免疫媒介性血小板減少症)；甲状腺炎(グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎)；真性糖尿病；免疫媒介性腎疾患(糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎)；中枢および末梢神経系の脱髄疾患(例えば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー)；肝胆疾患(例えば、感染性肝炎(A型、B型、C型、D型、E型肝炎および他の非肝向性のウイルスによる肝炎)、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎)；炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎：クローン病)；グルテン過敏性腸症およびホイップル病；水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬；アレルギー性疾患(例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹)；肺の免疫学的疾患(例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎)；または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患である、請求項27に記載の方法。

10

#### 【請求項44】

前記骨代謝の異常または障害が、関節炎、骨粗鬆症または大理石骨病である、請求項27に記載の方法。

#### 【請求項45】

前記非ヒトトランスジェニック動物が、性別一致野生型同腹仔と比較して、以下の生理学的特徴：

オープンフィールド試験中の不安様応答の増大；オープンフィールド試験中の不安の低減；オープンフィールド試験中の自発運動活性の低下；ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム(明期中の活性の低下)；歩行回数の減少を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；概日リズムを有しない機能低下；歩行回数の増加を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；ストレス誘導性高体温の増大；ストレス誘導性高体温の低下；反転スクリーン試験中の運動協調性の低下；尾懸垂における不動の増加(抑鬱様応答の増大)；尾懸垂試験中の抑鬱様応答の増大；尾懸垂試験中の不動性の増大または抑鬱様応答の減少；プレパルス抑制試験中の驚愕応答の低下；難聴を示唆する無驚愕応答；もしくは難聴；感覚運動ゲーティング/注意の低下を伴うプレパルス抑制の低下；ホットプレート試験における反応性の低下；ホットプレート試験における反応までの時間の減少；眼科学的異常；平均動静脈比の増大；瞳孔拡大薬である塩酸シクロペントレートに対する抵抗性；細目；白斑を伴う細目；白内障；網膜変性症；視力障害；基礎体温の低下；心拍数の減少；平均収縮期血圧の上昇；インスリン感度の増大；平均絶食時血清中グルコースレベルの上昇；平均血清中グルコースレベルの低下；平均血清中コレステロールレベルの上昇；平均血清中コレステロールレベルの低下；平均血清中トリグリセリドレベルの上昇；平均血清中トリグリセリドレベルの低下；耐糖能の増大；耐糖能障害；平均血清中インスリンレベルの低下；平均血清中カルシウムの上昇；ウロビリノーゲンの上昇、顕著な脂肪血；アルブミン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、リン、およびカリウムレベルの上昇；平均血清中アルカリホスファターゼレベルの上昇；血中尿素窒素の上昇；顆粒球の割合の増大；全白血球(WBC)数の増加；平均絶対好中球数の増大；好中球減少症；絶対リンパ球数の増加；絶対単球数の増加；脾臓中の単球およびDC(CD11b<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>c<sup>+</sup>)の増加；平均血小板数の増加；リンパ節中のナチュラルキラー(NK)細胞の上昇；好中球数の減少；ナチュラルキラー(NK)細胞の減少；平均赤血球(RBC)数、ヘモグロビン濃度、およびヘマトクリットの減少；平均の赤血球分布幅の増大；平均小体容積および平均小体へのグロビンの減少；平均血小板数の減少および血小板の容積の増大；リンパ節中のB細胞数の増加；パイアー斑におけるB細胞のサブタイプの増加；リンパ節中のB細胞のパーセンテージの上昇；CD25<sup>+</sup>細胞の増加；胸腺DNの増加、DP<sup>+</sup>T細胞の減少；リンパ節中のCD19<sup>+</sup>細胞の増加；骨髓細胞中のCD117の増加；CD4細胞の平均パーセンテージの上昇；CD8細胞の増加およびB細胞中での減少；腹腔洗浄におけるCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>LowCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>LowおよびCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD1

20

30

40

50

1 b H i 細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中の B 2 2 0 + C D 1 1 b - C D 2 3 + 細胞のパーセンテージの低下；骨髓中の B 2 2 0 - C D 4 3 H i 細胞のパーセンテージの上昇；脾臓中の C D 1 1 b + C D 1 1 c - 細胞の増加；C D 4 および C D 8 細胞の C D 6 2 h i、C D 4 4 i n t サブセットの増加；末梢 C D 1 1 7 細胞の増加；パイアー斑の中の T c R b e t a / C D 3 8 の増加、胸腺中の T c R b e t a + 細胞のパーセンテージの上昇；リンパ節中の C D 1 1 b + C D 1 1 c + のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中の B 2 2 0 + H i C D 2 3 + 細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中の B 2 2 0 + M e d C D 2 3 - 細胞のパーセンテージの低下；脾臓中の C D 6 2 L H i C D 4 4 D i m C D 4 + および C D 8 + 細胞のパーセンテージの低下；B 2 2 0 - C D 1 1 b H i 細胞のパーセンテージの低下；リンパ節および脾臓中の C D 4 および C D 8 細胞の平均パーセンテージの低下；メモリー T 細胞の増加（C D 6 2 L l o C D 4 4 h i の増加）；T 細胞：B 細胞比の低下；ナイーブ T 細胞の減少；腹腔洗浄中の C D 1 1 7 細胞の減少；C D 8 細胞の平均パーセンテージの低下、卵白アルブミン負荷に対する I g G 1 応答の増大；卵白アルブミン負荷に対する I g G 2 a 応答の増大；L P S 負荷に対する平均血清 I L - 6 応答の増大；L P S 負荷に対する T N F 応答の増大；L P S 負荷に対する血清 M C P - 1 応答の増大；平均血清中 I g M レベルの増大；血清 I g A の増加；平均血清 I g G 1 の増大；平均血清 I g G 3 の増大；卵白アルブミン負荷に対する血清 I g G 1 応答の低下；卵白アルブミン負荷に対する血清 I g G 2 a 応答の低下；平均血清 I g A レベルの低下；血清 I g G 2 a レベルの低下；血清 I g G 3 レベルの低下；皮膚線維芽細胞増殖速度の増大；皮膚線維芽細胞増殖速度の低下；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの増加；平均体重の増加；平均体長の増大；総組織質量（T T M）の増加；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の増加；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の増加；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの減少；平均体重の減少；平均体長の低減；総組織質量（T T M）の減少；除脂肪体重（L B M）の減少；大腿骨の骨塩密度（B M D）の減少；椎骨の骨塩密度（B M D）の減少；全身、大腿、および脊椎の骨塩密度（B M D）の減少；骨塩量（B M C）の減少；骨塩密度指標の減少；体積測定による骨塩密度（v B M D）の減少；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の減少；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の減少；大理石骨病；骨粗鬆症；様々な組織における慢性炎症；両側水腎症（中程度から重症）および炎症；「洋ナシ型の腹部」、左右対称に腫大した腎臓（多嚢胞性の腎疾患を示唆する）；コルチ器官の変性；肝細胞機能不全障害；胆道閉塞；組織球の浸潤を特徴とする肝脾腫大症；小腸、リンパ節、および脾臓中の組織球増殖症；脾腫、リンパ節腫脹症、およびリンパ節腫脹症；咽頭扁桃腺および扁桃腺の過形成；軽度～中程度の過剰な延髄造血；ホモ接合性マウスは小さく、乾燥しており、そして少ない皮下脂肪の蓄積を示す；脂肪欠乏症；潰瘍性大腸炎；基底膜上の内蝸牛有毛細胞および外蝸牛有毛細胞細胞の両方の完全な欠失を特徴とする、内耳の感覚蝸牛有毛細胞のびまん性の顕著な変性；胃粘膜過形成および慢性的な炎症；胃重量の増加；精巢の精子形成障害；精巢上体の精液過少症および精子欠損；男性不妊症；リソソーム蓄積症；貧血；成長遅延；生存能力の低下；リンパ球の減少および脂肪欠乏症を伴う周産期致死性；ホモ接合性胚性致死；ならびにヘテロ接合性胚性致死のうちの少なくとも1つを示す、

請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 4 6】

請求項 2 6 に記載の方法によって同定された、薬剤。

【請求項 4 7】

PRO 2 2 6、PRO 2 5 7、PRO 2 6 8、PRO 2 9 0、PRO 3 6 0 0 6、PRO 3 6 3、PRO 3 6 5、PRO 3 8 2、PRO 4 4 4、PRO 7 0 5、PRO 1 0 7 1、PRO 1 1 2 5、PRO 1 1 3 4、PRO 1 1 5 5、PRO 1 2 8 1、PRO 1 3 4 3、PRO 1 3 7 9、PRO 1 3 8 0、PRO 1 3 8 7、PRO 1 4 1 9、PRO 1 4 3 3、PRO 1 4 7 4、PRO 1 5 5 0、PRO 1 5 7 1、PRO 1 5 7 2、PRO 1 7 5 9、PRO 1 9 0 4、PRO 3 5 1 9 3、PRO 4 3 4 1、PRO 4 3 4 8、PRO 4 3 6

9、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項46に記載の薬剤。

【請求項48】

前記アゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である、請求項47に記載の薬剤。

10

20

【請求項49】

前記アンタゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である、請求項47に記載の薬剤。

30

【請求項50】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する生理学的特徴を調節する薬剤を同定する方法であって、該方法は：

40

(a) PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO10

50

71、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子が破壊されたゲノムを有する非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

(b)(a)の非ヒトトランスジェニック動物によって示される生理学的特徴を測定する工程；

(c)(b)の測定された生理学的特徴を性別一致野生型動物の生理学的特徴と比較する工程であって、ここで、該野生型動物によって示される該生理学的特徴と異なる該非ヒトトランスジェニック動物によって示される該生理学的特徴を、遺伝子の破壊に関連する生理学的特徴と同定する、工程；

(d)(a)の非ヒトトランスジェニック動物に試験薬剤を投与する工程；および

(e)遺伝子破壊と関連する該生理学的特徴が調節されているか否かを判定する工程を含む、方法。

#### 【請求項51】

前記非ヒトトランスジェニック動物が、性別一致野生型同腹仔と比較して、以下の生理学的特徴；

オープンフィールド試験中の不安様応答の増大；オープンフィールド試験中の不安の低減；オープンフィールド試験中の自発運動活性の低下；ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム（明期中の活性の低下）；歩行回数の減少を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；概日リズムを有しない機能低下；歩行回数の増加を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；ストレス誘導性高体温の増大；ストレス誘導性高体温の低下；反転スクリーン試験中の運動協調性の低下；尾懸垂における不動の増加（抑鬱様応答の増大）；尾懸垂試験中の抑鬱様応答の増大；尾懸垂試験中の不動性の増大または抑鬱様応答の減少；プレパルス抑制試験中の驚愕応答の低下；難聴を示唆する無驚愕応答；もしくは難聴；感覚運動ゲーティング／注意の低下を伴うプレパルス抑制の低下；ホットプレート試験における反応性の低下；ホットプレート試験における反応までの時間の減少；眼科学的異常；平均動静脈比の増大；瞳孔拡大薬である塩酸シクロペントレートに対する抵抗性；細目；白斑を伴う細目；白内障；網膜変性症；視力障害；基礎体温の低下；心拍数の減少；平均収縮期血圧の上昇；インスリン感度の増大；平均絶食時血清中グルコースレベルの上昇；平均血清中グルコースレベルの低下；平均血清中コレステロールレベルの上昇；平均血清中コレステロールレベルの低下；平均血清中トリグリセリドレベルの上昇；平均血清中トリグリセリドレベルの低下；耐糖能の増大；耐糖能障害；平均血清中インスリンレベルの低下；平均血清中カルシウムの上昇；ウロビリノーゲンの上昇、顕著な脂肪血；アルブミン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、リン、およびカリウムレベルの上昇；平均血清中アルカリホスファターゼレベルの上昇；血中尿素窒素の上昇；顆粒球の割合の増大；全白血球（WBC）数の増加；平均絶対好中球数の増大；好中球減少症；絶対リンパ球数の増加；絶対単球数の増加；脾臓中の単球およびDC（CD11b<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>c<sup>+</sup>）の増加；平均血小板数の増加；リンパ節中のナチュラルキラー（NK）細胞の上昇；好中球数の減少；ナチュラルキラー（NK）細胞の減少；平均赤血球（RBC）数、ヘモグロビン濃度、およびヘマトクリットの減少；平均の赤血球分布幅の増大；平均小体容積および平均小体へのグロビンの減少；平均血小板数の減少および血小板の容積の増大；リンパ節中のB細胞数の増加；パイアー斑におけるB細胞のサブタイプの増加；リンパ節中のB細胞のパーセンテージの上昇；CD25<sup>+</sup>細胞の増加；胸腺DNの増加

10

20

30

40

50

、D P T細胞の減少；リンパ節中のC D 1 9 + 細胞の増加；骨髓細胞中のC D 1 1 7 の増加；C D 4 細胞の平均パーセンテージの上昇；C D 8 細胞の増加およびB細胞中での減少；腹腔洗浄におけるC D 1 1 b + 細胞のパーセンテージの上昇；B 2 2 0 + C D 1 1 b L o w C D 2 3 - 細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB 2 2 0 - C D 1 1 L o w およびC D 1 1 b - 細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB 2 2 0 - C D 1 1 b H i 細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB 2 2 0 + C D 1 1 b - C D 2 3 + 細胞のパーセンテージの低下；骨髓中のB 2 2 0 - C D 4 3 H i 細胞のパーセンテージの上昇；脾臓中のC D 1 1 b + C D 1 1 c - 細胞の増加；C D 4 およびC D 8 細胞のC D 6 2 h i、C D 4 4 i n t サブセットの増加；末梢C D 1 1 7 細胞の増加；パイアー斑の中のT c R b e t a / C D 3 8 の増加、胸腺中のT c R b e t a + 細胞のパーセンテージの上昇；リンパ節中のC D 1 1 b + C D 1 1 c + のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB 2 2 0 + H i C D 2 3 + 細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB 2 2 0 + M e d C D 2 3 - 細胞のパーセンテージの低下；脾臓中のC D 6 2 L H i C D 4 4 D i m C D 4 + およびC D 8 + 細胞のパーセンテージの低下；B 2 2 0 - C D 1 1 b H i 細胞のパーセンテージの低下；リンパ節および脾臓中のC D 4 およびC D 8 細胞の平均パーセンテージの低下；メモリーT細胞の増加（C D 6 2 L l o C D 4 4 h i の増加）；T細胞：B細胞比の低下；ナイーブT細胞の減少；腹腔洗浄中のC D 1 1 7 細胞の減少；C D 8 細胞の平均パーセンテージの低下、卵白アルブミン負荷に対するI g G 1 応答の増大；卵白アルブミン負荷に対するI g G 2 a 応答の増大；L P S 負荷に対する平均血清I L - 6 応答の増大；L P S 負荷に対するT N F 応答の増大；L P S 負荷に対する血清M C P - 1 応答の増大；平均血清中I g M レベルの増大；血清I g A の増加；平均血清I g G 1 の増大；平均血清I g G 3 の増大；卵白アルブミン負荷に対する血清I g G 1 応答の低下；卵白アルブミン負荷に対する血清I g G 2 a 応答の低下；平均血清I g A レベルの低下；血清I g G 2 a レベルの低下；血清I g G 3 レベルの低下；皮膚線維芽細胞増殖速度の増大；皮膚線維芽細胞増殖速度の低下；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの増加；平均体重の増加；平均体長の増大；総組織質量（T T M）の増加；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の増加；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の増加；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの減少；平均体重の減少；平均体長の低減；総組織質量（T T M）の減少；除脂肪体重（L B M）の減少；大腿骨の骨塩密度（B M D）の減少；椎骨の骨塩密度（B M D）の減少；全身、大腿、および脊椎の骨塩密度（B M D）の減少；骨塩量（B M C）の減少；骨塩密度指標の減少；体積測定による骨塩密度（v B M D）の減少；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の減少；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の減少；大理石骨病；骨粗鬆症；様々な組織における慢性炎症；両側水腎症（中程度から重症）および炎症；「洋ナシ型の腹部」、左右対称に腫大した腎臓（多嚢胞性の腎疾患を示唆する）；コルチ器官の変性；肝細胞機能不全障害；胆道閉塞；組織球の浸潤を特徴とする肝脾腫大症；小腸、リンパ節、および脾臓中の組織球増殖症；脾腫、リンパ節腫脹症、およびリンパ節腫脹症；咽頭扁桃腺および扁桃腺の過形成；軽度～中程度の過剰な延髄造血；ホモ接合性マウスは小さく、乾燥しており、そして少ない皮下脂肪の蓄積を示す；脂肪欠乏症；潰瘍性大腸炎；基底膜上の内蝸牛有毛細胞および外蝸牛有毛細胞細胞の両方の完全な欠失を特徴とする、内耳の感覚蝸牛有毛細胞のびまん性の顕著な変性；胃粘膜過形成および慢性的な炎症；胃重量の増加；精巣の精子形成障害；精巣上体の精液過少症および精子欠損；男性不妊症；リソソーム蓄積症；貧血；成長遅延；生存能力の低下；リンパ球の減少および脂肪欠乏症を伴う周産期致死性；ホモ接合性胚性致死；ならびにヘテロ接合性胚性致死のうちの少なくとも1つを示す、請求項50に記載の方法。

#### 【請求項52】

請求項50に記載の方法によって同定された、薬剤。

#### 【請求項53】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071

10

20

30

40

50

、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343  
、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433  
、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759  
、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO436  
9、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO498  
9、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO717  
4、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO101  
96、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、P  
RO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項52に記載の薬剤。

10

**【請求項54】**

前記アゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である、請求項53に記載の薬剤。

20

**【請求項55】**

前記アンタゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である、請求項53に記載の薬剤。

30

**【請求項56】**

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードす

40

50

る遺伝子の破壊に関連する行動を調節する薬剤を同定する方法であって、該方法は：

(a) PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子が破壊されたゲノムを有する非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

(b) (a) の非ヒトトランスジェニック動物によって示される行動を観察する工程；

(c) (b) の観察された行動を性別一致野生型動物の行動と比較する工程であって、ここで、該野生型動物によって示される該観察された行動と異なる、該非ヒトトランスジェニック動物によって示される該観察された行動を、遺伝子の破壊に関連する行動と同定する、工程；

(d) (a) の非ヒトトランスジェニック動物に試験薬剤を投与する工程；および

(e) 該薬剤が、遺伝子破壊と関連する該行動を調節するか否かを判定する工程を含む、方法。

#### 【請求項57】

前記行動が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である、請求項56に記載の方法。

#### 【請求項58】

前記行動が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である、請求項56に記載の方法。

#### 【請求項59】

前記行動が、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである、請求項56に記載の方法。

#### 【請求項60】

前記行動が、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である、請求項56に記載の方法。

#### 【請求項61】

前記行動が、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である、請求項56に記載の方法。

#### 【請求項62】

前記行動が、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏または感覚障害である、請求項56に記載の方法。

#### 【請求項63】

請求項56に記載の方法によって同定された、薬剤。

#### 【請求項64】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO436

10

20

30

40

50

9、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項63に記載の薬剤。

【請求項65】

前記アゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である、請求項64に記載の薬剤。

10

20

【請求項66】

抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である、請求項64に記載の薬剤。

30

【請求項67】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常を寛解または調節する薬剤を同定する方法であって、該方法は：

40

(a) PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、

50



PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子が破壊されたゲノムを有する非ヒトランスジェニック動物を提供する工程；

(b) 該非ヒトランスジェニック動物に試験薬剤を投与する工程；および

(c) 該試験薬剤が、該非ヒトランスジェニック動物において、該神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常を寛解または調節するか否かを判定する工程を含む、方法。

【請求項68】

前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である、請求項67に記載の方法。

【請求項70】

前記神経障害が、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである、請求項67に記載の方法。

【請求項71】

前記神経障害が、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である、請求項67に記載の方法。

【請求項72】

前記神経障害が、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である、請求項67に記載の方法。

【請求項73】

前記神経障害が、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏または感覚障害である、請求項67に記載の方法。

【請求項74】

前記眼の異常が、網膜の異常である、請求項67に記載の方法。

【請求項75】

前記眼の異常が、視覚問題または失明と一致する、請求項67に記載の方法。

【請求項76】

前記網膜の異常が、網膜色素変性症と一致する、請求項74に記載の方法。

【請求項77】

前記網膜の異常が、網膜変性症または網膜の形成異常を特徴とする、請求項74に記載の方法。

【請求項78】

前記網膜の異常が、網膜の形成異常、未熟児網膜症を含む様々な網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜/脈絡膜血管新生、隅角血管新生(ルベオース)、眼球の血管新生性疾患、血管再狭窄、動静脈奇形(AVM)、髄膜腫、血管腫、血管線維

10

20

30

40

50

腫、甲状腺肥大（グレーブス病を含む）、角膜および他の組織の移植、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖；網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイデレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ - マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー - ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケーン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症、フリン - エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス - シェーンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンブルグ症候群、アラジール症候群、筋緊張性ジストロフィー、オリープ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、バッセン - コルンツヴァイク症候群、無リボタンパク質血症、色素失調症、パッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症またはマンノシドーシスと一致する、請求項 7 4 に記載の方法。

10

【請求項 7 9】

前記眼の異常が、白内障である、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記白内障が、全身性疾患（例えば、ヒトダウン症候群、ハレルマン - ストレフ症候群、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー 1 3 - 1 5、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症またはコンラディ症候群）である、請求項 7 9 に記載の方法。

20

【請求項 8 1】

前記発達異常が、胚性致死または生存能低下を含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記心臓血管、内皮または血管形成の障害が、動脈疾患（例えば、真性糖尿病；乳頭浮腫；視神経萎縮；アテローム性動脈硬化症；アンギナ；急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大および鬱血性心不全などの心不全；高血圧症；炎症性血管炎；レイノー病およびレイノー現象；動脈瘤ならびに動脈再狭窄）；静脈およびリンパの障害（例えば、血栓性静脈炎、リンパ管炎およびリンパ浮腫）；末梢血管疾患；癌（例えば、血管腫瘍、例えば、血管腫（毛細管および海綿状）、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮腫、カポジ肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫）；腫瘍血管新生；外傷（例えば、創傷、熱傷および他の組織の傷害）、移植片固定、瘢痕；虚血再灌流傷害；関節リウマチ；脳血管疾患；急性腎不全などの腎疾患または骨粗鬆症である、請求項 6 7 に記載の方法。

30

【請求項 8 3】

前記免疫障害が、全身性エリテマトーデス；関節リウマチ；若年性慢性関節炎；脊椎関節症；全身硬化症（強皮症）；特発性炎症性筋障害（皮膚筋炎、多発性筋炎）；シェーグレン症候群；全身性血管炎；サルコイドーシス；自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症）；自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症）；甲状腺炎（グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）；真性糖尿病；免疫媒介性腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）；中枢および末梢神経系の脱髄疾患（例えば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー）；肝胆疾患（例えば、感染性肝炎（A 型、B 型、C 型、D 型、E 型肝炎および他の非肝向性のウイルスによる肝炎）、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎）；炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎；クローン病）；グルテン過敏性腸症およびホイップル病；水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬；アレルギー性疾患（例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹）；肺の免疫学的疾患（例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎）；または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患である、請求項 6 7 に記載の方法。

40

50

## 【請求項 8 4】

前記骨代謝の異常または障害が、関節炎、骨粗鬆症または大理石骨病である、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8 5】

前記非ヒトトランスジェニック動物が、性別一致野生型同腹仔と比較して、以下の生理学的特徴：

オープンフィールド試験中の不安様応答の増大；オープンフィールド試験中の不安の低減；オープンフィールド試験中の自発運動活性の低下；ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム（明期中の活性の低下）；歩行回数の減少を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；概日リズムを有しない機能低下；歩行回数の増加を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；ストレス誘導性高体温の増大；ストレス誘導性高体温の低下；反転スクリーン試験中の運動協調性の低下；尾懸垂における不動の増加（抑鬱様応答の増大）；尾懸垂試験中の抑鬱様応答の増大；尾懸垂試験中の不動性の増大または抑鬱様応答の減少；プレパルス抑制試験中の驚愕応答の低下；難聴を示唆する無驚愕応答；もしくは難聴；感覚運動ゲーティング／注意の低下を伴うプレパルス抑制の低下；ホットプレート試験における反応性の低下；ホットプレート試験における反応までの時間の減少；眼科学的異常；平均動静脈比の増大；瞳孔拡大薬である塩酸シクロペントレートに対する抵抗性；細目；白斑を伴う細目；白内障；網膜変性症；視力障害；基礎体温の低下；心拍数の減少；平均収縮期血圧の上昇；インスリン感度の増大；平均絶食時血清中グルコースレベルの上昇；平均血清中グルコースレベルの低下；平均血清中コレステロールレベルの上昇；平均血清中コレステロールレベルの低下；平均血清中トリグリセリドレベルの上昇；平均血清中トリグリセリドレベルの低下；耐糖能の増大；耐糖能障害；平均血清中インスリンレベルの低下；平均血清中カルシウムの上昇；ウロビリノーゲンの上昇、顕著な脂肪血；アルブミン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、リン、およびカリウムレベルの上昇；平均血清中アルカリホスファターゼレベルの上昇；血中尿素窒素の上昇；顆粒球の割合の増大；全白血球（WBC）数の増加；平均絶対好中球数の増大；好中球減少症；絶対リンパ球数の増加；絶対単球数の増加；脾臓中の単球およびDC（CD11b<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>c<sup>+</sup>）の増加；平均血小板数の増加；リンパ節中のナチュラルキラー（NK）細胞の上昇；好中球数の減少；ナチュラルキラー（NK）細胞の減少；平均赤血球（RBC）数、ヘモグロビン濃度、およびヘマトクリットの減少；平均の赤血球分布幅の増大；平均小体容積および平均小体へのグロビンの減少；平均血小板数の減少および血小板の容積の増大；リンパ節中のB細胞数の増加；パイアー斑におけるB細胞のサブタイプの増加；リンパ節中のB細胞のパーセンテージの上昇；CD25<sup>+</sup>細胞の増加；胸腺DNの増加、DP<sup>+</sup>T細胞の減少；リンパ節中のCD19<sup>+</sup>細胞の増加；骨髓細胞中のCD117の増加；CD4細胞の平均パーセンテージの上昇；CD8細胞の増加およびB細胞中での減少；腹腔洗浄におけるCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Low CD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>LowおよびCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；骨髓中のB220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；脾臓中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞の増加；CD4およびCD8細胞のCD62hi、CD44intサブセットの増加；末梢CD117細胞の増加；パイアー斑中のTcRbeta<sup>+</sup>/CD38の増加、胸腺中のTcRbeta<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；リンパ節中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>Hi CD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>Med CD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；脾臓中のCD62L<sup>+</sup>Hi CD44<sup>+</sup>Dim CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの低下；リンパ節および脾臓中のCD4およびCD8細胞の平均パーセンテージの低下；メモリーT細胞の増加（CD62L<sup>+</sup>lo CD44hiの増加）；T細胞：B細胞比の低下；ナイーブT細胞の減少；腹腔洗浄中のCD117細胞の減

少；CD8細胞の平均パーセンテージの低下、卵白アルブミン負荷に対するIgG1応答の増大；卵白アルブミン負荷に対するIgG2a応答の増大；LPS負荷に対する平均血清IL-6応答の増大；LPS負荷に対するTNF 応答の増大；LPS負荷に対する血清MCP-1応答の増大；平均血清中IgMレベルの増大；血清IgAの増加；平均血清IgG1の増大；平均血清IgG3の増大；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG1応答の低下；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG2a応答の低下；平均血清IgAレベルの低下；血清IgG2aレベルの低下；血清IgG3レベルの低下；皮膚線維芽細胞増殖速度の増大；皮膚線維芽細胞増殖速度の低下；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの増加；平均体重の増加；平均体長の増大；総組織質量（TTM）の増加；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の増加；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の増加；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの減少；平均体重の減少；平均体長の低減；総組織質量（TTM）の減少；除脂肪体重（LBM）の減少；大腿骨の骨塩密度（BMD）の減少；椎骨の骨塩密度（BMD）の減少；全身、大腿、および脊椎の骨塩密度（BMD）の減少；骨塩量（BMC）の減少；骨塩密度指標の減少；体積測定による骨塩密度（vBMD）の減少；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の減少；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の減少；大理石骨病；骨粗鬆症；様々な組織における慢性炎症；両側水腎症（中程度から重症）および炎症；「洋ナシ型の腹部」、左右対称に腫大した腎臓（多嚢胞性の腎疾患を示唆する）；コルチ器官の変性；肝細胞機能不全障害；胆道閉塞；組織球の浸潤を特徴とする肝脾腫大症；小腸、リンパ節、および脾臓中の組織球増殖症；脾腫、リンパ節腫脹症、およびリンパ節腫脹症；咽頭扁桃腺および扁桃腺の過形成；軽度～中程度の過剰な延髄造血；ホモ接合性マウスは小さく、乾燥しており、そして少ない皮下脂肪の蓄積を示す；脂肪欠乏症；潰瘍性大腸炎；基底膜上の内蝸牛有毛細胞および外蝸牛有毛細胞細胞の両方の完全な欠失を特徴とする、内耳の感覚蝸牛有毛細胞のびまん性の顕著な変性；胃粘膜過形成および慢性的な炎症；胃重量の増加；精巢の精子形成障害；精巢上体の精液過少症および精子欠損；男性不妊症；リソソーム蓄積症；貧血；成長遅延；生存能力の低下；リンパ球の減少および脂肪欠乏症を伴う周産期致死性；ホモ接合性胚性致死；ならびにヘテロ接合性胚性致死のうちの少なくとも1つを示す、請求項67に記載の方法。

#### 【請求項86】

請求項67に記載の方法によって同定された、薬剤。

#### 【請求項87】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項86に記載の薬剤。

#### 【請求項88】

前記アゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO

1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である、請求項87に記載の薬剤。

【請求項89】

前記アンタゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である、請求項87に記載の薬剤。

10

20

【請求項90】

請求項67に記載の方法によって同定された、治療薬。

【請求項91】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの発現を調節する薬剤を同定する方法であって、該方法は：

30

(a) PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを発現している宿主細胞と試験薬剤を接触させる工程；および

40

(b) 該試験薬剤が、該宿主細胞による該PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO

50

444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの発現を調節するか否かを判定する工程

10

を含む、方法。

【請求項92】

請求項91に記載の方法によって同定された、薬剤。

【請求項93】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項92に記載の薬剤。

20

【請求項94】

前記アゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である、請求項93に記載の薬剤。

30

40

【請求項95】

前記アンタゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO

50

6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である、請求項93に記載の薬剤。

【請求項96】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する状態に影響を及ぼすことができる治療薬を評価する方法であって、該方法は：

(a) PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子が破壊されたゲノムを有する非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

(b) (a) の非ヒトトランスジェニック動物の生理学的特徴を測定する工程；  
(c) (b) の測定された生理学的特徴を性別一致野生型動物の生理学的特徴と比較する工程であって、ここで、該野生型動物の該生理学的特徴と異なる該非ヒトトランスジェニック動物の該生理学的特徴を、該非ヒトトランスジェニック動物における該遺伝子の破壊から生じる状態と同定する、工程；

(d) (a) の非ヒトトランスジェニック動物に試験薬剤を投与する工程；および  
(e) 該非ヒトトランスジェニック動物における遺伝子破壊に関連する該同定された状態に対する該試験薬剤の作用を評価する工程を含む、方法。

【請求項97】

前記状態が、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常または障害；脂質代謝障害；または発達異常である、請求項96に記載の方法。

【請求項98】

請求項96に記載の方法によって同定された、治療薬。

【請求項99】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343

、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項98に記載の治療薬。

【請求項100】

10

前記アゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である、請求項99に記載の治療薬。

20

【請求項101】

前記アンタゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である、請求項99に記載の治療薬。

30

【請求項102】

請求項98に記載の治療薬を含む薬学的組成物。

【請求項103】

40

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、P

50



RO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害または胚性致死を処置または予防または寛解する方法であって、該方法は、該障害をすでに有し得るか、または該障害を有する傾向にあり得るか、もしくは該障害を予防すべき状態であり得る、そのような処置を必要とする被験体に、治療有効量の請求項94に記載の治療薬またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与する工程を含み、それにより、該障害を効果的に処置または予防または寛解する、方法。

【請求項104】

前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である、請求項103に記載の方法。

10

【請求項105】

前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である、請求項103に記載の方法。

【請求項106】

前記神経障害が、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである、請求項103に記載の方法。

【請求項107】

前記神経障害が、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である、請求項103に記載の方法。

20

【請求項108】

前記神経障害が、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である、請求項103に記載の方法。

【請求項109】

前記神経障害が、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏または感覚障害である、請求項103に記載の方法。

【請求項110】

前記眼の異常が、網膜の異常である、請求項103に記載の方法。

【請求項111】

前記眼の異常が、視覚問題または失明と一致する、請求項103に記載の方法。

30

【請求項112】

前記網膜の異常が、網膜色素変性症と一致する、請求項110に記載の方法。

【請求項113】

前記網膜の異常が、網膜変性症または網膜の形成異常を特徴とする、請求項110に記載の方法。

【請求項114】

前記網膜の異常が、網膜の形成異常、未熟児網膜症を含む様々な網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜/脈絡膜血管新生、隅角血管新生(ルベオーシス)、眼球の血管新生性疾患、血管再狭窄、動静脈奇形(AVM)、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺肥大(グレーブス病を含む)、角膜および他の組織の移植、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖；網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイデレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ-マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー-ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケーン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症、フリン-エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス-シェーンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンブルグ症候群、アラジール症候群、筋緊張性ジストロフィー、オリ

40

50

ーブ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、パッセン・コルンツヴァイク症候群、無リボタンパク質血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症またはマンノシドーシスと一致する、請求項 110 に記載の方法。

【請求項 115】

前記眼の異常が、白内障である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 116】

前記白内障が、全身性疾患（例えば、ヒトダウン症候群、ハレルマン・ストレフ症候群、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー 13 - 15、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症またはコンラディ症候群）である、請求項 115 に記載の方法。

10

【請求項 117】

前記発達異常が、胚性致死または生存能低下を含む、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 118】

前記心臓血管、内皮または血管形成の障害が、動脈疾患（例えば、真性糖尿病；乳頭浮腫；視神経萎縮；アテローム性動脈硬化症；アングナ；急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大および鬱血性心不全などの心不全；高血圧症；炎症性血管炎；レイノー病およびレイノー現象；動脈瘤ならびに動脈再狭窄）；静脈およびリンパの障害（例えば、血栓性静脈炎、リンパ管炎およびリンパ浮腫）；末梢血管疾患；癌（例えば、血管腫瘍、例えば、血管腫（毛細管および海綿状）、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮腫、カボジ肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫）；腫瘍血管新生；外傷（例えば、創傷、熱傷および他の組織の傷害）、移植片固定、瘢痕；虚血再灌流傷害；関節リウマチ；脳血管疾患；急性腎不全などの腎疾患または骨粗鬆症である、請求項 103 に記載の方法。

20

【請求項 119】

前記免疫障害が、全身性エリテマトーデス；関節リウマチ；若年性慢性関節炎；脊椎関節症；全身硬化症（強皮症）；特発性炎症性筋障害（皮膚筋炎、多発性筋炎）；シェーグレン症候群；全身性血管炎；サルコイドーシス；自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症）；自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症）；甲状腺炎（グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）；真性糖尿病；免疫媒介性腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）；中枢および末梢神経系の脱髄疾患（例えば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー）；肝胆疾患（例えば、感染性肝炎（A 型、B 型、C 型、D 型、E 型肝炎および他の非肝向性のウイルスによる肝炎）、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎）；炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎；クローン病）；グルテン過敏性腸症およびホイップル病；水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬；アレルギー性疾患（例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹）；肺の免疫学的疾患（例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎）；または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患である、請求項 103 に記載の方法。

30

40

【請求項 120】

前記骨代謝の異常または障害が、関節炎、骨粗鬆症または大理石骨病である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 121】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759

50

、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する、神経障害；心臓血管、内皮または血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常または障害；脂質代謝障害；または発達異常を寛解または調節する薬剤を同定する方法であって、該方法は：

(a) 非ヒトトランスジェニック動物の細胞培養物を提供する工程であって、該培養物の各細胞は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子が破壊されている、工程；

(b) 該細胞培養物に試験薬剤を投与する工程；および

(c) 該試験薬剤が、該細胞培養物において、該神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常を寛解または調節するか否かを判定する工程を含む、方法。

【請求項122】

前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である、請求項121に記載の方法。

【請求項123】

前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である、請求項121に記載の方法。

【請求項124】

前記神経障害が、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである、請求項121に記載の方法。

【請求項125】

前記神経障害が、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である、請求項121に記載の方法。

【請求項126】

前記神経障害が、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である、請求項121に記載の方法。

【請求項127】

前記神経障害が、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏または感覚障害である、請求項121に記載の方法。

【請求項128】

前記眼の異常が、網膜の異常である、請求項121に記載の方法。

【請求項129】

前記眼の異常が、視覚問題または失明と一致する、請求項121に記載の方法。

## 【請求項 1 3 0】

前記網膜の異常が、網膜色素変性症と一致する、請求項 1 2 8 に記載の方法。

## 【請求項 1 3 1】

前記網膜の異常が、網膜変性症または網膜の形成異常を特徴とする、請求項 1 2 8 に記載の方法。

## 【請求項 1 3 2】

前記網膜の異常が、網膜の形成異常、未熟児網膜症を含む様々な網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜/脈絡膜血管新生、隅角血管新生(ルベオース)、眼球の血管新生性疾患、血管再狭窄、動静脈奇形(AVM)、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺肥大(グレーブス病を含む)、角膜および他の組織の移植、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖; 網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイデレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ-マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー-ピードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケーン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症、フリン-エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス-シェンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンブルグ症候群、アラジール症候群、筋緊張性ジストロフィー、オリ-ブ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、バッセン-コルンツヴァイク症候群、無リボタンパク質血症、色素失調症、パッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症またはマンノシドーシスと一致する、請求項 1 2 8 に記載の方法。

## 【請求項 1 3 3】

前記眼の異常が、白内障である、請求項 1 2 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 3 4】

前記白内障が、全身性疾患(例えば、ヒトダウン症候群、ハレルマン-ストレフ症候群、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー 1 3 - 1 5、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症またはコンラディ症候群)である、請求項 1 3 3 に記載の方法。

## 【請求項 1 3 5】

前記発達異常が、胚性致死または生存能低下を含む、請求項 1 2 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 3 6】

前記心臓血管、内皮または血管形成の障害が、動脈疾患(例えば、真性糖尿病; 乳頭浮腫; 視神経萎縮; アテローム性動脈硬化症; アンギナ; 急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大および鬱血性心不全などの心不全; 高血圧症; 炎症性血管炎; レイノー病およびレイノー現象; 動脈瘤ならびに動脈再狭窄); 静脈およびリンパの障害(例えば、血栓性静脈炎、リンパ管炎およびリンパ浮腫); 末梢血管疾患; 癌(例えば、血管腫瘍、例えば、血管腫(毛細管および海綿状)、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮腫、カボジ肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫); 腫瘍血管新生; 外傷(例えば、創傷、熱傷および他の組織の傷害)、移植片固定、瘢痕; 虚血再灌流傷害; 関節リウマチ; 脳血管疾患; 急性腎不全などの腎疾患または骨粗鬆症である、請求項 1 2 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 3 7】

前記免疫障害が、全身性エリテマトーデス; 関節リウマチ; 若年性慢性関節炎; 脊椎関節症; 全身硬化症(強皮症); 特発性炎症性筋障害(皮膚筋炎、多発性筋炎); シェーグレン症候群; 全身性血管炎; サルコイドーシス; 自己免疫性溶血性貧血(免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症); 自己免疫性血小板減少症(特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症); 甲状腺炎(グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎); 真性糖尿病; 免疫媒介性腎疾患(糸球体腎炎、尿細管間質

10

20

30

40

50

性腎炎)；中枢および末梢神経系の脱髄疾患(例えば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー)；肝胆疾患(例えば、感染性肝炎(A型、B型、C型、D型、E型肝炎および他の非肝向性のウイルスによる肝炎)、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎)；炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎：クローン病)；グルテン過敏性腸症およびホイップル病；水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬；アレルギー性疾患(例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹)；肺の免疫学的疾患(例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎)；または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患である、請求項121に記載の方法。

10

【請求項138】

前記骨代謝の異常または障害が、関節炎、骨粗鬆症または大理石骨病である、請求項121に記載の方法。

【請求項139】

請求項121に記載の方法によって同定された、薬剤。

【請求項140】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項139に記載の薬剤。

20

【請求項141】

前記アゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である、請求項140に記載の薬剤。

30

40

【請求項142】

前記アンタゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4

50

369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である、請求項140に記載の薬剤。

【請求項143】

請求項121に記載の方法によって同定された、治療薬。

【請求項144】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型を調節する方法であって、該方法は、該表現型をすでに有し得るか、または該表現型を有する傾向にあり得るか、もしくは該表現型を予防すべき状態であり得る被験体に、有効量の請求項46に記載の薬剤またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与する工程を含み、それにより、該表現型を効果的に調節する、方法。

10

20

【請求項145】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する生理学的特徴を調節する方法であって、該方法は、該生理学的特徴をすでに示し得るか、または該生理学的特徴を示す傾向にあり得るか、もしくは該生理学的特徴を予防すべき状態であり得る被験体に、有効量の請求項52に記載の薬剤またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与する工程を含み、それにより、該生理学的特徴を効果的に調節する、方法。

30

40

【請求項146】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO498

50

9、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する行動を調節する方法であって、該方法は、該行動をすでに示し得るか、または該行動を示す傾向にあり得るか、もしくは該示される行動を予防すべき状態であり得る被験体に、有効量の請求項63に記載の薬剤またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与する工程を含み、それにより、該行動を効果的に調節する、方法。

【請求項147】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの発現を調節する方法であって、該方法は、該PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを発現している宿主細胞に、有効量の請求項92に記載の薬剤またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与する工程を含み、それによって、該ポリペプチドの発現を効果的に調節する、方法。

【請求項148】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する状態を調節する方法であって、該方法は、該状態を有し得るか、または該状態を有する傾向にあり得るか、もしくは該状態を予防すべき状態であり得る被験体に、治療有効量の請求項98に記載の治療薬またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与する工程を含み、それにより、該状態を効果的に調節する、方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 149】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害または胚性致死を処置または予防または寛解する方法であって、該方法は、各細胞がPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子が破壊されている非ヒトトランスジェニック動物の細胞培養物に、治療有効量の請求項139に記載の薬剤またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与する工程を含み、それにより、該障害を効果的に処置または予防または寛解する、方法。

10

20

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、トランスジェニック動物およびノックアウト動物を含む組成物ならびに疾患または障害の診断および処置のためにそのような組成物を使用する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

細胞外タンパク質は、とりわけ、多細胞生物の形成、分化および維持において重要な役割を果たしている。多くの個々の細胞の運命、例えば、増殖、移動、分化または他の細胞との相互作用は、代表的には他の細胞および/または直属の環境から受ける情報により支配されている。この情報は、分泌ポリペプチド（例えば、分裂促進因子、生存因子、細胞傷害性因子、分化因子、神経ペプチドおよびホルモン）により伝達されることが多く、そのポリペプチドは、その後多様な細胞レセプターまたは膜結合タンパク質から受け、そして解釈される。これらの分泌ポリペプチドまたはシグナル伝達分子は、通常、細胞分泌経路を通して細胞外環境におけるそれらの作用部位に到達する。

40

## 【0003】

分泌タンパク質は、医薬品、診断薬、バイオセンサーおよびバイオリアクターを含む様々な産業上の用途を有している。現在利用可能なほとんどのタンパク質薬物（例えば、血栓溶解剤、インターフェロン、インターロイキン、エリトロポイエチン、コロニー刺激因子および様々な他のサイトカイン）は、分泌タンパク質である。膜タンパク質であるそれらのレセプターもまた、治療薬または診断薬としての潜在性を有する。産業界および学術

50



界の両方によって、新規の天然の分泌タンパク質を同定するための努力がなされている。多くの努力は、新規の分泌タンパク質に対するコード配列を同定するための哺乳動物組換えDNAライブラリーのスクリーニングに着目している。スクリーニングの方法および手法の例は、文献に記載されている〔例えば、非特許文献1；特許文献1を参照のこと〕。

#### 【0004】

膜結合タンパク質およびレセプターは、とりわけ、多細胞生物の形成、分化および維持において重要な役割を果たし得る。多くの個々の細胞の運命、例えば、増殖、移動、分化または他の細胞との相互作用は、代表的には他の細胞および/または直属の環境から受ける情報により支配されている。この情報は、分泌ポリペプチド（例えば、分裂促進因子、生存因子、細胞傷害性因子、分化因子、神経ペプチドおよびホルモン）により伝達されることが多く、そのポリペプチドは、その後多様な細胞レセプターまたは膜結合タンパク質により受け、そして解釈される。このような膜結合タンパク質および細胞レセプターとしては、サイトカインレセプター、レセプターキナーゼ、レセプターホスファターゼ、細胞-細胞相互作用に関与するレセプターならびにセレクトリンおよびインテグリンのような細胞接着分子が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、細胞の成長および分化を制御するシグナルの伝達は、部分的に、様々な細胞タンパク質のリン酸化により制御される。そのプロセスを触媒する酵素であるタンパク質チロシンキナーゼは、成長因子レセプターとしても機能できる。例としては、線維芽細胞成長因子レセプターおよび神経成長因子レセプターが挙げられる。

10

#### 【0005】

膜結合タンパク質およびレセプター分子は、医薬品および診断薬を含む様々な産業上の用途を有している。例えば、レセプター免疫接着は、レセプター-リガンド相互作用を阻止するための治療薬として使用され得る。膜結合タンパク質は、関連するレセプター/リガンド相互作用の潜在的なペプチドまたは低分子のインヒビターのスクリーニングのためにも使用され得る。

20

#### 【0006】

産業界および学術界の両方で新規の天然のレセプターまたは膜結合タンパク質を同定するための努力がなされている。多くの努力は、新規のレセプターまたは膜結合タンパク質に対するコード配列を同定するための哺乳動物組換えDNAライブラリーのスクリーニングに着目している。

30

#### 【0007】

生物学的過程および疾患の過程における分泌タンパク質および膜結合タンパク質の重要性を鑑みれば、インビボでの研究および特徴づけは、疾患または機能障害の予防、寛解または矯正において有用な治療薬および/または処置法の価値ある同定および発見を提供とし得る。この点に関して、遺伝子操作されたマウスは、免疫学、癌、神経生物学、心臓血管生物学、肥満症および他の多くのものを含むヒトの疾患に関連する生物学的過程の機能的分析のための貴重な道具であることが示されている。遺伝子ノックアウトは高度に特異的なアンタゴニストの活性をインビボで予測することにより薬物作用の生物学的機序をモデル化しているものとして捉えることができる。ノックアウトマウスは、薬物の活性をモデル化していることが示されており；特定の薬学的標的タンパク質が欠損したマウスの表現型は、対応するアンタゴニスト薬物によって引き起こされるヒトの臨床表現型を模倣し得る。遺伝子ノックアウトは、標的の作用機序、標的の主要な生理学的役割、および標的の阻害から生じ得る機序に基づいた副作用を哺乳動物において発見可能とする。このタイプの例としては、アンジオテンシン変換酵素（ACE）欠損マウス〔非特許文献2〕およびシクロオキシゲナーゼ-1（COX1）遺伝子欠損マウス〔非特許文献3〕が挙げられる。逆に、マウスにおいて遺伝子をノックアウトすることは、対応する標的へのアゴニスト剤の投与後にヒトにおいて観察されるものとは逆の表現型作用を有することができる。例としては、変異の結果が赤血球産生不全であるエリトロポイエチンノックアウト〔非特許文献4〕および変異マウスが活動亢進および応答性亢進を示すGABA（A）-R-3ノックアウト〔非特許文献5〕が挙げられる。これらの表現型は共にヒトにおけるエリ

40

50

トロポイエチンおよびベンゾジアゼピンの投与の作用とは逆である。マウス遺伝学を用いて確認された標的の顕著な例は、A C C 2 遺伝子である。ヒトA C C 2 遺伝子は数年前に同定されたが、薬物開発の標的としてのA C C 2 への関心は、ノックアウトマウスを用いたA C C 2 機能解析後の最近になってようやく活気づいた。A C C 2 変異マウスは、その野生型同腹仔よりも大食であるが、より多くの脂肪を燃焼し、その脂肪細胞中への脂肪の貯留は少ないことから、この酵素は、肥満症の処置における化学的拮抗作用に関する推定標的となる[非特許文献6]。

#### 【0008】

本出願において、変異した遺伝子の破壊は、C N S / 神経の攪乱もしくは障害（例えば、不安）；眼の異常および関連疾患；アテローム性動脈硬化症を含む心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；異常な代謝障害（糖尿病および血清中のトリグリセリドおよびコレステロールのレベルの上昇に伴う異脂肪血症を含む）；免疫学的障害および炎症性障害；腫瘍学的障害；骨の代謝の異常もしくは障害（例えば、関節炎、骨粗鬆症および大理石骨病）；または胚性致死などの発達疾患を含む様々な疾患状態または機能障害に関連する表現型の観察結果をもたらした。

【特許文献1】米国特許第5,536,637号明細書

【非特許文献1】Klein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1996) 93: 7108-7113

【非特許文献2】Esther, C. R. et al., Lab. Invest., 74: 953-965 (1996)

【非特許文献3】Langenbach, R. et al., Cell, 83: 483-492 (1995)

【非特許文献4】Wu, C. S. et al., Cell., 83: 59-67 (1996)

【非特許文献5】DeLorey, T. M., J. Neurosci., 18: 8505-8514 (1998)

【非特許文献6】Abu-Elheiga, L. et al., Science, 291: 2613-2616 (2001)

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0009】

（発明の要旨）

#### A. 実施形態

本発明により、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が含まれている単離された核酸分子が提供される。

#### 【0010】

1つの態様においては、単離された核酸分子には、(a)本明細書中に開示される全長のアミノ酸配列、本明細書中に開示されるシグナルペプチドが欠失しているアミノ酸配列、本明細書中に開示されるシグナルペプチドを有しているかもしくはシグナルペプチドが

10

20

30

40

50

含まれていない膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、または本明細書中に開示される全長のアミノ酸配列の任意の他の特異的に定義された断片を有している、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするDNA分子、あるいは、(b)(a)のDNA分子の相補物に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、あるいは、少なくとも約99%の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列が含まれる。

#### 【0011】

他の態様においては、単離された核酸分子には、(a)本明細書中に開示される全長のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのcDNAのコード配列、本明細書中に開示されるシグナルペプチドが含まれていないPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、

PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのコード配列、本明細書中に開示されるシグナルペプチドが含まれているかまたは含まれていない膜貫通PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの細胞外ドメインのコード配列、あるいは、本明細書中に開示される全長のアミノ酸配列の任意の他の特異的に定義された断片のコード配列が含まれているDNA分子；あるいは、(b)(a)のDNA分子の相補物に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、あるいは、少なくとも約99%の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列が含まれる。

#### 【0012】

さらなる態様においては、本発明は、(a)本明細書中に開示されるATCCに寄託されたヒトのタンパク質のcDNAの任意のものによってコードされる同じ成熟ポリペプチドをコードするDNA分子、または(b)(a)のDNA分子の相補物に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、あるいは、少なくとも約99%の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列が含まれている単離された核酸分子に関する。

#### 【0013】

本発明の別の態様によっては、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、P

PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が含まれている単離された核酸分子が提供される。これは、膜貫通ドメインが欠失しているかまたは膜貫通ドメインが不活化させられているかのいずれかであるか、あるいは、そのようなコードヌクレオチド配列に対する相補物である。この場合、そのようなポリペプチドの膜貫通ドメイン（単数または複数）は本明細書中に開示される。したがって、本明細書中に記載されるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの可溶性の細胞外ドメインが意図される。

10

20

30

40

50

#### 【0014】

本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのコード配列の断片、またはその相補物が提供される。これは、例えば、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの断片をコードするハイブリダイゼーションプローブ（これは、任意選択で、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗P

RO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体についての結合部位が含まれているポリペプチドをコードし得る)、あるいはアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとしての用途が見出され得る。このような核酸フラグメントは、通常約10ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約10ヌクレオチド長、あるいは約15ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約15ヌクレオチド長、あるいは約20ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約20ヌクレオチド長、あるいは約30ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約30ヌクレオチド長、あるいは約40ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約40ヌクレオチド長、あるいは約50ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約50ヌクレオチド長、あるいは約60ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約60ヌクレオチド長、あるいは約70ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約70ヌクレオチド長、あるいは約80ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約80ヌクレオチド長、あるいは約90ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約90ヌクレオチド長、あるいは約100ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約100ヌクレオチド長、あるいは約110ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約110ヌクレオチド長、あるいは約120ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約120ヌクレオチド長、あるいは約130ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約130ヌクレオチド長、あるいは約140ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約140ヌクレオチド長、あるいは約150ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約150ヌクレオチド長、あるいは約160ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約160ヌクレオチド長、あるいは約170ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約170ヌクレオチド長、あるいは約180ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約180ヌクレオチド長、あるいは約190ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約190ヌクレオチド長、あるいは約200ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約200ヌクレオチド長、あるいは約250ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約250ヌクレオチド長、あるいは約300ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約300ヌクレオチド長、あるいは約350ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約350ヌクレオチド長、あるいは約400ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約400ヌクレオチド長、あるいは約450ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約450ヌクレオチド長、あるいは約500ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約500ヌクレオチド長、あるいは約700ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約700ヌクレオチド長、あるいは約800ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約800ヌクレオチド長、あるいは約900ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約900ヌクレオチド長、およびあるいは約1000ヌクレオチド長であるかまたは少なくとも約1000ヌクレオチド長であり、ここで、この文脈において、用語「約」とは、参照ヌクレオチド配列の長さ±その参照配列の長さの10%を意味する。

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369

、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989  
、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174  
、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO1019  
6、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PR  
O38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする  
ヌクレオチド配列の新規の断片が、PRO226、PRO257、PRO268、PRO  
290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444  
、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、  
PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、  
PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、  
PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341  
、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425  
、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993  
、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852  
、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO2  
1956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO8  
5161ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を、多数の周知の配列アラインメン  
トプログラムのうちの任意のものを使用して他の公知のヌクレオチド配列とアラインメン  
トすること、そして、どのPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、  
PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO  
705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1  
281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1  
419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1  
572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO  
4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO  
4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO  
6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO  
9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956  
、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161  
ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の断片（単数または複数）が新規であるかを  
決定することによって、日常的に行われている様式で決定され得ることに留意されたい。  
そのようなPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO3600  
6、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO  
1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO  
1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO  
1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO  
1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PR  
O4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PR  
O4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PR  
O7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PR  
O10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO572  
90、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを  
コードするヌクレオチド配列の全てが、本明細書において意図される。これらのヌクレオ  
チド分子の断片によってコードされるPRO226、PRO257、PRO268、PR  
O290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO44  
4、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155  
、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387  
、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571  
、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO434  
1、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO442

10

20

30

40

50

5、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、または、もしくはPRO85161ポリペプチド断片、好ましくは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド断片もまた意図される。これらには、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体についての結合部位が含まれる。

10

20

30

40

50

**【0015】**

本発明により、本明細書中で上記で同定された単離された核酸配列のうちの任意のものによってコードされる、単離されたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドが提供される。

**【0016】**

特定の態様においては、本発明は、単離されたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、P



RO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに関し、これには、本明細書中に開示される全長のアミノ酸配列、本明細書中に開示されるシグナルペプチドが欠失しているアミノ酸配列、本明細書中に開示される、シグナルペプチドを有しているかもしくはシグナルペプチドが含まれていない膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、あるいは、本明細書中に開示される全長のアミノ酸配列の任意の他の特異的に定義される断片を有している、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして、あるいは、少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有しているアミノ酸配列が含まれる。

【0017】

さらなる態様において、本発明は、単離されたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに関し、これには、本明細書中に開示されるATCCに寄託されたヒトのタンパク質のcDNAの任意のものによってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、あるいは

、少なくとも約 83 % のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約 84 % のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約 85 % のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約 86 % のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約 87 % のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約 88 % のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約 89 % のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約 90 % のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約 91 % のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約 92 % のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約 93 % のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約 94 % のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約 95 % のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約 96 % のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約 97 % のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約 98 % のアミノ酸配列同一性、そして、あるいは、少なくとも約 99 % のアミノ酸配列同一性を有しているアミノ酸配列が含まれる。

10

**【0018】**

1つの態様においては、本発明は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161変異体ポリペプチドに関し、これは、少なくとも約10アミノ酸長であるか、あるいは、少なくとも約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600アミノ酸長、またはそれ以上である。任意選択で、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161変異体ポリペプチドは、自然界に存在しているPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、

20

30

40

50

PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド配列と比較してわずか1つの保存的アミノ酸置換を有するか、または置換は有さないか、あるいは、自然界に存在している、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド配列と比較して、わずか2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10個の保存的アミノ酸置換を有するか、または置換を有さないであろう。

10

**【0019】**

特異的な態様においては、本発明により、N末端シグナル配列および/または開始メチオニンが含まれていない、単離されたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドが提供され、これは、本明細書中で先に記載されたそのようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされる。それらを生産するためのプロセスもまた、本明細書中に記載される。ここでは、これらのプロセスには、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの発現に適している条件下で適切なコード核酸分子が含まれているベクターを含む宿主細胞を培養する工程、および細胞培養物からPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO141

20

30

40

50

9、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを回収する工程が含まれる。

#### 【0020】

本発明の別の態様により、単離されたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドが提供される。これは、膜貫通ドメインが欠失させられているか、または膜貫通ドメインが不活化されているかのいずれかである。それらを生産するためのプロセスもまた、本明細書中で記載される。ここでは、これらのプロセスには、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの発現に適している条件下で適切なコード核酸分子が含まれているベクターを含む宿主細胞を培養する工程、および細胞培養物からPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを回収する工程が含まれる。

#### 【0021】

本発明により、本明細書中で定義される自然界に存在しているPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、

10

20

30

40

50

PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストが提供される。具体的には、アゴニストまたはアンタゴニストは、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体、あるいは低分子である。

#### 【0022】

本発明により、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対するアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法が提供される。この方法には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを候補の分子と接触させる工程、および上記PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444

、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、  
PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、  
PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、  
PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341  
、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425  
、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993  
、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852  
、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO2  
1956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO8  
5161ポリペプチドによって媒介される生物学的活性をモニターする工程が含まれる。  
好ましくは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO360  
06、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PR  
O1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PR  
O1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PR  
O1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PR  
O1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、P  
RO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、P  
RO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、P  
RO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、P  
RO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57  
290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド  
は、自然界に存在しているPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、  
PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO  
705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1  
281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1  
419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1  
572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO  
4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO  
4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO  
6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO  
9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956  
、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161  
ポリペプチドである。

10

20

30

**【0023】**

本発明により、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO3  
6006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、  
PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、  
PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、  
PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、  
PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348  
、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985  
、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017  
、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873  
、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO  
57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプ  
チド、あるいは、本明細書中に記載されるPRO226、PRO257、PRO268、  
PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO  
444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO11  
55、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO13  
87、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO15

40

50

71、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト、あるいは、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体が、担体と共に含まれている物質の組成物が提供される。必要に応じて、前記担体は、薬学的に許容可能な担体である。

10

20

**【0024】**

本発明により、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド、あるいは、本明細書中で先に記載されたそれらのアゴニストまたはアンタゴニスト、あるいは、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体の、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO

30

40

50

1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体に反応する状態の処置に有用な医薬品の調製のための使用が提供される。

10

**【0025】**

本発明は、本明細書中に記載するポリペプチドのいずれかをコードするDNAを含むベクターを提供する。任意のこのようなベクターを含む宿主細胞もまた、提供される。例としては、前記宿主細胞は、CHO細胞、E. coliまたは酵母であり得る。本明細書中に記載するポリペプチドのいずれかを生成するためのプロセスがさらに提供され、そのプロセスは、宿主細胞を所望のポリペプチドの発現に適した条件下で培養する工程およびその細胞培養物から所望のポリペプチドを回収する工程を含む。

**【0026】**

本発明は、異種性のポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合された、本明細書中に記載するポリペプチドのいずれかを含有するキメラ分子を提供する。そのようなキメラ分子の例は、エピトープタグ配列または免疫グロブリンのFc領域に融合された、本明細書中に記載するポリペプチドのいずれかを含有する。

20

**【0027】**

本発明は、好ましくは、上記または下記のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗体を提供する。必要に応じて、その抗体は、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体フラグメントまたは一本鎖抗体である。

**【0028】**

本発明は、ゲノムおよびcDNAヌクレオチド配列を単離するため、関連遺伝子の発現を測定または検出するために有用であり得るオリゴヌクレオチドプローブまたはアンチセンスプローブとしてのオリゴヌクレオチドプローブを提供し、ここで、それらのプローブは、上記または下記のヌクレオチド配列のいずれかから得られることがある。好ましいプローブの長さは、本明細書中に記載する。

30

**【0029】**

本発明により、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型を同定する方法も提供される。この方法には、以下の工程が含まれる：

40

(a) そのゲノムにPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO141

50



9、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

(b) 前記非ヒトトランスジェニック動物の生理学的特徴を測定する工程；および

(c) 測定された生理学的特徴を性別一致野生型動物の生理学的特徴と比較する工程。  
ここでは、その野生型動物の生理学的特徴と異なる非ヒトトランスジェニック動物の生理学的特徴を、非ヒトトランスジェニック動物における遺伝子の破壊から生じる表現型と同定する。1つの態様において、非ヒトトランスジェニック動物は、哺乳動物である。別の態様において、前記哺乳動物は、げっ歯類である。さらに別の態様において、前記哺乳動物は、ラットまたはマウスである。1つの態様においては、非ヒトトランスジェニック動物は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊についてヘテロ接合性である。別の態様において、性別一致野生型同腹仔と比較したときの非ヒトトランスジェニック動物によって示される表現型は、以下：神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常のうちの少なくとも1つである。

#### 【0030】

なおも別の態様において、前記神経障害は、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である。なおも別の態様において、前記神経障害は、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である。なおも別の態様において、前記神経障害は、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである。なおも別の態様において、前記神経障害は、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である。なおも別の態様において、前記神経障害は、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である。なおも別の態様において、前記神経障害としては、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害が挙げられる。そのような神経障害は、「不安障害」と定義されるカテゴリーを含み、その「不安障害」としては、軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、特段に特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴ったパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、社会不安、自閉症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、一極性障害、I型またはII型双極性障害、特段に特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害、認知機能の増強、認知機能の低下（アルツハイマー病、脳卒中または脳の外傷に関連するものが挙げられるがこれらに限定されない）、疾患または損傷から生じる発作（癲癇、学習障害（learning disorde

10

20

30

40

50

r) / 障害 (disability)、脳性麻痺が挙げられるがこれらに限定されない) が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害 (以下のタイプ: 妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性 (histrionic)、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない) に適用し得る。

#### 【0031】

別の態様において、前記眼の異常は、網膜の異常である。さらに別の態様において、前記眼の異常は、視覚問題または失明と一致する。なおも別の態様において、前記網膜の異常は、色素性網膜炎と一致するか、または網膜変性症または網膜の形成異常を特徴とする。

10

#### 【0032】

さらに別の態様において、前記網膜の異常は、網膜の形成異常、未熟児網膜症を含む様々な網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜 / 脈絡膜血管新生、隅角血管新生 (ルベオシス)、眼球の血管新生性疾患、血管再狭窄、動静脈奇形 (AVM)、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺肥大 (グレーブス病を含む)、角膜および他の組織の移植、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖; 網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイデレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ-マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー-ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケーン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症 (dysplasia spondyloepiphysearia congenita)、フリン-エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス-シェンベルク病 (Albers-Schönberg disease)、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンブルグ症候群、アラジール症候群 (Alagille syndrome)、筋緊張性ジストロフィー、オリーブ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群 (Pierre-Marie syndrome)、スティックラー症候群、カロチン血症 (carotinemia)、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、バッセン-コルンツヴァイク症候群、無リポタンパク質血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症またはマンノシドーシスと一致する。

20

30

#### 【0033】

さらに別の態様において、前記眼の異常は、白内障である。さらになおも別の態様において、前記白内障は、全身性疾患 (例えば、ヒトダウン症候群、ハレルマン-ストレフ症候群 (Hallerman-Streif syndrome)、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー (Trisomy) 13-15、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症 (hypoparathyroidism) またはコンラーディ症候群) である。

#### 【0034】

さらに別の態様において、前記発達異常は、胚性致死または生存能低下を含む。

40

#### 【0035】

さらになおも別の態様において、前記心臓血管、内皮または血管形成の障害は、動脈疾患 (例えば、真性糖尿病; 乳頭浮腫; 視神経萎縮; アテローム性動脈硬化症; アンギナ; 急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大および鬱血性心不全などの心不全; 高血圧症; 炎症性血管炎; レイノー病およびレイノー現象; 動脈瘤ならびに動脈再狭窄); 静脈およびリンパの障害 (例えば、血栓静脈炎、リンパ管炎およびリンパ浮腫); 末梢血管疾患; 癌 (例えば、血管腫瘍、例えば、血管腫 (毛細管および海綿状)、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮腫、カボジ肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫); 腫瘍血管新生; 外傷 (例えば、創傷、熱傷および他の組織の傷害)、移植片固定、瘢痕; 虚血再灌流傷害; 関節リウマチ; 脳血管疾患; 急性腎不全などの腎

50

疾患または骨粗鬆症である。

【0036】

さらに別の態様において、前記免疫障害は、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus) ; 関節リウマチ ; 若年性慢性関節炎 ; 脊椎関節症 ; 全身硬化症 (強皮症) ; 特発性炎症性筋障害 (皮膚筋炎、多発性筋炎) ; シェーグレン症候群 ; 全身性血管炎 ; サルコイドーシス ; 自己免疫性溶血性貧血 (免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症) ; 自己免疫性血小板減少症 (特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症) ; 甲状腺炎 (グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎) ; 真性糖尿病 ; 免疫媒介性腎疾患 (糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎) ; 中枢および末梢神経系の脱髄疾患 (例えば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー) ; 肝胆疾患 (例えば、感染性肝炎 (A型、B型、C型、D型、E型肝炎および他の非肝向性 (non-hepatotropic) のウイルスによる肝炎)、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎) ; 炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎 : クローン病) ; グルテン過敏性腸症およびホイップル病 ; 水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬 ; アレルギー性疾患 (例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹) ; 肺の免疫学的疾患 (例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎) ; または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患と一致する。

10

20

【0037】

さらに別の態様において、前記骨代謝の異常または障害は、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症または大理石骨病である。

【0038】

別の態様において、前記非ヒトトランスジェニック動物は、性別一致野生型同腹仔と比較して、以下の生理学的特徴 : オープンフィールド試験中の不安様応答の増大 ; オープンフィールド試験中の不安の低減 ; オープンフィールド試験中の自発運動活性の低下 ; ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム (明期中の活性の低下) ; 歩行回数の減少を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム ; 概日リズムを有しない機能低下 ; 歩行回数の増加を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム ; ストレス誘導性高体温の増大 ; ストレス誘導性高体温の低下 ; 反転スクリーン試験中の運動協調性の低下 ; 尾懸垂における不動の増加 (抑鬱様応答の増大) ; 尾懸垂試験中の抑鬱様応答の増大 ; 尾懸垂試験中の不動性の増大または抑鬱様応答の減少 ; プレパルス抑制試験中の驚愕応答の低下 ; 難聴を示唆する無驚愕応答 ; もしくは難聴 ; 感覚運動ゲーティング / 注意の低下を伴うプレパルス抑制の低下 ; ホットプレート試験における反応性の低下 ; ホットプレート試験における反応までの時間の減少 ; 眼科学的異常 ; 平均動静脈比の増大 ; 瞳孔拡大薬である塩酸シクロペントレートに対する抵抗性 ; 細目 ; 白斑を伴う細目 ; 白内障 ; 網膜変性症 ; 視力障害 ; 基礎体温の低下 ; 心拍数の減少 ; 平均収縮期血圧の上昇 ; インスリン感度の増大 ; 平均絶食時血清中グルコースレベルの上昇 ; 平均血清中グルコースレベルの低下 ; 平均血清中コレステロールレベルの上昇 ; 平均血清中コレステロールレベルの低下 ; 平均血清中トリグリセリドレベルの上昇 ; 平均血清中トリグリセリドレベルの低下 ; 耐糖能の増大 ; 耐糖能障害 ; 平均血清中インスリンレベルの低下 ; 平均血清中カルシウムの上昇 ; ウロビリノーゲンの上昇、顕著な脂肪血 ; アルブミン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、リン、およびカリウムレベルの上昇 ; 平均血清中アルカリホスファターゼレベルの上昇 ; 血中尿素窒素の上昇 ; 顆粒球の割合の増大 ; 全白血球 (WBC) 数の増加 ; 平均絶対好中球数の増大 ; 好中球減少症 ; 絶対リンパ球数の増加 ; 絶対単球数の増加 ; 脾臓中の単球およびDC (CD11b<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>c<sup>+</sup>) の増加 ; 平均血小板数の増加 ; リンパ節中のナチュラルキラー (NK) 細胞の上昇 ; 好中球数の減少 ; ナチュラルキラー (NK) 細胞の減少 ; 平均赤血球 (RBC) 数、ヘモグロビン濃度、およびヘマトクリットの減少 ; 平均の赤血球分布幅の増大 ; 平均小体容積および平均小体へのグロビンの減少 ; 平均血小板数の減少および血小板の容積の増大 ; リンパ節中のB細胞数の増加 ; パイアー斑にお

30

40

50

けるB細胞のサブタイプの増加；リンパ節中のB細胞のパーセンテージの上昇；CD25+細胞の増加；胸腺DNの増加、DP T細胞の減少；リンパ節中のCD19+細胞の増加；骨髓細胞中のCD117の増加；CD4細胞の平均パーセンテージの上昇；CD8細胞の増加およびB細胞中での減少；腹腔洗浄におけるCD11b+細胞のパーセンテージの上昇；B220+CD11b Low CD23-細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220-CD11 LowおよびCD11b-細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220-CD11b Hi細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220+CD11b-CD23+細胞のパーセンテージの低下；骨髓中のB220-CD43 Hi細胞のパーセンテージの上昇；脾臓中のCD11b+CD11c-細胞の増加；CD4およびCD8細胞のCD62hi、CD44intサブセットの増加；末梢CD117細胞の増加；パイアー斑の中のTcRbeta/CD38の増加、胸腺中のTcRbeta+細胞のパーセンテージの上昇；リンパ節中のCD11b+CD11c+のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220+Hi CD23+細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220+Med CD23-細胞のパーセンテージの低下；脾臓中のCD62L Hi CD44 Dim CD4+およびCD8+細胞のパーセンテージの低下；B220-CD11b Hi細胞のパーセンテージの低下；リンパ節および脾臓中のCD4およびCD8細胞の平均パーセンテージの低下；メモリーT細胞の増加（CD62L lo CD44 hiの増加）；T細胞：B細胞比の低下；ナイーブT細胞の減少；腹腔洗浄中のCD117細胞の減少；CD8細胞の平均パーセンテージの低下、卵白アルブミン負荷に対するIgG1応答の増大；卵白アルブミン負荷に対するIgG2a応答の増大；LPS負荷に対する平均血清IL-6応答の増大；LPS負荷に対するTNF 応答の増大；LPS負荷に対する血清MCP-1応答の増大；平均血清中IgMレベルの増大；血清IgAの増加；平均血清IgG1の増大；平均血清IgG3の増大；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG1応答の低下；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG2a応答の低下；平均血清IgAレベルの低下；血清IgG2aレベルの低下；血清IgG3レベルの低下；皮膚線維芽細胞増殖速度の増大；皮膚線維芽細胞増殖速度の低下；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの増加；平均体重の増加；平均体長の増大；総組織質量（TTM）の増加；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の増加；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の増加；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの減少；平均体重の減少；平均体長の低減；総組織質量（TTM）の減少；除脂肪体重（LBM）の減少；大腿骨の骨塩密度（BMD）の減少；椎骨の骨塩密度（BMD）の減少；全身、大腿、および脊椎の骨塩密度（BMD）の減少；骨塩量（BMC）の減少；骨塩密度指標の減少；体積測定による骨塩密度（vBMD）の減少；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の減少；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の減少；大理石骨病；骨粗鬆症；様々な組織における慢性炎症；両側水腎症（中程度から重症）および炎症；「洋ナシ型の腹部（pear shaped abdomen）」、左右対称に腫大した腎臓（多嚢胞性の腎疾患を示唆する）；コルチ器官の変性；肝細胞機能不全障害；胆道閉塞；組織球の浸潤を特徴とする肝脾腫大症；小腸、リンパ節、および脾臓中の組織球増殖症；脾腫、リンパ節腫脹症、およびリンパ節腫脹症；咽頭扁桃腺および扁桃腺の過形成；軽度～中程度の過剰な延髄造血（mild-moderate extramedullary hematopoiesis）；ホモ接合性マウスは小さく、乾燥しており、そして少ない皮下脂肪の蓄積を示す；脂肪欠乏症；潰瘍性大腸炎；基底膜上の内蝸牛有毛細胞および外蝸牛有毛細胞細胞の両方の完全な欠失を特徴とする、内耳の感覚蝸牛有毛細胞のびまん性の顕著な変性；胃粘膜過形成および慢性的な炎症；胃重量の増加；精巢の精子形成障害；精巢上体の精液過少症および精子欠損；男性不妊症；リソソーム蓄積症；貧血；成長遅延；生存能力の低下；リンパ球の減少および脂肪欠乏症を伴う周産期致死性；ホモ接合性胚性致死；ならびにヘテロ接合性胚性致死のうちの少なくとも1つを示す。

# 【0039】

本発明によってはまた、そのゲノムにPRO226、PRO257、PRO268、P 50

PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている、非ヒトトランスジェニック動物に由来する単離された細胞が提供される。1つの態様において、前記単離された細胞は、マウス細胞である。なおも別の態様において、前記マウス細胞は、胚性幹細胞である。さらに別の態様において、前記単離された細胞は、性別一致野生型同腹仔と比較して、以下の表現型：神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常のうちの少なくとも1つを示す非ヒトトランスジェニック動物から得られる。本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型を調節する薬剤を同定する方法も提供される。

この方法には、以下の工程が含まれる：

(a) そのゲノムにPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

(b) (a) の非ヒトトランスジェニック動物の生理学的特徴を測定する工程；

(c) (b) の測定された生理学的特徴を性別一致野生型動物の生理学的特徴と比較する工程であって、ここで、前記野生型動物の生理学的特徴と異なる前記非ヒトトランスジェニック動物の生理学的特徴を、前記非ヒトトランスジェニック動物における遺伝子の破壊から生じる表現型と同定する、工程；

(d) (a) の非ヒトトランスジェニック動物に試験薬剤を投与する工程；および

(e) 前記試験薬剤が、前記非ヒトトランスジェニック動物における遺伝子破壊に関連す

る同定された表現型を調節するか否かを判定する工程。

【 0 0 4 0 】

1つの態様において、前記遺伝子の破壊に関連する表現型は、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常を含む。

【 0 0 4 1 】

なおも別の態様において、前記神経障害は、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である。なおも別の態様において、前記神経障害は、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である。なおも別の態様において、前記神経障害は、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである。なおも別の態様において、前記神経障害は、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である。なおも別の態様において、前記神経障害は、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である。なおも別の態様において、前記神経障害としては、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害が挙げられる。そのような神経障害は、「不安障害」と定義されるカテゴリーを含み、その「不安障害」としては、軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、特段に特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴ったパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、社会不安、自閉症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、一極性障害、I型またはII型双極性障害、特段に特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害、認知機能の増強、認知機能の低下（アルツハイマー病、脳卒中または脳の外傷に関連するものが挙げられるがこれらに限定されない）、疾患または損傷から生じる発作（癲癇、学習障害／障害、脳性麻痺が挙げられるがこれらに限定されない）が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害（以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない）に適用し得る。

【 0 0 4 2 】

なおも別の態様において、前記眼の異常は、網膜の異常である。さらに別の態様において、前記眼の異常は、視覚問題または失明と一致する。なおも別の態様において、前記網膜の異常は、色素性網膜炎と一致するか、または網膜変性症または網膜の形成異常を特徴とする。

【 0 0 4 3 】

さらに別の態様において、前記網膜の異常は、網膜の形成異常、未熟児網膜症を含む様々な網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜／脈絡膜血管新生、隅角血管新生（ルベオシス）、眼球の血管新生性疾患、血管再狭窄、動静脈奇形（AVM）、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺肥大（グレーブス病を含む）、角膜および他の組織の移植、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖；網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイデレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ・マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー・ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケーン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症、フリン・エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス・シェーンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンブルグ症候群、アラジール症候群、筋緊張性ジストロフィー、オリブ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、バッセン・コルンツヴァイク症候群、無リポタンパク質血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症またはマンノシドーシスと一致する。

## 【 0 0 4 4 】

さらに別の態様において、前記眼の異常は、白内障である。さらになおも別の態様において、前記白内障は、全身性疾患（例えば、ヒトダウン症候群、ハレルマン - ストレフ症候群、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー 1 3 - 1 5、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症またはコンラディ症候群）である。

## 【 0 0 4 5 】

さらに別の態様において、前記発達異常は、胚性致死または生存能低下を含む。

## 【 0 0 4 6 】

さらに別の態様において、前記心臓血管、内皮または血管形成の障害は、動脈疾患（例えば、真性糖尿病；乳頭浮腫；視神経萎縮；アテローム性動脈硬化症；アングナ；急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大および鬱血性心不全などの心不全；高血圧症；炎症性血管炎；レイノー病およびレイノー現象；動脈瘤ならびに動脈再狭窄）；静脈およびリンパの障害（例えば、血栓性静脈炎、リンパ管炎およびリンパ浮腫）；末梢血管疾患；癌（例えば、血管腫瘍、例えば、血管腫（毛細管および海綿状）、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮腫、カボジ肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫）；腫瘍血管新生；外傷（例えば、創傷、熱傷および他の組織の傷害）、移植片固定、瘢痕；虚血再灌流傷害；関節リウマチ；脳血管疾患；急性腎不全などの腎疾患または骨粗鬆症である。

## 【 0 0 4 7 】

さらに別の態様において、前記免疫障害は、全身性エリテマトーデス；関節リウマチ；若年性慢性関節炎；脊椎関節症；全身硬化症（強皮症）；特発性炎症性筋障害（皮膚筋炎、多発性筋炎）；シェーグレン症候群；全身性血管炎；サルコイドーシス；自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症）；自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症）；甲状腺炎（グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）；真性糖尿病；免疫媒介性腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）；中枢および末梢神経系の脱髄疾患（例えば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー）；肝胆疾患（例えば、感染性肝炎（A 型、B 型、C 型、D 型、E 型肝炎および他の非肝向性のウイルスによる肝炎）、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎）；炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎；クローン病）；グルテン過敏性腸症およびホイップル病；水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬；アレルギー性疾患（例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹）；肺の免疫学的疾患（例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎）；または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患と一致する。

## 【 0 0 4 8 】

さらに別の態様において、前記骨代謝の異常または障害は、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症または大理石骨病である。

## 【 0 0 4 9 】

別の態様において、前記非ヒトトランスジェニック動物は、性別一致野生型同腹仔と比較して、以下の生理学的特徴：オープンフィールド試験中の不安様応答の増大；オープンフィールド試験中の不安の低減；オープンフィールド試験中の自発運動活性の低下；ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム（明期中の活性の低下）；歩行回数の減少を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；概日リズムを有しない機能低下；歩行回数の増加を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；ストレス誘導性高体温の増大；ストレス誘導性高体温の低下；反転スクリーン試験中の運動協調性の低下；尾懸垂における不動の増加（抑鬱様応答の増大）；尾懸垂試験中の抑鬱様応答の増大；尾懸垂試験中の不動性の増大または抑鬱様応答の減少；プレパルス抑制試験中の驚愕応答の低下；難聴を示唆する無驚愕応答；もしくは難聴；感覚運動ゲーティング／注意の低下を伴う

10

20

30

40

50

プレパルス抑制の低下；ホットプレート試験における反応性の低下；ホットプレート試験における反応までの時間の減少；眼科学的異常；平均動静脈比の増大；瞳孔拡大薬である塩酸シクロペントレートに対する抵抗性；細目；白斑を伴う細目；白内障；網膜変性症；視力障害；基礎体温の低下；心拍数の減少；平均収縮期血圧の上昇；インスリン感度の増大；平均絶食時血清中グルコースレベルの上昇；平均血清中グルコースレベルの低下；平均血清中コレステロールレベルの上昇；平均血清中コレステロールレベルの低下；平均血清中トリグリセリドレベルの上昇；平均血清中トリグリセリドレベルの低下；耐糖能の増大；耐糖能障害；平均血清中インスリンレベルの低下；平均血清中カルシウムの上昇；ウロビリノーゲンの上昇、顕著な脂肪血；アルブミン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、リン、およびカリウムレベルの上昇；平均血清中アルカリホスファターゼレベルの上昇；血中尿素窒素の上昇；顆粒球の割合の増大；全白血球（WBC）数の増加；平均絶対好中球数の増大；好中球減少症；絶対リンパ球数の増加；絶対単球数の増加；脾臓中の単球およびDC（CD11b<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>c<sup>+</sup>）の増加；平均血小板数の増加；リンパ節中のナチュラルキラー（NK）細胞の上昇；好中球数の減少；ナチュラルキラー（NK）細胞の減少；平均赤血球（RBC）数、ヘモグロビン濃度、およびヘマトクリットの減少；平均の赤血球分布幅の増大；平均小体容積および平均小体へのグロビンの減少；平均血小板数の減少および血小板の容積の増大；リンパ節中のB細胞数の増加；パイアー斑におけるB細胞のサブタイプの増加；リンパ節中のB細胞のパーセンテージの上昇；CD25<sup>+</sup>細胞の増加；胸腺DNの増加、DP<sup>+</sup>T細胞の減少；リンパ節中のCD19<sup>+</sup>細胞の増加；骨髓細胞中のCD117の増加；CD4細胞の平均パーセンテージの上昇；CD8細胞の増加およびB細胞中での減少；腹腔洗浄におけるCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>LowCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>LowおよびCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；骨髓中のB220<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；脾臓中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞の増加；CD4およびCD8細胞のCD62hi、CD44intサブセットの増加；末梢CD117細胞の増加；パイアー斑の中のTcRbeta/CD38の増加、胸腺中のTcRbeta<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；リンパ節中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>HiCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>MedCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；脾臓中のCD62L<sup>+</sup>HiCD44<sup>+</sup>DimCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの低下；リンパ節および脾臓中のCD4およびCD8細胞の平均パーセンテージの低下；メモリーT細胞の増加（CD62L<sup>+</sup>LoCD44<sup>+</sup>hiの増加）；T細胞：B細胞比の低下；ナイーブT細胞の減少；腹腔洗浄中のCD117細胞の減少；CD8細胞の平均パーセンテージの低下、卵白アルブミン負荷に対するIgG1応答の増大；卵白アルブミン負荷に対するIgG2a応答の増大；LPS負荷に対する平均血清IL-6応答の増大；LPS負荷に対するTNF<sup>+</sup>応答の増大；LPS負荷に対する血清MCP-1応答の増大；平均血清中IgMレベルの増大；血清IgAの増加；平均血清IgG1の増大；平均血清IgG3の増大；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG1応答の低下；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG2a応答の低下；平均血清IgAレベルの低下；血清IgG2aレベルの低下；血清IgG3レベルの低下；皮膚線維芽細胞増殖速度の増大；皮膚線維芽細胞増殖速度の低下；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの増加；平均体重の増加；平均体長の増大；総組織質量（TTM）の増加；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の増加；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の増加；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの減少；平均体重の減少；平均体長の低減；総組織質量（TTM）の減少；除脂肪体重（LBM）の減少；大腿骨の骨塩密度（BMD）の減少；椎骨の骨塩密度（BMD）の減少；全身、大腿、および脊椎の骨塩密度（BMD）の減少；骨塩量（BMC）の減少；骨塩密度指標の減少；体積測定による骨塩密度（vBMD）の減少；大腿骨中軸の平均皮質厚



および平均断面積の減少；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の減少；大理石骨病；骨粗鬆症；様々な組織における慢性炎症；両側水腎症（中程度から重症）および炎症；「洋ナシ型の腹部」、左右対称に腫大した腎臓（多嚢胞性の腎疾患を示唆する）；コルチ器官の変性；肝細胞機能不全障害；胆道閉塞；組織球の浸潤を特徴とする肝脾腫大症；小腸、リンパ節、および脾臓中の組織球増殖症；脾腫、リンパ節腫脹症、およびリンパ節腫脹症；咽頭扁桃腺および扁桃腺の過形成；軽度～中程度の過剰な延髄造血；ホモ接合性マウスは小さく、乾燥しており、そして少ない皮下脂肪の蓄積を示す；脂肪欠乏症；潰瘍性大腸炎；基底膜上の内蝸牛有毛細胞および外蝸牛有毛細胞細胞の両方の完全な欠失を特徴とする、内耳の感覚蝸牛有毛細胞のびまん性の顕著な変性；胃粘膜過形成および慢性的な炎症；胃重量の増加；精巣の精子形成障害；精巣上体の精液過少症および精子欠損；男性不妊症；リソソーム蓄積症；貧血；成長遅延；生存能力の低下；リンパ球の減少および脂肪欠乏症を伴う周産期致死性；ホモ接合性胚性致死；ならびにヘテロ接合性胚性致死のうちの少なくとも1つを示す。

10

**【0050】**

本発明はまた、遺伝子の破壊と関連する表現型を調節する薬剤を提供する。1つの態様においては、薬剤は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストあるいはアンタゴニストである。なお別の態様においては、アゴニスト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である。さらに別の態様においては、アンタゴニスト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO

20

30

40

50

10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である。

【0051】

本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する生理学的特徴を調節する薬剤を同定する方法も提供される。この方法には、以下の工程が含まれる：

(a) そのゲノムにPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

(b) (a) の非ヒトトランスジェニック動物によって示される生理学的特徴を測定する工程；

(c) (b) の測定された生理学的特徴を性別一致野生型動物の生理学的特徴と比較する工程であって、ここで、前記野生型動物によって示される生理学的特徴と異なる前記非ヒトトランスジェニック動物によって示される生理学的特徴を、遺伝子の破壊に関連する生理学的特徴と同定する、工程；

(d) (a) の非ヒトトランスジェニック動物に試験薬剤を投与する工程；および

(e) 遺伝子破壊と関連する前記生理学的特徴が調節されているか否かを判定する工程。

【0052】

1つの態様において、前記非ヒトトランスジェニック動物は、性別一致野生型同腹仔と比較して、以下の生理学的特徴のうちの少なくとも1つを示す。

【0053】

別の態様において、前記非ヒトトランスジェニック動物は、性別一致野生型同腹仔と比較して、以下の生理学的特徴：オープンフィールド試験中の不安様応答の増大；オープンフィールド試験中の不安の低減；オープンフィールド試験中の自発運動活性の低下；ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム（明期中の活性の低下）；歩行回数の減少を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；概日リズムを有しない機能低下；歩行回数の増加を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；ストレス誘導性高体温の増大；ストレス誘導性高体温の低下；反転スクリーン試験中の運動協調性の低下；尾懸垂における不動の増加（抑鬱様応答の増大）；尾懸垂試験中の抑鬱様応答の増大；尾懸垂

試験中の不動性の増大または抑鬱様応答の減少；プレパルス抑制試験中の驚愕応答の低下；難聴を示唆する無驚愕応答；もしくは難聴；感覚運動ゲーティング／注意の低下を伴うプレパルス抑制の低下；ホットプレート試験における反応性の低下；ホットプレート試験における反応までの時間の減少；眼科学的異常；平均動静脈比の増大；瞳孔拡大薬である塩酸シクロペントレートに対する抵抗性；細目；白斑を伴う細目；白内障；網膜変性症；視力障害；基礎体温の低下；心拍数の減少；平均収縮期血圧の上昇；インスリン感度の増大；平均絶食時血清中グルコースレベルの上昇；平均血清中グルコースレベルの低下；平均血清中コレステロールレベルの上昇；平均血清中コレステロールレベルの低下；平均血清中トリグリセリドレベルの上昇；平均血清中トリグリセリドレベルの低下；耐糖能の増大；耐糖能障害；平均血清中インスリンレベルの低下；平均血清中カルシウムの上昇；ウロビリノーゲンの上昇、顕著な脂肪血；アルブミン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、リン、およびカリウムレベルの上昇；平均血清中アルカリホスファターゼレベルの上昇；血中尿素窒素の上昇；顆粒球の割合の増大；全白血球（WBC）数の増加；平均絶対好中球数の増大；好中球減少症；絶対リンパ球数の増加；絶対単球数の増加；脾臓中の単球およびDC（CD11b<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>c<sup>+</sup>）の増加；平均血小板数の増加；リンパ節中のナチュラルキラー（NK）細胞の上昇；好中球数の減少；ナチュラルキラー（NK）細胞の減少；平均赤血球（RBC）数、ヘモグロビン濃度、およびヘマトクリットの減少；平均の赤血球分布幅の増大；平均小体容積および平均小体へのグロビンの減少；平均血小板数の減少および血小板の容積の増大；リンパ節中のB細胞数の増加；パイアー斑におけるB細胞のサブタイプの増加；リンパ節中のB細胞のパーセンテージの上昇；CD25<sup>+</sup>細胞の増加；胸腺DNの増加、DP<sup>+</sup>T細胞の減少；リンパ節中のCD19<sup>+</sup>細胞の増加；骨髓細胞中のCD117の増加；CD4細胞の平均パーセンテージの上昇；CD8細胞の増加およびB細胞中での減少；腹腔洗浄におけるCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>LowCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>LowおよびCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；骨髓中のB220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；脾臓中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞の増加；CD4およびCD8細胞のCD62hi、CD44intサブセットの増加；末梢CD117細胞の増加；パイアー斑の中のTcRbeta/CD38の増加、胸腺中のTcRbeta<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；リンパ節中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>HiCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>MedCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；脾臓中のCD62L<sup>+</sup>HiCD44<sup>+</sup>DimCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの低下；リンパ節および脾臓中のCD4およびCD8細胞の平均パーセンテージの低下；メモリーT細胞の増加（CD62L<sup>+</sup>loCD44<sup>+</sup>hiの増加）；T細胞：B細胞比の低下；ナイーブT細胞の減少；腹腔洗浄中のCD117細胞の減少；CD8細胞の平均パーセンテージの低下、卵白アルブミン負荷に対するIgG1応答の増大；卵白アルブミン負荷に対するIgG2a応答の増大；LPS負荷に対する平均血清IL-6応答の増大；LPS負荷に対するTNF $\alpha$ 応答の増大；LPS負荷に対する血清MCP-1応答の増大；平均血清中IgMレベルの増大；血清IgAの増加；平均血清IgG1の増大；平均血清IgG3の増大；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG1応答の低下；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG2a応答の低下；平均血清IgAレベルの低下；血清IgG2aレベルの低下；血清IgG3レベルの低下；皮膚線維芽細胞増殖速度の増大；皮膚線維芽細胞増殖速度の低下；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの増加；平均体重の増加；平均体長の増大；総組織質量（TTM）の増加；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の増加；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の増加；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの減少；平均体重の減少；平均体長の低減；総組織質量（TTM）の減少；除脂肪体重（LBM）の減少；大腿骨の骨塩密度（BMD）の減少；椎骨の骨塩密度（BMD）の減少

；全身、大腿、および脊椎の骨塩密度（BMD）の減少；骨塩量（BMC）の減少；骨塩密度指標の減少；体積測定による骨塩密度（vBMD）の減少；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の減少；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の減少；大理石骨病；骨粗鬆症；様々な組織における慢性炎症；両側水腎症（中程度から重症）および炎症；「洋ナシ型の腹部」、左右対称に腫大した腎臓（多嚢胞性の腎疾患を示唆する）；コルチ器官の変性；肝細胞機能不全障害；胆道閉塞；組織球の浸潤を特徴とする肝脾腫大症；小腸、リンパ節、および脾臓中の組織球増殖症；脾腫、リンパ節腫脹症、およびリンパ節腫脹症；咽頭扁桃腺および扁桃腺の過形成；軽度～中程度の過剰な延髄造血；ホモ接合性マウスは小さく、乾燥しており、そして少ない皮下脂肪の蓄積を示す；脂肪欠乏症；潰瘍性大腸炎；基底膜上の内蝸牛有毛細胞および外蝸牛有毛細胞細胞の両方の完全な欠失を特徴とする、内耳の感覚蝸牛有毛細胞のびまん性の顕著な変性；胃粘膜過形成および慢性的な炎症；胃重量の増加；精巣の精子形成障害；精巣上体の精液過少症および精子欠損；男性不妊症；リソソーム蓄積症；貧血；成長遅延；生存能力の低下；リンパ球の減少および脂肪欠乏症を伴う周産期致死性；ホモ接合性胚性致死；ならびにヘテロ接合性胚性致死のうちの少なくとも1つを示す。

10

#### 【0054】

本発明はまた、遺伝子の破壊に関連する生理学的特徴を調節する薬剤を提供する。1つの態様においては、薬剤は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型のアゴニストあるいはアンタゴニストである。なお別の態様においては、薬剤は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストあるいはアンタゴニストである。なお別の態様においては、アゴニスト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5

20

30

40

50

993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である。さらに別の態様においては、アンタゴニスト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である。

10

#### 【0055】

本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する行動を調節する薬剤を同定する方法も提供される。この方法には、以下の工程が含まれる：

20

30

(a) そのゲノムにPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

40

(b) (a) の非ヒトトランスジェニック動物によって示される行動を観察する工程；  
(c) (b) の観察された行動を性別一致野生型動物の行動と比較する工程であって、ここで、前記野生型動物によって示される観察された行動と異なる、前記非ヒトトランスジェニック動物によって示される観察された行動を、遺伝子の破壊に関連する行動と同定する、工程；

(d) (a) の非ヒトトランスジェニック動物に試験薬剤を投与する工程；および

50

(e) 前記薬剤が、遺伝子破壊と関連する前記行動を調節するか否かを判定する工程。

【0056】

1つの態様において、前記観察された行動は、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である。なおも別の態様において、前記観察された行動は、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である。なおも別の態様において、前記観察された行動は、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである。なおも別の態様において、前記観察された行動は、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である。なおも別の態様において、前記観察された行動は、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である。なおも別の態様において、前記観察された行動としては、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害が挙げられる。そのような神経障害は、「不安障害」と定義されるカテゴリーを含み、その「不安障害」としては、軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、特段に特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴ったパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、社会不安、自閉症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、一極性障害、I型またはII型双極性障害、特段に特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害、認知機能の増強、認知機能の低下(アルツハイマー病、脳卒中または脳の外傷に関連するものが挙げられるがこれらに限定されない)、疾患または損傷から生じる発作(癲癇、学習障害/障害、脳性麻痺が挙げられるがこれらに限定されない)が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害(以下のタイプ:妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない)に適用し得る。

10

20

【0057】

本発明はまた、遺伝子の破壊に関連する行動を調節する薬剤を提供する。1つの態様においては、薬剤は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型のアゴニストあるいはアンタゴニストである。なお別の態様においては、薬剤は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストあるいはアンタゴニストである。なお別の態様においては、アゴニスト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、

30

40

50

抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である。なお別の態様においては、アンタゴニスト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である。

【0058】

本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常を寛解するかあるいは調節する薬剤を同定する方法も提供される。この方法には、以下の工程が含まれる：

(a) そのゲノムにPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO987

3、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

(b) 前記非ヒトトランスジェニック動物に試験薬剤を投与する工程；および

(c) 前記試験薬剤が、前記非ヒトトランスジェニック動物における遺伝子破壊に関連する、前記神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常を寛解または調節するか否かを判定する工程。

#### 【0059】

なおも別の態様において、前記神経障害は、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である。なおも別の態様において、前記神経障害は、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である。なおも別の態様において、前記神経障害は、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである。なおも別の態様において、前記神経障害は、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である。なおも別の態様において、前記神経障害は、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である。なおも別の態様において、前記神経障害としては、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害が挙げられる。そのような神経障害は、「不安障害」と定義されるカテゴリーを含み、その「不安障害」としては、軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、特段に特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴ったパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、社会不安、自閉症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、一極性障害、I型またはII型双極性障害、特段に特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害、認知機能の増強、認知機能の低下（アルツハイマー病、脳卒中または脳の外傷に関連するものが挙げられるがこれらに限定されない）、疾患または損傷から生じる発作（癲癇、学習障害／障害、脳性麻痺が挙げられるがこれらに限定されない）が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害（以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない）に適用し得る。

#### 【0060】

別の態様において、前記眼の異常は、網膜の異常である。さらに別の態様において、前記眼の異常は、視覚問題または失明と一致する。なおも別の態様において、前記網膜の異常は、色素性網膜炎と一致するか、または網膜変性症または網膜の形成異常を特徴とする。

#### 【0061】

さらに別の態様において、前記網膜の異常は、網膜の形成異常、未熟児網膜症を含む様々な網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜／脈絡膜血管新生、隅角血管新生（ルベオシス）、眼球の血管新生性疾患、血管再狭窄、動静脈奇形（AVM）、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺肥大（グレーブス病を含む）、角膜および他の組織の移植、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖；網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイドレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ・マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー・ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケーン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症、フリン・エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス・シェーンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンブルグ症候群、アラジール症候群、筋緊

10

20

30

40

50



張性ジストロフィー、オリーブ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、バッセン・コルンツヴァイク症候群、無リポタンパク質血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症またはマンノシドーシスと一致する。

【0062】

さらに別の態様において、前記眼の異常は、白内障である。さらになおも別の態様において、前記白内障は、全身性疾患（例えば、ヒトダウン症候群、ハレルマン・ストレフ症候群、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー13-15、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症またはコンラディ症候群）である。

10

【0063】

さらに別の態様において、前記発達異常は、胚性致死または生存能低下を含む。

【0064】

なおも別の態様において、前記心臓血管、内皮または血管形成の障害は、動脈疾患（例えば、真性糖尿病；乳頭浮腫；視神経萎縮；アテローム性動脈硬化症；アングナ；急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大および鬱血性心不全などの心不全；高血圧症；炎症性血管炎；レイノー病およびレイノー現象；動脈瘤ならびに動脈再狭窄）；静脈およびリンパの障害（例えば、血栓静脈炎、リンパ管炎およびリンパ浮腫）；末梢血管疾患；癌（例えば、血管腫瘍、例えば、血管腫（毛細管および海綿状）、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮腫、カボジ肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫）；腫瘍血管新生；外傷（例えば、創傷、熱傷および他の組織の傷害）、移植片固定、瘢痕；虚血再灌流傷害；関節リウマチ；脳血管疾患；急性腎不全などの腎疾患または骨粗鬆症である。

20

【0065】

さらになおも別の態様において、前記免疫障害は、全身性エリテマトーデス；関節リウマチ；若年性慢性関節炎；脊椎関節症；全身硬化症（強皮症）；特発性炎症性筋障害（皮膚筋炎、多発性筋炎）；シェーグレン症候群；全身性血管炎；サルコイドーシス；自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症）；自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症）；甲状腺炎（グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）；真性糖尿病；免疫媒介性腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）；中枢および末梢神経系の脱髄疾患（例えば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー）；肝胆疾患（例えば、感染性肝炎（A型、B型、C型、D型、E型肝炎および他の非肝向性のウイルスによる肝炎）、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎）；炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎；クローン病）；グルテン過敏性腸症およびホイップル病；水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬；アレルギー性疾患（例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹）；肺の免疫学的疾患（例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎）；または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患と一致する。

30

40

【0066】

なおも別の態様において、前記骨代謝の異常または障害は、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症または大理石骨病である。

【0067】

別の態様において、前記非ヒトトランスジェニック動物は、性別一致野生型同腹仔と比較して、以下の生理学的特徴：オープンフィールド試験中の不安様応答の増大；オープンフィールド試験中の不安の低減；オープンフィールド試験中の自発運動活性の低下；ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム（明期中の活性の低下）；歩行回数の減少を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；概日リズムを有しない機能低下；歩行回数の増加を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；ストレス誘導性高体温

50

の増大；ストレス誘導性高体温の低下；反転スクリーン試験中の運動協調性の低下；尾懸垂における不動の増加（抑鬱様応答の増大）；尾懸垂試験中の抑鬱様応答の増大；尾懸垂試験中の不動性の増大または抑鬱様応答の減少；プレパルス抑制試験中の驚愕応答の低下；難聴を示唆する無驚愕応答；もしくは難聴；感覚運動ゲーティング／注意の低下を伴うプレパルス抑制の低下；ホットプレート試験における反応性の低下；ホットプレート試験における反応までの時間の減少；眼科学的異常；平均動静脈比の増大；瞳孔拡大薬である塩酸シクロペントレートに対する抵抗性；細目；白斑を伴う細目；白内障；網膜変性症；視力障害；基礎体温の低下；心拍数の減少；平均収縮期血圧の上昇；インスリン感度の増大；平均絶食時血清中グルコースレベルの上昇；平均血清中グルコースレベルの低下；平均血清中コレステロールレベルの上昇；平均血清中コレステロールレベルの低下；平均血清中トリグリセリドレベルの上昇；平均血清中トリグリセリドレベルの低下；耐糖能の増大；耐糖能障害；平均血清中インスリンレベルの低下；平均血清中カルシウムの上昇；ウロビリノーゲンの上昇、顕著な脂肪血；アルブミン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、リン、およびカリウムレベルの上昇；平均血清中アルカリホスファターゼレベルの上昇；血中尿素窒素の上昇；顆粒球の割合の増大；全白血球（WBC）数の増加；平均絶対好中球数の増大；好中球減少症；絶対リンパ球数の増加；絶対単球数の増加；脾臓中の単球およびDC（CD11b<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>c<sup>+</sup>）の増加；平均血小板数の増加；リンパ節中のナチュラルキラー（NK）細胞の上昇；好中球数の減少；ナチュラルキラー（NK）細胞の減少；平均赤血球（RBC）数、ヘモグロビン濃度、およびヘマトクリットの減少；平均の赤血球分布幅の増大；平均小体容積および平均小体へのグロビンの減少；平均血小板数の減少および血小板の容積の増大；リンパ節中のB細胞数の増加；パイアー斑におけるB細胞のサブタイプの増加；リンパ節中のB細胞のパーセンテージの上昇；CD25<sup>+</sup>細胞の増加；胸腺DNの増加、DP<sup>+</sup>T細胞の減少；リンパ節中のCD19<sup>+</sup>細胞の増加；骨髓細胞中のCD117の増加；CD4細胞の平均パーセンテージの上昇；CD8細胞の増加およびB細胞中での減少；腹腔洗浄におけるCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Low<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Low<sup>+</sup>およびCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；骨髓中のB220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；脾臓中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞の増加；CD4およびCD8細胞のCD62hi、CD44intサブセットの増加；末梢CD117細胞の増加；パイアー斑の中のTcRbeta/CD38の増加、胸腺中のTcRbeta<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；リンパ節中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>Hi<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>Med<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；脾臓中のCD62L<sup>+</sup>Hi<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>Dim<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの低下；リンパ節および脾臓中のCD4およびCD8細胞の平均パーセンテージの低下；メモリーT細胞の増加（CD62L<sup>+</sup>lo<sup>+</sup>CD44hi<sup>+</sup>の増加）；T細胞：B細胞比の低下；ナイーブT細胞の減少；腹腔洗浄中のCD117細胞の減少；CD8細胞の平均パーセンテージの低下、卵白アルブミン負荷に対するIgG1応答の増大；卵白アルブミン負荷に対するIgG2a応答の増大；LPS負荷に対する平均血清IL-6応答の増大；LPS負荷に対するTNF<sup>+</sup>応答の増大；LPS負荷に対する血清MCP-1応答の増大；平均血清中IgMレベルの増大；血清IgAの増加；平均血清IgG1の増大；平均血清IgG3の増大；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG1応答の低下；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG2a応答の低下；平均血清IgAレベルの低下；血清IgG2aレベルの低下；血清IgG3レベルの低下；皮膚線維芽細胞増殖速度の増大；皮膚線維芽細胞増殖速度の低下；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの増加；平均体重の増加；平均体長の増大；総組織質量（TTM）の増加；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の増加；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の増加；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセント

10

20

30

40

50

の減少；平均体重の減少；平均体長の低減；総組織質量（TTM）の減少；除脂肪体重（LBM）の減少；大腿骨の骨塩密度（BMD）の減少；椎骨の骨塩密度（BMD）の減少；全身、大腿、および脊椎の骨塩密度（BMD）の減少；骨塩量（BMC）の減少；骨塩密度指標の減少；体積測定による骨塩密度（vBMD）の減少；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の減少；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の減少；大理石骨病；骨粗鬆症；様々な組織における慢性炎症；両側水腎症（中程度から重症）および炎症；「洋ナシ型の腹部」、左右対称に腫大した腎臓（多嚢胞性の腎疾患を示唆する）；コルチ器官の変性；肝細胞機能不全障害；胆道閉塞；組織球の浸潤を特徴とする肝脾腫大症；小腸、リンパ節、および脾臓中の組織球増殖症；脾腫、リンパ節腫脹症、およびリンパ節腫脹症；咽頭扁桃腺および扁桃腺の過形成；軽度～中程度の過剰な延髄造血；ホモ接合性マウスは小さく、乾燥しており、そして少ない皮下脂肪の蓄積を示す；脂肪欠乏症；潰瘍性大腸炎；基底膜上の内蝸牛有毛細胞および外蝸牛有毛細胞細胞の両方の完全な欠失を特徴とする、内耳の感覚蝸牛有毛細胞のびまん性の顕著な変性；胃粘膜過形成および慢性的な炎症；胃重量の増加；精巣の精子形成障害；精巣上体の精液過少症および精子欠損；男性不妊症；リソソーム蓄積症；貧血；成長遅延；生存能力の低下；リンパ球の減少および脂肪欠乏症を伴う周産期致死性；ホモ接合性胚性致死；ならびにヘテロ接合性胚性致死のうちの少なくとも1つを示す。

10

#### 【0068】

本発明はまた、遺伝子の破壊に関連する、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常を寛解または調節する薬剤を提供する。1つの態様においては、薬剤は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型のアゴニストあるいはアンタゴニストである。なお別の態様においては、薬剤は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストあるいはアンタゴニストである。なお別の態様においては、アゴニスト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗

20

30

40

50

PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である。さらに別の態様においては、アンタゴニスト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である。

10

20

#### 【0069】

本発明はまた、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常の処置のための治療薬を提供する。

#### 【0070】

本発明によつてはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの発現を調節する薬剤を同定する方法も提供される。この方法には、以下の工程が含まれる：

30

(a) 試験薬剤を、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペ

40

50

プチドを発現している宿主細胞と接触させる工程；および

(b) 試験薬剤が、宿主細胞によるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの発現を調節するかどうかを決定する工程。

10

【0071】

本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの発現を調節する薬剤も提供される。1つの態様においては、薬剤は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型のアゴニストあるいはアンタゴニストである。なお別の態様においては、薬剤は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストあるいはアンタゴニストである。なお別の態様においては、アゴニス

20

30

40

50

ト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である。さらに別の態様においては、アンタゴニスト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である。

#### 【0072】

本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する状態に影響を与えることができる治療薬を評価する方法も提供される。この方法には、以下の工程が含まれる：

(a) そのゲノムにPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PR

PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

(b)(a)の非ヒトトランスジェニック動物の生理学的特徴を測定する工程；

(c)(b)の測定された生理学的特徴を性別一致野生型動物の生理学的特徴と比較する工程であって、ここで、前記野生型動物の生理学的特徴と異なる前記非ヒトトランスジェニック動物の生理学的特徴を、前記非ヒトトランスジェニック動物における前記遺伝子の破壊から生じる状態と同定する、工程；

(d)(a)の非ヒトトランスジェニック動物に試験薬剤を投与する工程；および

(e)前記非ヒトトランスジェニック動物における遺伝子破壊に関連する同定された状態に対する前記試験薬剤の作用を評価する工程。

10

【0073】

1つの態様において、前記状態は、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常である。

【0074】

本発明はまた、遺伝子の破壊に関連する状態に影響を及ぼすことができる治療薬を提供する。1つの態様においては、薬剤は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型のアゴニストあるいはアンタゴニストである。なお別の態様においては、薬剤は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストあるいはアンタゴニストである。なお別の態様においては、アゴニスト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、

20

30

40

50

抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である。さらに別の態様においては、アンタゴニスト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である。

10

**【0075】**

本発明はまた、遺伝子の破壊に関連する状態に影響を及ぼすことができる治療薬を含む薬学的組成物を提供する。

20

**【0076】**

本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；または胚性致死を処置または予防または寛解する方法も提供される。この方法には、上記障害をすでに罹患しているか、もしくは上記障害に罹患しやすいか、または上記障害が予防される、そのような処置が必要な被験体に対して、治療薬、またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストの治療有効量を投与する工程が含まれ、それによって、上記障害または疾患が効率よく処置、または予防、または寛解される。

30

**【0077】**

なおも別の態様において、前記神経障害は、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である。なおも別の態様において、前記神経障害は、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である。なおも別の態様において、前記神経障害は、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである。なおも別の態様において、前記神経障害は、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である。なおも別の態様において、前記神経障害は、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である。なおも別の態様において、前記神経障害としては、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害が挙げられる。そのような神経障害は、「不安障害」と定義されるカテゴリーを含み、その「不安障害」としては、軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、特段に特定されない不安障害、

40

50



全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴ったパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、社会不安、自閉症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、一極性障害、I型またはII型双極性障害、特段に特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害、認知機能の増強、認知機能の低下（アルツハイマー病、脳卒中または脳の外傷に関連するものが挙げられるがこれらに限定されない）、疾患または損傷から生じる発作（癲癇、学習障害／障害、脳性麻痺が挙げられるがこれらに限定されない）が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害（以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない）に適用し得る。

10

#### 【0078】

別の態様において、前記眼の異常は、網膜の異常である。さらに別の態様において、前記眼の異常は、視覚問題または失明と一致する。なおも別の態様において、前記網膜の異常は、色素性網膜炎と一致するか、または網膜変性症または網膜の形成異常を特徴とする。

#### 【0079】

さらに別の態様において、前記網膜の異常は、網膜の形成異常、未熟児網膜症を含む様々な網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜／脈絡膜血管新生、隅角血管新生（ルベオシス）、眼球の血管新生性疾患、血管再狭窄、動静脈奇形（A V M）、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺肥大（グレーブス病を含む）、角膜および他の組織の移植、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖；網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイデレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ・マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー・ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケーン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症、フリン・エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス・シェーンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンブルグ症候群、アラジール症候群、筋緊張性ジストロフィー、オリーブ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、バッセン・コルンツヴァイク症候群、無リボタンパク質血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症またはマンノシドーシスと一致する。

20

30

#### 【0080】

さらに別の態様において、前記眼の異常は、白内障である。さらになおも別の態様において、前記白内障は、全身性疾患（例えば、ヒトダウン症候群、ハレルマン・ストレフ症候群、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー13-15、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症またはコンラーディ症候群）である。

40

#### 【0081】

さらに別の態様において、前記発達異常は、胚性致死または生存能低下を含む。

#### 【0082】

なおも別の態様において、前記心臓血管、内皮または血管形成の障害は、動脈疾患（例えば、真性糖尿病；乳頭浮腫；視神経萎縮；アテローム性動脈硬化症；アングナ；急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大および鬱血性心不全などの心不全；高血圧症；炎症性血管炎；レイノー病およびレイノー現象；動脈瘤ならびに動脈再狭窄）；静脈およびリンパの障害（例えば、血栓静脈炎、リンパ管炎およびリンパ浮腫）；末梢血管疾患；癌（例えば、血管腫瘍、例えば、血管腫（毛細管および海綿状）、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮腫、カボジ肉腫、リンパ管腫およびリ

50

ンパ管肉腫)；腫瘍血管新生；外傷(例えば、創傷、熱傷および他の組織の傷害)、移植片固定、瘢痕；虚血再灌流傷害；関節リウマチ；脳血管疾患；急性腎不全などの腎疾患または骨粗鬆症である。

#### 【0083】

さらになおも別の態様において、前記免疫障害は、全身性エリテマトーデス；関節リウマチ；若年性慢性関節炎；脊椎関節症；全身硬化症(強皮症)；特発性炎症性筋障害(皮膚筋炎、多発性筋炎)；シェーグレン症候群；全身性血管炎；サルコイドーシス；自己免疫性溶血性貧血(免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症)；自己免疫性血小板減少症(特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症)；甲状腺炎(グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎)；真性糖尿病；免疫媒介性腎疾患(糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎)；中枢および末梢神経系の脱髄疾患(例えば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー)；肝胆疾患(例えば、感染性肝炎(A型、B型、C型、D型、E型肝炎および他の非肝向性のウイルスによる肝炎)、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎)；炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎：クローン病)；グルテン過敏性腸症およびホイップル病；水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬；アレルギー性疾患(例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹)；肺の免疫学的疾患(例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎)；または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患と一致する。

#### 【0084】

なおも別の態様において、前記骨代謝の異常または障害は、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症または大理石骨病である。

#### 【0085】

別の態様においては、治療薬は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型のアゴニストあるいはアンタゴニストである。なお別の態様においては、薬剤は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストあるいはアンタゴニストである。なお別の態様においては、アゴニスト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365

、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である。さらに別の態様においては、アンタゴニスト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体である。

10

20

30

40

50

#### 【0086】

本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常を寛解または調節する薬剤を同定する方法も提供される。この方法には、以下の工程が含まれる：

(a) 非ヒトトランスジェニック動物細胞培養物を提供する工程であって、上記培養物の個々の細胞には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873

、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている、工程

(b) 前記細胞培養に試験薬剤を投与する工程；および

(c) 前記試験薬剤が、前記細胞培養物において、前記神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常を寛解または調節するか否かを判定する工程。なおも別の態様において、前記神経障害は、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である。なおも別の態様において、前記神経障害は、オープンフィールド活動性試験中の異常な概日リズムである。なおも別の態様において、前記神経障害は、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である。なおも別の態様において、前記神経障害は、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である。なおも別の態様において、前記神経障害としては、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害が挙げられる。そのような神経障害は、「不安障害」と定義されるカテゴリーを含み、その「不安障害」としては、軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、特段に特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴ったパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、社会不安、自閉症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、一極性障害、I型またはII型双極性障害、特段に特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害、認知機能の増強、認知機能の低下（アルツハイマー病、脳卒中または脳の外傷に関連するものが挙げられるがこれらに限定されない）、疾患または損傷から生じる発作（癲癇、学習障害／障害、脳性麻痺が挙げられるがこれらに限定されない）が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害（以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない）に適用し得る。

#### 【0087】

別の態様において、前記眼の異常は、網膜の異常である。さらに別の態様において、前記眼の異常は、視覚問題または失明と一致する。なおも別の態様において、前記網膜の異常は、色素性網膜炎と一致するか、または網膜変性症または網膜の形成異常を特徴とする。

#### 【0088】

さらに別の態様において、前記網膜の異常は、網膜の形成異常、未熟児網膜症を含む様々な網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜／脈絡膜血管新生、隅角血管新生（ルベオシス）、眼球の血管新生性疾患、血管再狭窄、動静脈奇形（AVM）、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺肥大（グレーブス病を含む）、角膜および他の組織の移植、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖；網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイデレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ・マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー・ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケーン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症、フリン・エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス・シェーンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンブルグ症候群、アラジール症候群、筋緊張性ジストロフィー、オリブ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、バッセン・コルンツヴァイク症候群、無リポタンパク質血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症またはマンノシドーシスと一致する。

10

20

30

40

50

## 【0089】

さらに別の態様において、前記眼の異常は、白内障である。さらになおも別の態様において、前記白内障は、全身性疾患（例えば、ヒトダウン症候群、ハレルマン - ストレフ症候群、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー13 - 15、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症またはコンラディ症候群）である。

## 【0090】

さらに別の態様において、前記発達異常は、胚性致死または生存能低下を含む。

## 【0091】

なおも別の態様において、前記心臓血管、内皮または血管形成の障害は、動脈疾患（例えば、真性糖尿病；乳頭浮腫；視神経萎縮；アテローム性動脈硬化症；アングナ；急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大および鬱血性心不全などの心不全；高血圧症；炎症性血管炎；レイノー病およびレイノー現象；動脈瘤ならびに動脈再狭窄）；静脈およびリンパの障害（例えば、血栓性静脈炎、リンパ管炎およびリンパ浮腫）；末梢血管疾患；癌（例えば、血管腫瘍、例えば、血管腫（毛細管および海綿状）、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮腫、カボジ肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫）；腫瘍血管新生；外傷（例えば、創傷、熱傷および他の組織の傷害）、移植片固定、瘢痕；虚血再灌流傷害；関節リウマチ；脳血管疾患；急性腎不全などの腎疾患または骨粗鬆症である。

10

## 【0092】

さらになおも別の態様において、前記免疫障害は、全身性エリテマトーデス；関節リウマチ；若年性慢性関節炎；脊椎関節症；全身硬化症（強皮症）；特発性炎症性筋障害（皮膚筋炎、多発性筋炎）；シェーグレン症候群；全身性血管炎；サルコイドーシス；自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症）；自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症）；甲状腺炎（グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）；真性糖尿病；免疫媒介性腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）；中枢および末梢神経系の脱髄疾患（例えば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー）；肝胆疾患（例えば、感染性肝炎（A型、B型、C型、D型、E型肝炎および他の非肝向性のウイルスによる肝炎）、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎）；炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎；クローン病）；グルテン過敏性腸症およびホイップル病；水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬；アレルギー性疾患（例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹）；肺の免疫学的疾患（例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎）；または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患と一致する。

20

30

## 【0093】

なおも別の態様において、前記骨代謝の異常または障害は、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症または大理石骨病である。

## 【0094】

本発明はまた、前記培養物中の遺伝子の破壊に関連する、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常を寛解または調節する薬剤を提供する。1つの態様においては、薬剤は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985

40

50

、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型のアゴニストあるいはアンタゴニストである。なお別の態様においては、薬剤は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストあるいはアンタゴニストである。なお別の態様においては、アゴニスト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である。さらに別の態様においては、アンタゴニスト薬剤は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である。

**【0095】**

本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO

4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型を調節する方法も提供される。この方法には、上記表現型をすでに有している可能性があるか、もしくは上記表現型を有しやすい被験体、または上記表現型が予防される被験体に対して、上記表現型を調節するとして同定された薬剤、またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストの有効量を投与する工程が含まれ、それによって、上記表現型が効率よく調節される。

10

**【0096】**

本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する生理学的特徴を調節する方法も提供される。この方法には、上記生理学的特徴をすでに示しているか、もしくは上記生理学的特徴を示しやすい被験体、または上記生理学的特徴が予防される被験体に対して、上記生理学的特徴を調節するとして同定された薬剤、またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストの有効量を投与する工程が含まれ、それによって、上記生理学的特徴が効率よく調節される。

20

**【0097】**

本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する行動を調節する方法も提供される。この方法には、上記行動をすでに示しているか、もしくは上記行動を示しやすい被験体、または上記行動が予防される被験体に対して、上記行動を調節するとして同定された薬剤、またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストの有効量を投与する工程が含まれ、それによって、上記行動が効率よく調節される。

30

40

**【0098】**

本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1

50

419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの発現を調節する方法も提供される。この方法には、上記PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを発現している宿主細胞に対して、上記発現を調節するとして同定された薬剤、またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストの有効量を投与する工程が含まれ、それによって、上記ポリペプチドの発現が効率よく調節される。

10

20

#### 【0099】

本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する状態を調節する方法も提供される。この方法には、上記症状を有しているか、もしくは上記症状を有しやすい被験体、または上記症状が予防される被験体に対して、上記症状を調節するとして同定された治療薬、またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストの治療有効量を投与する工程が含まれ、それによって、上記症状が効率よく調節される。

30

40

#### 【0100】

本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956

50



、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；または胚性致死を処置または予防または寛解する方法も提供される。この方法には、非ヒトトランスジェニック動物細胞培養物（上記培養物の個々の細胞には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている）に対して、上記障害を処置または予防または寛解するとして同定された薬剤、またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストの有効量を投与する工程が含まれ、それによって、上記障害が効率よく処置または予防または寛解される。

#### 【0101】

##### B．さらなる実施形態

なおもさらなる実施形態において、本発明は、本出願に係る潜在的な以下の一連の請求項に関する：

1．PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型を同定する方法であって、本方法には：

(a) そのゲノムに、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

(b) 前記非ヒトトランスジェニック動物の生理学的特徴を測定する工程；および

(c) 前記測定された生理学的特徴を性別一致野生型動物の生理学的特徴と比較する工程

が含まれ、

ここでは、前記野生型動物の前記生理学的特徴と異なる前記非ヒトトランスジェニック動物の前記生理学的特徴が、前記非ヒトトランスジェニック動物における前記遺伝子の破壊から生じる表現型と同定される。

【0102】

2. 前記非ヒトトランスジェニック動物が、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊についてヘテロ接合性である、請求項1に記載の方法。

10

【0103】

3. 性別一致野生型同腹仔と比較した場合の前記非ヒトトランスジェニック動物によって示される前記表現型が、以下：神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常のうちの少なくとも1つである、請求項1に記載の方法。

20

【0104】

4. 前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である、請求項3に記載の方法。

【0105】

5. 前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である、請求項3に記載の方法。

【0106】

6. 前記神経障害が、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである、請求項3に記載の方法。

30

【0107】

7. 前記神経障害が、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である、請求項3に記載の方法。

【0108】

8. 前記神経障害が、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である、請求項3に記載の方法。

【0109】

9. 前記神経障害が、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏または感覚障害である、請求項3に記載の方法。

40

【0110】

10. 前記眼の異常が、網膜の異常である、請求項3に記載の方法。

【0111】

11. 前記眼の異常が、視覚問題または失明と一致する、請求項3に記載の方法。

【0112】

12. 前記網膜の異常が、網膜色素変性症と一致する、請求項10に記載の方法。

【0113】

13. 前記網膜の異常が、網膜変性症または網膜の形成異常を特徴とする、請求項10

50

に記載の方法。

【 0 1 1 4 】

14. 前記網膜の異常が、網膜の形成異常、未熟児網膜症を含む様々な網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜/脈絡膜血管新生、隅角血管新生(ルベオシス)、眼球の血管新生性疾患、血管再狭窄、動静脈奇形(AVM)、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺肥大(グレーブス病を含む)、角膜および他の組織の移植、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖;網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイデレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ-マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー-ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケーン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症、フリン-エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス-シェンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンブルグ症候群、アラジール症候群、筋緊張性ジストロフィー、オリブ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、パッセン-コルンツヴァイク症候群、無リポタンパク質血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症またはマンノシドーシスと一致する、請求項10に記載の方法。

10

【 0 1 1 5 】

15. 前記眼の異常が、白内障である、請求項3に記載の方法。

20

【 0 1 1 6 】

16. 前記白内障が、全身性疾患(例えば、ヒトダウン症候群、ハレルマン-ストレフ症候群、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー13-15、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症またはコンラディ症候群)と一致する、請求項15に記載の方法。

【 0 1 1 7 】

17. 前記発達異常が、胚性致死または生存能低下を含む、請求項3に記載の方法。

【 0 1 1 8 】

18. 前記心臓血管、内皮または血管形成の障害が、動脈疾患(例えば、真性糖尿病;乳頭浮腫;視神経萎縮;アテローム性動脈硬化症;アングナ;急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大および鬱血性心不全などの心不全;高血圧症;炎症性血管炎;レイノー病およびレイノー現象;動脈瘤ならびに動脈再狭窄);静脈およびリンパの障害(例えば、血栓性静脈炎、リンパ管炎およびリンパ浮腫);末梢血管疾患;癌(例えば、血管腫瘍、例えば、血管腫(毛細管および海綿状)、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮腫、カボジ肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫);腫瘍血管新生;外傷(例えば、創傷、熱傷および他の組織の傷害)、移植片固定、瘢痕;虚血再灌流傷害;関節リウマチ;脳血管疾患;急性腎不全などの腎疾患または骨粗鬆症である、請求項3に記載の方法。

30

【 0 1 1 9 】

19. 前記免疫障害が、全身性エリテマトーデス;関節リウマチ;若年性慢性関節炎;脊椎関節症;全身硬化症(強皮症);特発性炎症性筋障害(皮膚筋炎、多発性筋炎);シェーグレン症候群;全身性血管炎;サルコイドーシス;自己免疫性溶血性貧血(免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症);自己免疫性血小板減少症(特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症);甲状腺炎(グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎);真性糖尿病;免疫媒介性腎疾患(糸球体腎炎、尿管間質性腎炎);中枢および末梢神経系の脱髄疾患(例えば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー);肝胆疾患(例えば、感染性肝炎(A型、B型、C型、D型、E型肝炎および他の非肝向性のウイルスによる肝炎)、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、

40

50

肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎)；炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎：クローン病)；グルテン過敏性腸症およびホイップル病；水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬；アレルギー性疾患(例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹)；肺の免疫学的疾患(例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎)；または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患である、請求項3に記載の方法。

#### 【0120】

20．前記骨代謝の異常または障害が、関節炎、骨粗鬆症または大理石骨病である、請求項3に記載の方法。

#### 【0121】

21．前記非ヒトトランスジェニック動物が、性別一致野生型同腹仔と比較して、以下の生理学的特徴：オープンフィールド試験中の不安様応答の増大；オープンフィールド試験中の不安の低減；オープンフィールド試験中の自発運動活性の低下；ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム(明期中の活性の低下)；歩行回数の減少を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；概日リズムを有しない機能低下；歩行回数の増加を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；ストレス誘導性高体温の増大；ストレス誘導性高体温の低下；反転スクリーン試験中の運動協調性の低下；尾懸垂における不動の増加(抑鬱様応答の増大)；尾懸垂試験中の抑鬱様応答の増大；尾懸垂試験中の不動性の増大または抑鬱様応答の減少；プレパルス抑制試験中の驚愕応答の低下；難聴を示唆する無驚愕応答；もしくは難聴；感覚運動ゲーティング/注意の低下を伴うプレパルス抑制の低下；ホットプレート試験における反応性の低下；ホットプレート試験における反応までの時間の減少；眼科学的異常；平均動静脈比の増大；瞳孔拡大薬である塩酸シクロペントレートに対する抵抗性；細目；白斑を伴う細目；白内障；網膜変性症；視力障害；基礎体温の低下；心拍数の減少；平均収縮期血圧の上昇；インスリン感度の増大；平均絶食時血清中グルコースレベルの上昇；平均血清中グルコースレベルの低下；平均血清中コレステロールレベルの上昇；平均血清中コレステロールレベルの低下；平均血清中トリグリセリドレベルの上昇；平均血清中トリグリセリドレベルの低下；耐糖能の増大；耐糖能障害；平均血清中インスリンレベルの低下；平均血清中カルシウムの上昇；ウロビリノーゲンの上昇、顕著な脂肪血；アルブミン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、リン、およびカリウムレベルの上昇；平均血清中アルカリホスファターゼレベルの上昇；血中尿素窒素の上昇；顆粒球の割合の増大；全白血球(WBC)数の増加；平均絶対好中球数の増大；好中球減少症；絶対リンパ球数の増加；絶対単球数の増加；脾臓中の単球およびDC(CD11b<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>c<sup>+</sup>)の増加；平均血小板数の増加；リンパ節中のナチュラルキラー(NK)細胞の上昇；好中球数の減少；ナチュラルキラー(NK)細胞の減少；平均赤血球(RBC)数、ヘモグロビン濃度、およびヘマトクリットの減少；平均の赤血球分布幅の増大；平均小体容積および平均小体へのグロビンの減少；平均血小板数の減少および血小板の容積の増大；リンパ節中のB細胞数の増加；パイアー斑におけるB細胞のサブタイプの増加；リンパ節中のB細胞のパーセンテージの上昇；CD25<sup>+</sup>細胞の増加；胸腺DNの増加、DP<sup>+</sup>T細胞の減少；リンパ節中のCD19<sup>+</sup>細胞の増加；骨髓細胞中のCD117の増加；CD4細胞の平均パーセンテージの上昇；CD8細胞の増加およびB細胞中での減少；腹腔洗浄におけるCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>LowCD23<sup>-</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>-</sup>CD11<sup>+</sup>LowおよびCD11b<sup>-</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；骨髓中のB220<sup>-</sup>CD43<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；脾臓中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>細胞の増加；CD4およびCD8細胞のCD62hi、CD44intサブセットの増加；末梢CD117細胞の増加；パイアー斑の中のTcRbeta/CD38の増加、胸腺中のTcRbeta<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；リンパ節中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>HiCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄

10

20

30

40

50

中の B 2 2 0 + M e d C D 2 3 - 細胞のパーセンテージの低下；脾臓中の C D 6 2 L H i C D 4 4 D i m C D 4 + および C D 8 + 細胞のパーセンテージの低下；B 2 2 0 - C D 1 1 b H i 細胞のパーセンテージの低下；リンパ節および脾臓中の C D 4 および C D 8 細胞の平均パーセンテージの低下；メモリー T 細胞の増加（C D 6 2 L l o C D 4 4 h i の増加）；T 細胞：B 細胞比の低下；ナイーブ T 細胞の減少；腹腔洗浄中の C D 1 1 7 細胞の減少；C D 8 細胞の平均パーセンテージの低下、卵白アルブミン負荷に対する I g G 1 応答の増大；卵白アルブミン負荷に対する I g G 2 a 応答の増大；L P S 負荷に対する平均血清 I L - 6 応答の増大；L P S 負荷に対する T N F 応答の増大；L P S 負荷に対する血清 M C P - 1 応答の増大；平均血清中 I g M レベルの増大；血清 I g A の増加；平均血清 I g G 1 の増大；平均血清 I g G 3 の増大；卵白アルブミン負荷に対する血清 I g G 1 応答の低下；卵白アルブミン負荷に対する血清 I g G 2 a 応答の低下；平均血清 I g A レベルの低下；血清 I g G 2 a レベルの低下；血清 I g G 3 レベルの低下；皮膚線維芽細胞増殖速度の増大；皮膚線維芽細胞増殖速度の低下；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの増加；平均体重の増加；平均体長の増大；総組織質量（T T M）の増加；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の増加；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の増加；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの減少；平均体重の減少；平均体長の低減；総組織質量（T T M）の減少；除脂肪体重（L B M）の減少；大腿骨の骨塩密度（B M D）の減少；椎骨の骨塩密度（B M D）の減少；全身、大腿、および脊椎の骨塩密度（B M D）の減少；骨塩量（B M C）の減少；骨塩密度指標の減少；体積測定による骨塩密度（v B M D）の減少；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の減少；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の減少；大理石骨病；骨粗鬆症；様々な組織における慢性炎症；両側水腎症（中程度から重症）および炎症；「洋ナシ型の腹部」、左右対称に腫大した腎臓（多嚢胞性の腎疾患を示唆する）；コルチ器官の変性；肝細胞機能不全障害；胆道閉塞；組織球の浸潤を特徴とする肝脾腫大症；小腸、リンパ節、および脾臓中の組織球増殖症；脾腫、リンパ節腫脹症、およびリンパ節腫脹症；咽頭扁桃腺および扁桃腺の過形成；軽度～中程度の過剰な延髄造血；ホモ接合性マウスは小さく、乾燥しており、そして少ない皮下脂肪の蓄積を示す；脂肪欠乏症；潰瘍性大腸炎；基底膜上の内蝸牛有毛細胞および外蝸牛有毛細胞細胞の両方の完全な欠失を特徴とする、内耳の感覚蝸牛有毛細胞のびまん性の顕著な変性；胃粘膜過形成および慢性的な炎症；胃重量の増加；精巢の精子形成障害；精巢上体の精液過少症および精子欠損；男性不妊症；リソソーム蓄積症；貧血；成長遅延；生存能力の低下；リンパ球の減少および脂肪欠乏症を伴う周産期致死性；ホモ接合性胚性致死；ならびにヘテロ接合性胚性致死のうちの少なくとも 1 つを示す、請求項 1 に記載の方法。

#### 【 0 1 2 2 】

2 2 . そのゲノムに、P R O 2 2 6、P R O 2 5 7、P R O 2 6 8、P R O 2 9 0、P R O 3 6 0 0 6、P R O 3 6 3、P R O 3 6 5、P R O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、P R O 1 1 2 5、P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、P R O 1 3 7 9、P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、P R O 1 4 7 4、P R O 1 5 5 0、P R O 1 5 7 1、P R O 1 5 7 2、P R O 1 7 5 9、P R O 1 9 0 4、P R O 3 5 1 9 3、P R O 4 3 4 1、P R O 4 3 4 8、P R O 4 3 6 9、P R O 4 3 8 1、P R O 4 4 0 7、P R O 4 4 2 5、P R O 4 9 8 5、P R O 4 9 8 9、P R O 5 7 3 7、P R O 5 8 0 0、P R O 5 9 9 3、P R O 6 0 1 7、P R O 7 1 7 4、P R O 9 7 4 4、P R O 9 8 2 1、P R O 9 8 5 2、P R O 9 8 7 3、P R O 1 0 1 9 6、P R O 3 4 7 7 8、P R O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9 0、P R O 3 8 4 6 5、P R O 3 8 6 8 3、もしくは P R O 8 5 1 6 1 ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている、非ヒトトランスジェニック動物に由来する単離細胞。

#### 【 0 1 2 3 】

2 3 . マウス細胞である、請求項 2 2 に記載の単離細胞。

#### 【 0 1 2 4 】

10

20

30

40

50

24．前記マウス細胞が、胚性幹細胞である、請求項23に記載の単離細胞。

【0125】

25．性別一致野生型同腹仔と比較して、前記非ヒトトランスジェニック動物が以下の表現型：神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常のうちの少なくとも1つを示す、請求項22に記載の単離細胞。

【0126】

26．PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型を調節する薬剤を同定する方法であって、本方法には：

(a) そのゲノムに、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

(b) (a) の非ヒトトランスジェニック動物の生理学的特徴を測定する工程；

(c) (b) の測定された生理学的特徴を性別一致野生型動物の生理学的特徴と比較する工程であって、ここで、前記野生型動物の前記生理学的特徴と異なる前記非ヒトトランスジェニック動物の前記生理学的特徴を、前記非ヒトトランスジェニック動物における前記遺伝子の破壊から生じる表現型と同定する、工程；

(d) (a) の非ヒトトランスジェニック動物に試験薬剤を投与する工程；および

(e) 前記試験薬剤が、前記非ヒトトランスジェニック動物における遺伝子破壊と関連する前記同定された表現型を調節するか否かを判定する工程が含まれる、方法。

【0127】

27．前記遺伝子破壊と関連する前記表現型が、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常または障害；脂質代謝障害；または発達異常を含む、請求項26に記載の方法。

【0128】

28．前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である、請求項27に記載の方法。

【0129】

10

20

30

40

50

29. 前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である、請求項27に記載の方法。

【0130】

30. 前記神経障害が、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである、請求項27に記載の方法。

【0131】

31. 前記神経障害が、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である、請求項27に記載の方法。

【0132】

32. 前記神経障害が、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である、請求項27に記載の方法。

【0133】

33. 前記神経障害が、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏または感覚障害である、請求項27に記載の方法。

【0134】

34. 前記眼の異常が、網膜の異常である、請求項27に記載の方法。

【0135】

35. 前記眼の異常が、視覚問題または失明と一致する、請求項27に記載の方法。

【0136】

36. 前記網膜の異常が、網膜色素変性症と一致する、請求項34に記載の方法。

【0137】

37. 前記網膜の異常が、網膜変性症または網膜の形成異常を特徴とする、請求項34に記載の方法。

【0138】

38. 前記網膜の異常が、網膜の形成異常、未熟児網膜症を含む様々な網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜/脈絡膜血管新生、隅角血管新生(ルベオシス)、眼球の血管新生性疾患、血管再狭窄、動静脈奇形(AVM)、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺肥大(グレーブス病を含む)、角膜および他の組織の移植、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖; 網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイデレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ・マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー・ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケーン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症、フリン・エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス・シェーンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンブルグ症候群、アラジール症候群、筋緊張性ジストロフィー、オリーブ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、バッセン・コルンツヴァイク症候群、無リボタンパク質血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症またはマンノシドーシスと一致する、請求項34に記載の方法。

【0139】

39. 前記眼の異常が、白内障である、請求項27に記載の方法。

【0140】

40. 前記白内障が、全身性疾患(例えば、ヒトダウン症候群、ハレルマン・ストレフ症候群、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー13-15、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症またはコンラーディ症候群)と一致する、請求項39に記載の方法。

【0141】

10

20

30

40

50

4 1 . 前記発達異常が、胚性致死または生存能低下を含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【 0 1 4 2 】

4 2 . 前記心臓血管、内皮または血管形成の障害が、動脈疾患（例えば、真性糖尿病；乳頭浮腫；視神経萎縮；アテローム性動脈硬化症；アングナ；急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大および鬱血性心不全などの心不全；高血圧症；炎症性血管炎；レイノー病およびレイノー現象；動脈瘤ならびに動脈再狭窄）；静脈およびリンパの障害（例えば、血栓性静脈炎、リンパ管炎およびリンパ浮腫）；末梢血管疾患；癌（例えば、血管腫瘍、例えば、血管腫（毛細管および海綿状）、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮腫、カポジ肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫）；腫瘍血管新生；外傷（例えば、創傷、熱傷および他の組織の傷害）、移植片固定、瘢痕；虚血再灌流傷害；関節リウマチ；脳血管疾患；急性腎不全などの腎疾患または骨粗鬆症である、請求項 2 7 に記載の方法。

10

【 0 1 4 3 】

4 3 . 前記免疫障害が、全身性エリテマトーデス；関節リウマチ；若年性慢性関節炎；脊椎関節症；全身硬化症（強皮症）；特発性炎症性筋障害（皮膚筋炎、多発性筋炎）；シェーグレン症候群；全身性血管炎；サルコイドーシス；自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症）；自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症）；甲状腺炎（グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）；真性糖尿病；免疫媒介性腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）；中枢および末梢神経系の脱髄疾患（例えば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー）；肝胆疾患（例えば、感染性肝炎（A 型、B 型、C 型、D 型、E 型肝炎および他の非肝向性のウイルスによる肝炎）、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎）；炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎；クローン病）；グルテン過敏性腸症およびホイップル病；水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬；アレルギー性疾患（例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹）；肺の免疫学的疾患（例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎）；または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患である、請求項 2 7 に記載の方法。

20

【 0 1 4 4 】

4 4 . 前記骨代謝の異常または障害が、関節炎、骨粗鬆症または大理石骨病である、請求項 2 7 に記載の方法。

30

【 0 1 4 5 】

4 5 . 前記非ヒトトランスジェニック動物が、性別一致野生型同腹仔と比較して、以下の生理学的特徴：オープンフィールド試験中の不安様応答の増大；オープンフィールド試験中の不安の低減；オープンフィールド試験中の自発運動活性の低下；ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム（明期中の活性の低下）；歩行回数の減少を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；概日リズムを有しない機能低下；歩行回数の増加を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；ストレス誘導性高体温の増大；ストレス誘導性高体温の低下；反転スクリーン試験中の運動協調性の低下；尾懸垂における不動の増加（抑鬱様応答の増大）；尾懸垂試験中の抑鬱様応答の増大；尾懸垂試験中の不動性の増大または抑鬱様応答の減少；プレパルス抑制試験中の驚愕応答の低下；難聴を示唆する無驚愕応答；もしくは難聴；感覚運動ゲーティング／注意の低下を伴うプレパルス抑制の低下；ホットプレート試験における反応性の低下；ホットプレート試験における反応までの時間の減少；眼科学的異常；平均動静脈比の増大；瞳孔拡大薬である塩酸シクロペントレートに対する抵抗性；細目；白斑を伴う細目；白内障；網膜変性症；視力障害；基礎体温の低下；心拍数の減少；平均収縮期血圧の上昇；インスリン感度の増大；平均絶食時血清中グルコースレベルの上昇；平均血清中グルコースレベルの低下；平均血清中コレステロールレベルの上昇；平均血清中コレステロールレベルの低下；平均血清中トリグリセリドレベルの上昇；平均血清中トリグリセリドレベルの低下；耐糖能の増大；耐糖能障

40

50



害；平均血清中インスリンレベルの低下；平均血清中カルシウムの上昇；ウロビリノーゲンの上昇、顕著な脂肪血；アルブミン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、リン、およびカリウムレベルの上昇；平均血清中アルカリホスファターゼレベルの上昇；血中尿素窒素の上昇；顆粒球の割合の増大；全白血球（WBC）数の増加；平均絶対好中球数の増大；好中球減少症；絶対リンパ球数の増加；絶対単球数の増加；脾臓中の単球およびDC（CD11b<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>c<sup>+</sup>）の増加；平均血小板数の増加；リンパ節中のナチュラルキラー（NK）細胞の上昇；好中球数の減少；ナチュラルキラー（NK）細胞の減少；平均赤血球（RBC）数、ヘモグロビン濃度、およびヘマトクリットの減少；平均の赤血球分布幅の増大；平均小体容積および平均小体へのグロビンの減少；平均血小板数の減少および血小板の容積の増大；リンパ節中のB細胞数の増加；パイアー斑におけるB細胞のサブタイプの増加；リンパ節中のB細胞のパーセンテージの上昇；CD25<sup>+</sup>細胞の増加；胸腺DNの増加、DP<sup>+</sup>T細胞の減少；リンパ節中のCD19<sup>+</sup>細胞の増加；骨髓細胞中のCD117の増加；CD4細胞の平均パーセンテージの上昇；CD8細胞の増加およびB細胞中での減少；腹腔洗浄におけるCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>LowCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11<sup>+</sup>LowおよびCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；骨髓中のB220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；脾臓中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞の増加；CD4およびCD8細胞のCD62hi、CD44intサブセットの増加；末梢CD117細胞の増加；パイアー斑の中のTcRbeta/CD38の増加、胸腺中のTcRbeta<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；リンパ節中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>HiCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>MedCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；脾臓中のCD62LHiCD44DimCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの低下；リンパ節および脾臓中のCD4およびCD8細胞の平均パーセンテージの低下；メモリーT細胞の増加（CD62L<sup>+</sup>LoCD44hiの増加）；T細胞：B細胞比の低下；ナイーブT細胞の減少；腹腔洗浄中のCD117細胞の減少；CD8細胞の平均パーセンテージの低下、卵白アルブミン負荷に対するIgG1応答の増大；卵白アルブミン負荷に対するIgG2a応答の増大；LPS負荷に対する平均血清IL-6応答の増大；LPS負荷に対するTNF $\alpha$ 応答の増大；LPS負荷に対する血清MCP-1応答の増大；平均血清中IgMレベルの増大；血清IgAの増加；平均血清IgG1の増大；平均血清IgG3の増大；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG1応答の低下；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG2a応答の低下；平均血清IgAレベルの低下；血清IgG2aレベルの低下；血清IgG3レベルの低下；皮膚線維芽細胞増殖速度の増大；皮膚線維芽細胞増殖速度の低下；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの増加；平均体重の増加；平均体長の増大；総組織質量（TTM）の増加；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の増加；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の増加；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの減少；平均体重の減少；平均体長の低減；総組織質量（TTM）の減少；除脂肪体重（LBM）の減少；大腿骨の骨塩密度（BMD）の減少；椎骨の骨塩密度（BMD）の減少；全身、大腿、および脊椎の骨塩密度（BMD）の減少；骨塩量（BMC）の減少；骨塩密度指標の減少；体積測定による骨塩密度（vBMD）の減少；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の減少；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の減少；大理石骨病；骨粗鬆症；様々な組織における慢性炎症；両側水腎症（中程度から重症）および炎症；「洋ナシ型の腹部」、左右対称に腫大した腎臓（多嚢胞性の腎疾患を示唆する）；コルチ器官の変性；肝細胞機能不全障害；胆道閉塞；組織球の浸潤を特徴とする肝脾腫大症；小腸、リンパ節、および脾臓中の組織球増殖症；脾腫、リンパ節腫脹症、およびリンパ節腫脹症；咽頭扁桃腺および扁桃腺の過形成；軽度～中程度の過剰な延髄造血；ホモ接合性マウスは小さく、乾燥しており、そして少ない皮下脂肪の蓄積を示す；脂肪欠乏症；潰瘍性大腸

炎；基底膜上の内蝸牛有毛細胞および外蝸牛有毛細胞細胞の両方の完全な欠失を特徴とする、内耳の感覚蝸牛有毛細胞のびまん性の顕著な変性；胃粘膜過形成および慢性的な炎症；胃重量の増加；精巣の精子形成障害；精巣上体の精液過少症および精子欠損；男性不妊症；リソソーム蓄積症；貧血；成長遅延；生存能力の低下；リンパ球の減少および脂肪欠乏症を伴う周産期致死性；ホモ接合性胚性致死；ならびにヘテロ接合性胚性致死のうちの少なくとも1つを示す、請求項26に記載の方法。

【0146】

46．請求項26に記載の方法によって同定された、薬剤。

【0147】

47．PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項46に記載の薬剤。

【0148】

48．前記アゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である、請求項47に記載の薬剤。

【0149】

49．前記アンタゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である、請求項47に記載の薬剤。

【0150】

10

20

30

40

50

50. PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する生理学的特徴を調節する薬剤を同定する方法であって、本方法には：

(a) そのゲノムに、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

(b) (a) の非ヒトトランスジェニック動物によって示される生理学的特徴を測定する工程；

(c) (b) の測定された生理学的特徴を性別一致野生型動物の生理学的特徴と比較する工程であって、ここで、前記野生型動物によって示される前記生理学的特徴と異なる前記非ヒトトランスジェニック動物によって示される前記生理学的特徴を、遺伝子の破壊に関連する生理学的特徴と同定する、工程；

(d) (a) の非ヒトトランスジェニック動物に試験薬剤を投与する工程；および

(e) 遺伝子破壊と関連する前記生理学的特徴が調節されているか否かを判定する工程が含まれる、方法。

#### 【0151】

51. 前記非ヒトトランスジェニック動物が、性別一致野生型同腹仔と比較して、以下の生理学的特徴：オープンフィールド試験中の不安様応答の増大；オープンフィールド試験中の不安の低減；オープンフィールド試験中の自発運動活性の低下；ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム（明期中の活性の低下）；歩行回数の減少を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；概日リズムを有しない機能低下；歩行回数の増加を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；ストレス誘導性高体温の増大；ストレス誘導性高体温の低下；反転スクリーン試験中の運動協調性の低下；尾懸垂における不動の増加（抑鬱様応答の増大）；尾懸垂試験中の抑鬱様応答の増大；尾懸垂試験中の不動性の増大または抑鬱様応答の減少；プレパルス抑制試験中の驚愕応答の低下；難聴を示唆する無驚愕応答；もしくは難聴；感覚運動ゲーティング／注意の低下を伴うプレパルス抑制の低下；ホットプレート試験における反応性の低下；ホットプレート試験における反応までの時間の減少；眼科学的異常；平均動静脈比の増大；瞳孔拡大薬である塩酸シクロペントレートに対する抵抗性；細目；白斑を伴う細目；白内障；網膜変性症；視力障害；基礎体温の低下；心拍数の減少；平均収縮期血圧の上昇；インスリン感度の増大；平均絶食

時血清中グルコースレベルの上昇；平均血清中グルコースレベルの低下；平均血清中コレステロールレベルの上昇；平均血清中コレステロールレベルの低下；平均血清中トリグリセリドレベルの上昇；平均血清中トリグリセリドレベルの低下；耐糖能の増大；耐糖能障害；平均血清中インスリンレベルの低下；平均血清中カルシウムの上昇；ウロビリノーゲンの上昇、顕著な脂肪血；アルブミン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、リン、およびカリウムレベルの上昇；平均血清中アルカリホスファターゼレベルの上昇；血中尿素窒素の上昇；顆粒球の割合の増大；全白血球（WBC）数の増加；平均絶対好中球数の増大；好中球減少症；絶対リンパ球数の増加；絶対単球数の増加；脾臓中の単球およびDC（CD11b<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>c<sup>+</sup>）の増加；平均血小板数の増加；リンパ節中のナチュラルキラー（NK）細胞の上昇；好中球数の減少；ナチュラルキラー（NK）細胞の減少；平均赤血球（RBC）数、ヘモグロビン濃度、およびヘマトクリットの減少；平均の赤血球分布幅の増大；平均小体容積および平均小体へのグロビンの減少；平均血小板数の減少および血小板の容積の増大；リンパ節中のB細胞数の増加；パイアー斑におけるB細胞のサブタイプの増加；リンパ節中のB細胞のパーセンテージの上昇；CD25<sup>+</sup>細胞の増加；胸腺DNの増加、DP<sup>+</sup>T細胞の減少；リンパ節中のCD19<sup>+</sup>細胞の増加；骨髓細胞中のCD117の増加；CD4細胞の平均パーセンテージの上昇；CD8細胞の増加およびB細胞中での減少；腹腔洗浄におけるCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>LowCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>LowおよびCD11b<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；骨髓中のB220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの上昇；脾臓中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞の増加；CD4およびCD8細胞のCD62hi、CD44intサブセットの増加；末梢CD117細胞の増加；パイアー斑の中のTcRbeta/CD38の増加、胸腺中のTcRbeta<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；リンパ節中のCD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>HiCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220<sup>+</sup>MedCD23<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；脾臓中のCD62L<sup>+</sup>HiCD44<sup>+</sup>DimCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Hi細胞のパーセンテージの低下；リンパ節および脾臓中のCD4およびCD8細胞の平均パーセンテージの低下；メモリーT細胞の増加（CD62L<sup>+</sup>loCD44<sup>+</sup>hiの増加）；T細胞：B細胞比の低下；ナイーブT細胞の減少；腹腔洗浄中のCD117細胞の減少；CD8細胞の平均パーセンテージの低下、卵白アルブミン負荷に対するIgG1応答の増大；卵白アルブミン負荷に対するIgG2a応答の増大；LPS負荷に対する平均血清IL-6応答の増大；LPS負荷に対するTNF<sup>+</sup>応答の増大；LPS負荷に対する血清MCP-1応答の増大；平均血清中IgMレベルの増大；血清IgAの増加；平均血清IgG1の増大；平均血清IgG3の増大；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG1応答の低下；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG2a応答の低下；平均血清IgAレベルの低下；血清IgG2aレベルの低下；血清IgG3レベルの低下；皮膚線維芽細胞増殖速度の増大；皮膚線維芽細胞増殖速度の低下；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの増加；平均体重の増加；平均体長の増大；総組織質量（TTM）の増加；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の増加；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の増加；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの減少；平均体重の減少；平均体長の低減；総組織質量（TTM）の減少；除脂肪体重（LBM）の減少；大腿骨の骨塩密度（BMD）の減少；椎骨の骨塩密度（BMD）の減少；全身、大腿、および脊椎の骨塩密度（BMD）の減少；骨塩量（BMC）の減少；骨塩密度指標の減少；体積測定による骨塩密度（vBMD）の減少；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の減少；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の減少；大理石骨病；骨粗鬆症；様々な組織における慢性炎症；両側水腎症（中程度から重症）および炎症；「洋ナシ型の腹部」、左右対称に腫大した腎臓（多嚢胞性の腎疾患を示唆する）；コルチ器官の変性；肝細胞機能不全障害；胆道閉塞；組織球の浸潤を特徴とする肝脾腫大症；小腸、

リンパ節、および脾臓中の組織球増殖症；脾腫、リンパ節腫脹症、およびリンパ節腫脹症；咽頭扁桃腺および扁桃腺の過形成；軽度～中程度の過剰な延髄造血；ホモ接合性マウスは小さく、乾燥しており、そして少ない皮下脂肪の蓄積を示す；脂肪欠乏症；潰瘍性大腸炎；基底膜上の内蝸牛有毛細胞および外蝸牛有毛細胞細胞の両方の完全な欠失を特徴とする、内耳の感覚蝸牛有毛細胞のびまん性の顕著な変性；胃粘膜過形成および慢性的な炎症；胃重量の増加；精巣の精子形成障害；精巣上体の精液過少症および精子欠損；男性不妊症；リソソーム蓄積症；貧血；成長遅延；生存能力の低下；リンパ球の減少および脂肪欠乏症を伴う周産期致死性；ホモ接合性胚性致死；ならびにヘテロ接合性胚性致死のうちの少なくとも１つを示す、請求項５０に記載の方法。

#### 【０１５２】

10

５２．請求項５０に記載の方法によって同定された、薬剤。

#### 【０１５３】

５３．PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項５２に記載の薬剤。

20

#### 【０１５４】

５４．前記アゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である、請求項５３に記載の薬剤。

30

#### 【０１５５】

５５．前記アンタゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO202

40

50

33、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である、請求項53に記載の薬剤。

【0156】

56．PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する行動を調節する薬剤を同定する方法であって、本方法には：

10

(a) そのゲノムに、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

20

(b) (a) の非ヒトトランスジェニック動物によって示される行動を観察する工程

30

(c) (b) の観察された行動を性別一致野生型動物の行動と比較する工程であって、ここで、前記野生型動物によって示される前記観察された行動と異なる、前記非ヒトトランスジェニック動物によって示される前記観察された行動を、遺伝子の破壊に関連する行動と同定する、工程；

(d) (a) の非ヒトトランスジェニック動物に試験薬剤を投与する工程；および

(e) 前記薬剤が、遺伝子破壊と関連する前記行動を調節するか否かを判定する工程が含まれる、方法。

【0157】

57．前記行動が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である、請求項56に記載の方法。

40

【0158】

58．前記行動が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である、請求項56に記載の方法。

【0159】

59．前記行動が、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである、請求項56に記載の方法。

【0160】

60．前記行動が、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である、請求項56に記載の方法。

【0161】

50

61．前記行動が、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である、請求項56に記載の方法。

【0162】

62．前記行動が、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏または感覚障害である、請求項56に記載の方法。

【0163】

63．請求項56に記載の方法によって同定された、薬剤。

【0164】

64．PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項63に記載の薬剤。 10 20

【0165】

65．前記アゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である、請求項64に記載の薬剤。 30

【0166】

66．前記アンタゴニストが、PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である、請求項64に記載の薬剤。 40 50

## 【 0 1 6 7 】

67. PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常を寛解するかあるいは調節する薬剤を同定する方法であって、本方法には：

(a) そのゲノムに、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

(b) 前記非ヒトトランスジェニック動物に試験薬剤を投与する工程；および

(c) 前記試験薬剤が、前記非ヒトトランスジェニック動物において、前記神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常を寛解または調節するか否かを判定する工程

が含まれる、方法。

## 【 0 1 6 8 】

68. 前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である、請求項67に記載の方法。

## 【 0 1 6 9 】

69. 前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である、請求項67に記載の方法。

## 【 0 1 7 0 】

70. 前記神経障害が、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである、請求項67に記載の方法。

## 【 0 1 7 1 】

71. 前記神経障害が、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である、請求項67に記載の方法。

## 【 0 1 7 2 】

72. 前記神経障害が、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である、請求項67に記載の方法。

## 【 0 1 7 3 】

10

20

30

40

50



73. 前記神経障害が、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏または感覚障害である、請求項67に記載の方法。

【0174】

74. 前記眼の異常が、網膜の異常である、請求項67に記載の方法。

【0175】

75. 前記眼の異常が、視覚問題または失明と一致する、請求項67に記載の方法。

【0176】

76. 前記網膜の異常が、網膜色素変性症と一致する、請求項74に記載の方法。

【0177】

77. 前記網膜の異常が、網膜変性症または網膜の形成異常を特徴とする、請求項74に記載の方法。

【0178】

78. 前記網膜の異常が、網膜の形成異常、未熟児網膜症を含む様々な網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜/脈絡膜血管新生、隅角血管新生(ルベオシス)、眼球の血管新生性疾患、血管再狭窄、動静脈奇形(AVM)、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺肥大(グレーブス病を含む)、角膜および他の組織の移植、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖; 網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイデレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ-マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー-ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症、フリン-エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス-シェンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンプルグ症候群、アラジール症候群、筋緊張性ジストロフィー、オリブ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、バッセン-コルンツヴァイク症候群、無リボタンパク質血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症またはマンノシドーシスと一致する、請求項74に記載の方法。

【0179】

79. 前記眼の異常が、白内障である、請求項67に記載の方法。

【0180】

80. 前記白内障が、全身性疾患(例えば、ヒトダウン症候群、ハレルマン-ストレフ症候群、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー13-15、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症またはコンラーディ症候群)である、請求項79に記載の方法。

【0181】

81. 前記発達異常が、胚性致死または生存能低下を含む、請求項67に記載の方法。

【0182】

82. 前記心臓血管、内皮または血管形成の障害が、動脈疾患(例えば、真性糖尿病; 乳頭浮腫; 視神経萎縮; アテローム性動脈硬化症; アンギナ; 急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大および鬱血性心不全などの心不全; 高血圧症; 炎症性血管炎; レイノー病およびレイノー現象; 動脈瘤ならびに動脈再狭窄); 静脈およびリンパの障害(例えば、血栓性静脈炎、リンパ管炎およびリンパ浮腫); 末梢血管疾患; 癌(例えば、血管腫瘍、例えば、血管腫(毛細管および海綿状)、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮腫、カボジ肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫); 腫瘍血管新生; 外傷(例えば、創傷、熱傷および他の組織の傷害)、移植片固定、瘢痕; 虚血再灌流傷害; 関節リウマチ; 脳血管疾患; 急性腎不全などの腎疾患または骨粗鬆症である、請求項67に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 8 3 】

8 3 . 前記免疫障害が、全身性エリテマトーデス；関節リウマチ；若年性慢性関節炎；脊椎関節症；全身硬化症（強皮症）；特発性炎症性筋障害（皮膚筋炎、多発性筋炎）；シェーグレン症候群；全身性血管炎；サルコイドーシス；自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症）；自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症）；甲状腺炎（グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）；真性糖尿病；免疫媒介性腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）；中枢および末梢神経系の脱髄疾患（例えば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー）；肝胆疾患（例えば、感染性肝炎（A型、B型、C型、D型、E型肝炎および他の非肝向性のウイルスによる肝炎）、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎）；炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎：クローン病）；グルテン過敏性腸症およびホイップル病；水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬；アレルギー性疾患（例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹）；肺の免疫学的疾患（例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎）；または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患である、請求項 6 7 に記載の方法。

10

## 【 0 1 8 4 】

8 4 . 前記骨代謝の異常または障害が、関節炎、骨粗鬆症または大理石骨病である、請求項 6 7 に記載の方法。

20

## 【 0 1 8 5 】

8 5 . 前記非ヒトトランスジェニック動物が、性別一致野生型同腹仔と比較して、以下の生理学的特徴：オープンフィールド試験中の不安様応答の増大；オープンフィールド試験中の不安の低減；オープンフィールド試験中の自発運動活性の低下；ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム（明期中の活性の低下）；歩行回数の減少を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；概日リズムを有しない機能低下；歩行回数の増加を含むホームケージ活動性試験中の異常な概日リズム；ストレス誘導性高体温の増大；ストレス誘導性高体温の低下；反転スクリーン試験中の運動協調性の低下；尾懸垂における不動の増加（抑鬱様応答の増大）；尾懸垂試験中の抑鬱様応答の増大；尾懸垂試験中の不動性の増大または抑鬱様応答の減少；プレパルス抑制試験中の驚愕応答の低下；難聴を示唆する無驚愕応答；もしくは難聴；感覚運動ゲーティング／注意の低下を伴うプレパルス抑制の低下；ホットプレート試験における反応性の低下；ホットプレート試験における反応までの時間の減少；眼科学的異常；平均動静脈比の増大；瞳孔拡大薬である塩酸シクロペントレートに対する抵抗性；細目；白斑を伴う細目；白内障；網膜変性症；視力障害；基礎体温の低下；心拍数の減少；平均収縮期血圧の上昇；インスリン感度の増大；平均絶食時血清中グルコースレベルの上昇；平均血清中グルコースレベルの低下；平均血清中コレステロールレベルの上昇；平均血清中コレステロールレベルの低下；平均血清中トリグリセリドレベルの上昇；平均血清中トリグリセリドレベルの低下；耐糖能の増大；耐糖能障害；平均血清中インスリンレベルの低下；平均血清中カルシウムの上昇；ウロビリノーゲンの上昇、顕著な脂肪血；アルブミン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、リン、およびカリウムレベルの上昇；平均血清中アルカリホスファターゼレベルの上昇；血中尿素窒素の上昇；顆粒球の割合の増大；全白血球（WBC）数の増加；平均絶対好中球数の増大；好中球減少症；絶対リンパ球数の増加；絶対単球数の増加；脾臓中の単球およびDC（CD11b<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>c<sup>+</sup>）の増加；平均血小板数の増加；リンパ節中のナチュラルキラー（NK）細胞の上昇；好中球数の減少；ナチュラルキラー（NK）細胞の減少；平均赤血球（RBC）数、ヘモグロビン濃度、およびヘマトクリットの減少；平均の赤血球分布幅の増大；平均小体容積および平均小体へのグロビンの減少；平均血小板数の減少および血小板の容積の増大；リンパ節中のB細胞数の増加；パイアー斑におけるB細胞のサブタイプの増加；リンパ節中のB細胞のパーセンテージの上昇；CD25<sup>+</sup>細胞の増加；胸腺DNの増加、DP<sup>+</sup>T細胞の減少；リンパ節中のCD19<sup>+</sup>細胞の増加；骨髓細胞

30

40

50

中のCD117の増加；CD4細胞の平均パーセンテージの上昇；CD8細胞の増加およびB細胞中での減少；腹腔洗浄におけるCD11b+細胞のパーセンテージの上昇；B220+CD11b<sup>Low</sup>CD23<sup>-</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220-CD11<sup>Low</sup>およびCD11b<sup>-</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220-CD11b<sup>Hi</sup>細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220+CD11b-CD23+細胞のパーセンテージの低下；骨髓中のB220-CD43<sup>Hi</sup>細胞のパーセンテージの上昇；脾臓中のCD11b+CD11c<sup>-</sup>細胞の増加；CD4およびCD8細胞のCD62<sup>hi</sup>、CD44<sup>int</sup>サブセットの増加；末梢CD117細胞の増加；パイアー斑の中のTcRβ<sup>α</sup>/CD38の増加、胸腺中のTcRβ<sup>α</sup>+細胞のパーセンテージの上昇；リンパ節中のCD11b+CD11c<sup>+</sup>のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220+<sup>Hi</sup>CD23+細胞のパーセンテージの上昇；腹腔洗浄中のB220+<sup>Med</sup>CD23<sup>-</sup>細胞のパーセンテージの低下；脾臓中のCD62<sup>L</sup><sup>Hi</sup>CD44<sup>Dim</sup>CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの低下；B220-CD11b<sup>Hi</sup>細胞のパーセンテージの低下；リンパ節および脾臓中のCD4およびCD8細胞の平均パーセンテージの低下；メモリーT細胞の増加（CD62<sup>L</sup><sup>lo</sup>CD44<sup>hi</sup>の増加）；T細胞：B細胞比の低下；ナイーブT細胞の減少；腹腔洗浄中のCD117細胞の減少；CD8細胞の平均パーセンテージの低下、卵白アルブミン負荷に対するIgG1応答の増大；卵白アルブミン負荷に対するIgG2a応答の増大；LPS負荷に対する平均血清IL-6応答の増大；LPS負荷に対するTNF<sup>α</sup>応答の増大；LPS負荷に対する血清MCP-1応答の増大；平均血清中IgMレベルの増大；血清IgAの増加；平均血清IgG1の増大；平均血清IgG3の増大；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG1応答の低下；卵白アルブミン負荷に対する血清IgG2a応答の低下；平均血清IgAレベルの低下；血清IgG2aレベルの低下；血清IgG3レベルの低下；皮膚線維芽細胞増殖速度の増大；皮膚線維芽細胞増殖速度の低下；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの増加；平均体重の増加；平均体長の増大；総組織質量（TTM）の増加；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の増加；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の増加；総体脂肪および総脂肪質量の平均パーセントの減少；平均体重の減少；平均体長の低減；総組織質量（TTM）の減少；除脂肪体重（LBM）の減少；大腿骨の骨塩密度（BMD）の減少；椎骨の骨塩密度（BMD）の減少；全身、大腿、および脊椎の骨塩密度（BMD）の減少；骨塩量（BMC）の減少；骨塩密度指標の減少；体積測定による骨塩密度（vBMD）の減少；大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の減少；椎骨骨梁の平均体積、平均数および平均結合性密度の減少；大理石骨病；骨粗鬆症；様々な組織における慢性炎症；両側水腎症（中程度から重症）および炎症；「洋ナシ型の腹部」、左右対称に腫大した腎臓（多嚢胞性の腎疾患を示唆する）；コルチ器官の変性；肝細胞機能不全障害；胆道閉塞；組織球の浸潤を特徴とする肝脾腫大症；小腸、リンパ節、および脾臓中の組織球増殖症；脾腫、リンパ節腫脹症、およびリンパ節腫脹症；咽頭扁桃腺および扁桃腺の過形成；軽度～中程度の過剰な延髄造血；ホモ接合性マウスは小さく、乾燥しており、そして少ない皮下脂肪の蓄積を示す；脂肪欠乏症；潰瘍性大腸炎；基底膜上の内蝸牛有毛細胞および外蝸牛有毛細胞細胞の両方の完全な欠失を特徴とする、内耳の感覚蝸牛有毛細胞のびまん性の顕著な変性；胃粘膜過形成および慢性的な炎症；胃重量の増加；精巣の精子形成障害；精巣上体の精液過少症および精子欠損；男性不妊症；リソソーム蓄積症；貧血；成長遅延；生存能力の低下；リンパ球の減少および脂肪欠乏症を伴う周産期致死性；ホモ接合性胚性致死；ならびにヘテロ接合性胚性致死のうちの少なくとも1つを示す、請求項67に記載の方法。

#### 【0186】

86．請求項67に記載の方法によって同定された、薬剤。

#### 【0187】

87．PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1

343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項86に記載の薬剤。

【0188】

10

88．前記アゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である、請求項87に記載の薬剤。

20

【0189】

89．前記アンタゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である、請求項87に記載の薬剤。

30

【0190】

90．請求項67に記載の方法によって同定された、治療薬。

【0191】

40

91．PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290

50

0、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの発現を調節する薬剤を同定する方法であって、本本法には：

(a) 試験薬剤を、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを発現している宿主細胞と接触させる工程；

(b) 試験薬剤が宿主細胞によるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの発現を調節するかどうかを決定する工程、が含まれる、方法。

【0192】

92．請求項91に記載の方法によって同定された、薬剤。

【0193】

93．PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項92に記載の薬剤。

【0194】

94．前記アゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO

4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である、請求項93に記載の薬剤。

【0195】

95. 前記アンタゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である、請求項93に記載の薬剤。

10

20

【0196】

96. PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する状態に影響を与えることができる治療薬を評価する方法であって、本方法には：

30

(a) そのゲノムに、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている非ヒトトランスジェニック動物を提供する工程；

40

(b) (a) の非ヒトトランスジェニック動物の生理学的特徴を測定する工程；

(c) (b) の測定された生理学的特徴を性別一致野生型動物の生理学的特徴と比較する工程であって、ここで、前記野生型動物の前記生理学的特徴と異なる前記非ヒトトランス

50

ジェニック動物の前記生理学的特徴を、前記非ヒトトランスジェニック動物における前記遺伝子の破壊から生じる状態と同定する、工程；

(d) (a) の非ヒトトランスジェニック動物に試験薬剤を投与する工程；および

(e) 前記非ヒトトランスジェニック動物における遺伝子破壊に関連する前記同定された状態に対する前記試験薬剤の作用を評価する工程が含まれる、方法。

【0197】

97. 前記状態が、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常または障害；脂質代謝障害；または発達異常である、請求項96に記載の方法。

10

【0198】

98. 請求項96に記載の方法によって同定される治療薬。

【0199】

99. PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項98に記載の治療薬。

20

【0200】

100. 前記アゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である、請求項99に記載の治療薬。

30

【0201】

101. 前記アンタゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO

40

50

9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である、請求項99に記載の治療薬。

【0202】

102．請求項98に記載の治療薬を含む薬学的組成物。

【0203】

103．PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；または胚性致死を処置または予防または寛解する方法であって、本方法には、前記障害をすでに有しているかもしくは前記障害に罹患しやすい被験体、または前記障害が予防される、そのような処置が必要な被験体に対して、請求項94に記載の治療薬、またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストの治療有効量を投与する工程が含まれ、それによって、前記障害が処置または予防または寛解される、方法。

【0204】

104．前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である、請求項103に記載の方法。

【0205】

105．前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である、請求項103に記載の方法。

【0206】

106．前記神経障害が、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである、請求項103に記載の方法。

【0207】

107．前記神経障害が、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である、請求項103に記載の方法。

【0208】

108．前記神経障害が、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である、請求項103に記載の方法。

【0209】

109．前記神経障害が、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏または感覚障害である、請求項103に記載の方法。

【0210】

110．前記眼の異常が、網膜の異常である、請求項103に記載の方法。

【0211】

111．前記眼の異常が、視覚問題または失明と一致する、請求項103に記載の方法。

【0212】

112．前記網膜の異常が、網膜色素変性症と一致する、請求項110に記載の方法。

10

20

30

40

50



## 【 0 2 1 3 】

1 1 3 . 前記網膜の異常が、網膜変性症または網膜の形成異常を特徴とする、請求項 1 1 0 に記載の方法。

## 【 0 2 1 4 】

1 1 4 . 前記網膜の異常が、網膜の形成異常、未熟児網膜症を含む様々な網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜/脈絡膜血管新生、隅角血管新生(ルベオース)、眼球の血管新生性疾患、血管再狭窄、動静脈奇形(AVM)、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺肥大(グレーブス病を含む)、角膜および他の組織の移植、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖;網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイデレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ-マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー-ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケーン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症、フリン-エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス-シェーンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンブルグ症候群、アラジール症候群、筋緊張性ジストロフィー、オリブ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、バッセン-コルンツヴァイク症候群、無リポタンパク質血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症またはマンノシドーシスと一致する、請求項 1 1 0 に記載の方法。

10

20

## 【 0 2 1 5 】

1 1 5 . 前記眼の異常が、白内障である、請求項 1 0 3 に記載の方法。

## 【 0 2 1 6 】

1 1 6 . 前記白内障が、全身性疾患(例えば、ヒトダウン症候群、ハレルマン-ストレフ症候群、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー 1 3 - 1 5、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症またはコンラーディ症候群)である、請求項 1 1 5 に記載の方法。

## 【 0 2 1 7 】

1 1 7 . 前記発達異常が、胚性致死または生存能低下を含む、請求項 1 0 3 に記載の方法。

30

## 【 0 2 1 8 】

1 1 8 . 前記心臓血管、内皮または血管形成の障害が、動脈疾患(例えば、真性糖尿病;乳頭浮腫;視神経萎縮;アテローム性動脈硬化症;アンギナ;急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大および鬱血性心不全などの心不全;高血圧症;炎症性血管炎;レイノー病およびレイノー現象;動脈瘤ならびに動脈再狭窄);静脈およびリンパの障害(例えば、血栓静脈炎、リンパ管炎およびリンパ浮腫);末梢血管疾患;癌(例えば、血管腫瘍、例えば、血管腫(毛細管および海綿状)、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮腫、カボジ肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫);腫瘍血管新生;外傷(例えば、創傷、熱傷および他の組織の傷害)、移植片固定、瘢痕;虚血再灌流傷害;関節リウマチ;脳血管疾患;急性腎不全などの腎疾患または骨粗鬆症である、請求項 1 0 3 に記載の方法。

40

## 【 0 2 1 9 】

1 1 9 . 前記免疫障害が、全身性エリテマトーデス;関節リウマチ;若年性慢性関節炎;脊椎関節症;全身硬化症(強皮症);特発性炎症性筋障害(皮膚筋炎、多発性筋炎);シェーグレン症候群;全身性血管炎;サルコイドーシス;自己免疫性溶血性貧血(免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症);自己免疫性血小板減少症(特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症);甲状腺炎(グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎);真性糖尿病;免疫媒介性腎疾患(糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎);中枢および末梢神経系の脱髄疾患(例えば、多発性硬化症、特発性脱

50

髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー)；肝胆疾患(例えば、感染性肝炎(A型、B型、C型、D型、E型肝炎および他の非肝向性のウイルスによる肝炎)、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎)；炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎：クローン病)；グルテン過敏性腸症およびホイップル病；水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬；アレルギー性疾患(例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹)；肺の免疫学的疾患(例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎)；または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患である、請求項103に記載の方法。

#### 【0220】

120．前記骨代謝の異常または障害が、関節炎、骨粗鬆症または大理石骨病である、請求項103に記載の方法。

#### 【0221】

121．PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常を寛解または調節する薬剤を同定する方法であって、本方法には：

(a) 非ヒトトランスジェニック動物細胞培養物を提供する工程であって、前記培養物の個々の細胞には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている、工程；

(b) 前記細胞培養に試験薬剤を投与する工程；および

(c) 前記試験薬剤が、前記細胞培養物において、前記神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；眼の異常；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；脂質代謝障害；または発達異常を寛解または調節するか否かを判定する工程が含まれる、方法。

#### 【0222】

122．前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の増大である、請求項121に記載の方法。

#### 【0223】

123．前記神経障害が、オープンフィールド活動性試験中の不安様応答の低減である

10

20

30

40

50

、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【 0 2 2 4 】

1 2 4 . 前記神経障害が、ホームケージ活動性試験中の異常な概日リズムである、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【 0 2 2 5 】

1 2 5 . 前記神経障害が、反転スクリーン試験中の運動協調性の増大である、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【 0 2 2 6 】

1 2 6 . 前記神経障害が、反転スクリーン試験中の障害性の運動協調性である、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【 0 2 2 7 】

1 2 7 . 前記神経障害が、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏または感覚障害である、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【 0 2 2 8 】

1 2 8 . 前記眼の異常が、網膜の異常である、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【 0 2 2 9 】

1 2 9 . 前記眼の異常が、視覚問題または失明と一致する、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【 0 2 3 0 】

1 3 0 . 前記網膜の異常が、網膜色素変性症と一致する、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【 0 2 3 1 】

1 3 1 . 前記網膜の異常が、網膜変性症または網膜の形成異常を特徴とする、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【 0 2 3 2 】

1 3 2 . 前記網膜の異常が、網膜の形成異常、未熟児網膜症を含む様々な網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜 / 脈絡膜血管新生、隅角血管新生 ( ルベオシス )、眼球の血管新生性疾患、血管再狭窄、動静脈奇形 ( A V M )、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺肥大 ( グレーブス病を含む )、角膜および他の組織の移植、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖 ; 網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイデレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ - マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー - ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケーン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症、フリン - エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス - シェーンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンブルグ症候群、アラジール症候群、筋緊張性ジストロフィー、オリーブ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、バッセン - コルンツヴァイク症候群、無リポタンパク質血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症またはマンノシドーシスと一致する、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【 0 2 3 3 】

1 3 3 . 前記眼の異常が、白内障である、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【 0 2 3 4 】

1 3 4 . 前記白内障が、全身性疾患 ( 例えば、ヒトダウン症候群、ハレルマン - ストレフ症候群、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー 1 3 - 1 5 、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症またはコンラーディ症候群 ) である、請求項 1 3 3 に記載の方法。

【 0 2 3 5 】

135. 前記発達異常が、胚性致死または生存能低下を含む、請求項121に記載の方法。

【0236】

136. 前記心臓血管、内皮または血管形成の障害が、動脈疾患（例えば、真性糖尿病；乳頭浮腫；視神経萎縮；アテローム性動脈硬化症；アングナ；急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大および鬱血性心不全などの心不全；高血圧症；炎症性血管炎；レイノー病およびレイノー現象；動脈瘤ならびに動脈再狭窄）；静脈およびリンパの障害（例えば、血栓静脈炎、リンパ管炎およびリンパ浮腫）；末梢血管疾患；癌（例えば、血管腫瘍、例えば、血管腫（毛細管および海綿状）、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮腫、カボジ肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫）；腫瘍血管新生；外傷（例えば、創傷、熱傷および他の組織の傷害）、移植片固定、瘢痕；虚血再灌流傷害；関節リウマチ；脳血管疾患；急性腎不全などの腎疾患または骨粗鬆症である、請求項121に記載の方法。

10

【0237】

137. 前記免疫障害が、全身性エリテマトーデス；関節リウマチ；若年性慢性関節炎；脊椎関節症；全身硬化症（強皮症）；特発性炎症性筋障害（皮膚筋炎、多発性筋炎）；シェーグレン症候群；全身性血管炎；サルコイドーシス；自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症）；自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症）；甲状腺炎（グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）；真性糖尿病；免疫媒介性腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）；中枢および末梢神経系の脱髄疾患（例えば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー）；肝胆疾患（例えば、感染性肝炎（A型、B型、C型、D型、E型肝炎および他の非肝向性のウイルスによる肝炎）、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎）；炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎：クローン病）；グルテン過敏性腸症およびホイップル病；水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬；アレルギー性疾患（例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹）；肺の免疫学的疾患（例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎）；または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患である、請求項121に記載の方法。

20

30

【0238】

138. 前記骨代謝の異常または障害が、関節炎、骨粗鬆症または大理石骨病である、請求項121に記載の方法。

【0239】

139. 請求項121に記載の方法によって同定された、薬剤。

【0240】

140. PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項139に記載の薬剤。

40

【0241】

141. 前記アゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗P

50

PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である、請求項140に記載の薬剤。

10

**【0242】**

142．前記アンタゴニストが、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体である、請求項140に記載の薬剤。

20

**【0243】**

143．請求項121に記載の方法によって同定された、治療薬。

**【0244】**

144．PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する表現型を調節する方法であって前記方法は、前記表現型をすでに有し得るか、または前記表現型を有する傾向にあり得るか、もしくは前記表現型を予防すべき状態であり得る被験体に、有効量の請求項46に記載の薬剤またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与する工程を含み、それにより、前記表現型を効果的に調節する、方法。

30

40

**【0245】**

145．PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO

50

1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する生理学的特徴を調節する方法であって、前記方法は、前記生理学的特徴をすでに示し得るか、または前記生理学的特徴を示す傾向にあり得るか、もしくは前記生理学的特徴を予防すべき状態であり得る被験体に、有効量の請求項52に記載の薬剤またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与する工程を含み、それにより、前記生理学的特徴を効果的に調節する、方法。前記方法は、前記生理学的特徴をすでに示し得るか、または前記生理学的特徴を示す傾向にあり得るか、もしくは前記生理学的特徴を予防すべき状態であり得る被験体に、有効量の請求項52に記載の薬剤またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与する工程を含み、それにより、前記生理学的特徴を効果的に調節する、方法。

10

## 【0246】

146、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する行動を調節する方法であって、前記方法は、前記行動をすでに示し得るか、または前記行動を示す傾向にあり得るか、もしくは前記示される行動を予防すべき状態であり得る被験体に、有効量の請求項63に記載の薬剤またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与する工程を含み、それにより、前記行動を効果的に調節する、方法。

20

30

## 【0247】

147、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの発現を調節する方法であって、前記方法は、前記PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PR

40

50

PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを発現している宿主細胞に有効量の請求項92に記載の薬剤またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与する工程を含み、それによって、前記ポリペプチドの発現を効果的に調節する、方法。

【0248】

148. PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が関連する状態を調節する方法であって、本方法には、前記状態を有しているか、もしくは前記状態に罹患しやすい被験体、または前記状態が予防される被験体に対して、請求項98に記載の治療薬、またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストの治療有効量が投与される工程が含まれ、それによって前記状態が効率よく調節される、方法。

【0249】

149. PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊に関連する、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；または胚性致死を処置または予防または寛解する方法であって、本方法には：非ヒトトランスジェニック動物細胞培養物（前記培養物の個々の細胞には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、

10

20

30

40

50

PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊が含まれている)に対して、請求項139に記載の薬剤、またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストの治療有効量を投与する工程が含まれ、それによって、前記障害が効率よく処置または予防または寛解される、方法。

【発明を実施するための最良の形態】

【0250】

好ましい実施形態の詳細な説明

#### I. 定義

用語「PROポリペプチド」および「PRO」とは、本明細書中で使用されるとき、および番号の表記が直後に来る場合は、種々のポリペプチドのことをいい、ここで完全な表記(すなわちPRO/番号)は本明細書に記載する特定のポリペプチド配列のことをいう。用語「PRO/番号ポリペプチド」および「PRO/番号」(ここで、用語「番号」が本明細書中で使用される実際の番号の表記として提示される)は、ネイティブの配列のポリペプチドおよびポリペプチド改変体(これは本明細書においてさらに定義する)を包含する。本明細書中に記載されるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドは、様々な供給源から、例えば、複数のヒトの組織タイプから、もしくは別の供給源から単離することができ、また、組み換え方法もしくは合成方法によって調製することもできる。用語「PROポリペプチド」とは、本明細書に開示した各々の個々のPRO/番号ポリペプチドのことをいう。「PROポリペプチド」にあてはまる本明細書中のすべての開示は、ポリペプチドの各々を、個別にならびに総括していう。例えば、その調製、精製、誘導、それに対する抗体の形成、その投与、それを含有する組成物、それによる疾患の処置に関する記載などは本発明のポリペプチドの各々に個別に関するものである。用語「PROポリペプチド」はまた、本明細書に開示したPRO/番号ポリペプチドの改変体を含む。

【0251】

「自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド」には、自然界に存在しているものに由来する対応するPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PR

10

20

30

40

50



O365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドと同じアミノ酸配列を有しているポリペプチドが含まれる。そのような自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドは、自然界から単離することができ、また、組み換え手段もしくは合成手段によって生産することもできる。用語「自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド」には、特に、特異的なPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの自然界に存在している短縮型または分泌型（例えば、細胞外ドメインの配列）、自然界に存在している変異体形態（例えば、異なるようにスプライシングされた形態）、およびこれらのポリペプチドの自然界に存在している対立変異体が含まれる。本発明により、本明細書中に開示される自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PR

O365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドが提供される。これは成熟配列であるか、または添付の図面に示される全長のアミノ酸配列が含まれている全長の自然界に存在している配列のポリペプチドである。開始コドンおよび終止コドンは、図面中では太字で示し、下線を付した。しかし、添付の図面の中で開示されるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドは、図の中に1位のアミノ酸として本明細書中で指定されるメチオニン残基で始まるように示されるが、図中の1位のアミノ酸よりも上流もしくは下流のいずれかに存在している他のメチオニン残基が、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドについての開始アミノ酸残基として使用される場合があることも考えられ、そしてそれは可能である。

10

20

30

40

50

**【0252】**

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの「細胞外

50

1956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの細胞外ドメインには、実施例または明細書の中で同定されたような膜貫通ドメイン/細胞外ドメインの境界のいずれかの側の上にある約5個またはそれ未満のアミノ酸が含まれ得、そして、関連するシグナルペプチドを伴うかまたはそれらが含まれないそのようなポリペプチド、ならびに、それらをコードする核酸が、本発明によって意図される。

#### 【0253】

本明細書中に開示される様々なPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの「シグナルペプチド」のおおよその位置は、本明細書および/または添付の図面の中に示される。しかし、シグナルペプチドのC末端側の境界は様々であり得るが、ほとんどは、本明細書中で最初に同定されたシグナルペプチドのC末端側の境界のいずれかの側にある約5アミノ酸を超えないことに留意されない。ここでは、シグナルペプチドのC末端側の境界は、そのタイプのアミノ酸配列エレメントを同定するために当該分野で日常的に使用されている基準にしたがって同定され得る（例えば、Nielsen et al., Prot. Eng. 10:1-6 (1997) および von Heijne et al., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)）。さらに、いくつかの場合において、分泌ポリペプチドからのシグナル配列の切断は、完全に均一ではなく、2つ以上の分泌種をもたらす。これらの成熟ポリペプチド（シグナルペプチドは、本明細書において同定されたシグナルペプチドのC末端の境界のいずれかの側の約5アミノ酸以内において切断されている）およびそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明により企図される。

#### 【0254】

「PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド変異体」は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO49

89、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド、好ましくは、本明細書中に開示される全長の自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド配列、本明細書中に開示されるシグナルペプチドが含まれていないPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド配列、本明細書中に開示される、シグナルペプチドが含まれているかまたはシグナルペプチドが含まれていないPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの細胞外ドメイン、あるいは、本明細書中に開示される全長のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PR

PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド配列の任意の他の断片（例えば、全長のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの完全なコード配列の一部のみを提示する核酸によってコードされるもの）と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有している、本明細書中で定義される活性のあるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを意味する。そのようなPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド変異体としては、例えば、全長の自然界に存在しているアミノ酸配列のN-もしくはC-末端で、1つ以上のアミノ酸が付加されているかまたは欠失させられている、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド挙げられる。通常は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、P

10

20

30

40

50

956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの細胞外ドメイン、あるいは、本明細書中に開示される全長のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド配列の任意の他の特異的に定義される断片を有しているか、あるいはそれらに対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有しているか、またはそれらに対して、少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%のアミノ酸配列同一性を有しているであろう。通常、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161変異体ポリペプチドは、約10アミノ酸長であるかまたは少なくとも約10アミノ酸長であるか、あるいは、少なくとも約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600アミノ酸長であるか、またはそれ以上である。任意選択で、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161変異体ポリペプチドは、自然界に存在しているPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO134



3、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド配列と比較してわずかに1つの保存的アミノ酸置換を有するか、あるいは、自然界に存在しているPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド配列と比較して、わずかに2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の保存的アミノ酸置換を有するであろう。

10

20

#### 【0255】

本明細書中で同定されたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列がアラインメントされ、そして必要に応じて、最大のパーセント配列同一性を得るためにギャップが導入された後の、そして、配列同一性の一部としてはいずれの保存的置換も考慮されない、特異的なPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド配列の中のアミノ酸残基と同一である候補の配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、

30

40

50

当業者の範囲内の様々な方法、例えば、公的に入手可能なコンピュータソフトウェア（例えば、BLAST、BLAST2、ALIGNまたはMegalign（DNASTAR）ソフトウェア）を用いて達成することができる。当業者は、比較すべき配列の完全長に亘って最大アラインメントを達成するために必要ないずれかのアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書の目的のためには、%アミノ酸同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて生成し、ここでALIGN-2プログラムに関する完全なソースコードを以下の表1に示す。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.によって著されており、そして以下の表1に示されるソースコードが、U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559のユーザーマニュアルにファイルされている。ここでは、U.S. Copyright Registration No. TXU510087として登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaから公的に入手することができ、または、以下の表1に示すソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX（登録商標）V4.0D上で使用するためにコンパイルしなければならない。すべての配列比較パラメータはALIGN-2プログラムにより設定され、変更しない。

#### 【0256】

アミノ酸配列比較のためにALIGN-2を使用する場合において、所与のアミノ酸配列Bに対する所与のアミノ酸配列Aの%アミノ酸配列同一性（これは代替として、所与のアミノ酸配列Bに対する特定の%アミノ酸配列同一性を有するか、または含む所与のアミノ酸配列Aと表現できる）は、以下のとおり：

$$100 \times \text{分数 } X / Y$$

式中、Xは、AとBのプログラムによるアラインメントにおける配列アラインメントプログラムALIGN-2によって同定された適合としてスコアされたアミノ酸残基の数であり、Yは、Bの中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合には、Bに対するAの%アミノ酸配列同一性は、Aに対するBの%アミノ酸配列同一性とは等しくないであろうことが理解されるであろう。この方法を使用する%アミノ酸配列同一性の計算の一例として、表2および3には、「PRO」と指定されたアミノ酸配列に対する「比較タンパク質（Comparison Protein）」と指定されたアミノ酸配列の%アミノ酸配列同一性を計算するための方法が示される。ここでは、「PRO」は、目的の仮想PROポリペプチドのアミノ酸配列を示し、「比較タンパク質」は、目的の「PRO」ポリペプチドがそれに対して比較されるポリペプチドのアミノ酸配列を示し、そして「X」、「Y」、および「Z」はそれぞれ、様々な仮想アミノ酸残基を示す。他に特段の記載がない限り、本明細書で使用するすべての%アミノ酸配列同一性の値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを用いて直前のパラグラフにおいて記載した通りに得られる。

#### 【0257】

「PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161変異体ポリヌクレオチ

ド」、あるいは、「PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161変異体核酸配列」は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする核酸分子、好ましくは、本明細書中で定義される活性のあるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを意味し、これらは、本明細書中に開示される全長の自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列、本明細書中に開示されるシグナルペプチドが含まれていない全長の自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、P

RO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド配列、本明細書中に開示される、シグナルペプチドが含まれているかもしくは含まれていないPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの細胞外ドメイン、あるいは、本明細書中に開示される全長のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド配列の任意の他の断片（例えば、全長のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの完全なコード配列のわずかに一部を示す核酸によってコードされるもの）をコードしているヌクレオチド配列と少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する。通常、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4

341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161変異体ポリヌクレオチドは、本明細書中に開示される全長の自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド

10

20

配列、本明細書中に開示されるシグナルペプチドが含まれていない全長の自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド配列、本明細書中に開示される、シグナル配列が含まれているかもしくは含まれていないPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの細胞外ドメイン、あるいは、本明細書中に開示される全長のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PR

30

40

50

PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド配列の任意の他の断片をコードする核酸配列と、少なくとも約80%の核酸配列同一性を有するか、あるいは、少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の核酸配列同一性を有するであろう。改変体は、ネイティブヌクレオチド配列を包含しない。

10

**【0258】**

通常、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約5ヌクレオチド長であるか、あるいは、少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、または1000ヌクレオチド長である。この状況では、用語「約」は、記載される長さのプラスマイナス10%のヌクレオチド配列の長さを意味する。

20

30

40

**【0259】**

本明細書中で同定されたPRO226-、PRO257-、PRO268-、PRO290-、PRO36006-、PRO363-、PRO365-、PRO382-、PRO444-、PRO705-、PRO1071-、PRO1125-、PRO1134-、PRO1155-、PRO1281-、PRO1343-、PRO1379-、PRO1380-、PRO1387-、PRO1419-、PRO1433-、PRO1474-、PRO1550-、PRO1571-、PRO1572-、PRO1759-、PRO1904-、PRO35193-、PRO4341-、PRO4348-、PRO4369-、PRO4381-、PRO4407-、PRO4425-、PRO4985-、

50

PRO4989 -、PRO5737 -、PRO5800 -、PRO5993 -、PRO6017 -、PRO7174 -、PRO9744 -、PRO9821 -、PRO9852 -、PRO9873 -、PRO10196 -、PRO34778 -、PRO20233 -、PRO21956 -、PRO57290 -、PRO38465 -、PRO38683 -、もしくはPRO85161 -をコードする核酸配列に関する「パーセント (%) 核酸配列同一性」は、配列がアラインメントされ、そして必要に応じて、最大のパーセント配列同一性を得るためにギャップが導入された後の、目的のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161核酸配列の中のヌクレオチドと同一である候補の配列中のヌクレオチドのパーセンテージとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の範囲内の様々な方法、例えば、公的に入手可能なコンピュータソフトウェア（例えば、BLAST、BLAST - 2、ALIGNまたはMegalign (DNASTAR) ソフトウェア）を用いて達成することができる。しかしながら、本明細書の目的のためには、%核酸同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN - 2を用いて生成し、ここでALIGN - 2プログラムに関する完全なソースコードを以下の表1に示す。ALIGN - 2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. により作成され、そして以下の表1に示すソースコードは、米国著作権局Washington D.C., 20559においてユーザー文書と共に提出されており、米国著作権登録番号TXU510087として登録されている。ALIGN - 2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaから公的に入手することができ、または、以下の表1に示すソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN - 2プログラムは、UNIX (登録商標) オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX (登録商標) V4.0D上で使用するためにコンパイルしなければならない。すべての配列比較パラメータはALIGN - 2プログラムにより設定され、変更しない。

#### 【0260】

核酸配列比較のためにALIGN - 2を使用する場合において、所与の核酸配列Dに対する所与の核酸配列Cの%核酸配列同一性（これは代替として、所与の核酸配列Dに対する特定の%核酸配列同一性を有するか、または含む所与の核酸配列Cと表現できる）は、以下のとおり：

$$100 \times \text{分数 } W / Z$$

[ 式中、Wは、CおよびDのプログラムのアラインメントにおいて配列アラインメントプログラムALIGN - 2により同一で一致とスコア付けされたヌクレオチドの数であり、Zは、Dにおけるヌクレオチドの総数である ] 計算される。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さと同じでない場合は、Dに対するCの%核酸配列同一性は、Cに対するDの%核酸配列同一性と等しくなることが理解されるだろう。%核酸配列同一性の計算の例として、表4および5は、「PRO - DNA」と表記した核酸配列に対する「比較DNA」と表記した核酸配列の%核酸配列同一性をどのように計算するかを示しており、ここで「PRO - DNA」は、目的の仮説PROコード核酸配列を示し、「比較タンパク質」は、目的の「PRO - DNA」核酸分子を比較する相手である核酸分子の核酸配列を示し、そして「N」、「L」および「V」は、各々異なる仮説ヌクレオチドを示す。他に特段の記

載がない限り、本明細書で使用するすべての%核酸配列同一性の値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを用いて直前のパラグラフにおいて記載した通りに得られる。

【0261】

本発明によってはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161変異体ポリヌクレオチドも提供される。これらは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする核酸分子であり、そしてこれらは、本明細書中に開示される全長のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で、ハイブリダイズすることができる。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161変異体ポリペプチドは、PRO2

10

20

30

40

50



26、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161変異体ポリヌクレオチドによってコードされるものであり得る。

10

**【0262】**

用語「全長のコード領域」は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする核酸に関して使用される場合には、本発明の全長のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするヌクレオチドの配列を意味する（これは、多くの場合は、添付の図面において開始コドンと終結コドン（それらが含まれる）の間に示される）。用語「全長のコード領域」は、ATCCに寄託された核酸に関して使用される場合には、ATCCに寄託されたベクターの中に挿入されている、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペ

20

30

40

50

チドをコードする cDNA 部分を意味する（これは、多くの場合には、添付の図面の中で開始コドンと終結コドンの間（それらが含まれる）に示される）。

【0263】

「単離された」とは、本明細書中で開示する様々なポリペプチドを説明するために用いる場合、その天然の環境の成分中から同定および分離および/または回収されたポリペプチドを意味する。その天然の環境の夾雑成分は、代表的にはポリペプチドの診断または治療上の使用を妨害する物質であり、それらとしては、酵素、ホルモンおよび他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質が挙げられ得る。本発明は（１）スピニングカップ（spinning cup）配列決定装置を用いて N 末端または内部のアミノ酸配列の少なくとも 15 残基を得るのに十分な程度まで、または（２）クマシーブルー染色もしくは好ましくは銀染色を用いた非還元または還元条件下の SDS - PAGE による均質性となるように、ポリペプチドが精製されることを可能とする。単離されたポリペプチドには、組み換え体細胞の中のインサイチュのポリペプチドが含まれる。なぜなら、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくは PRO85161 ポリペプチドの自然界での環境の少なくとも 1 つの成分が存在しないであろうからである。しかしながら通常は、単離されたポリペプチドは、少なくとも 1 つの精製工程により調製される。

【0264】

「単離された」PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくは PRO85161 ポリペプチドをコードする核酸、あるいは他のポリペプチドをコードする核酸は、同定され、そして、ポリペプチドをコードする核酸の自然界での供給源に通常付随している少なくとも 1 つの混入している核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたポリペプチドコード核酸分子は、自然界にそれが存在する形態または状態以外のものである。したがって、単離されたポリペプチドコード核酸分子は、天然の細胞内にそれが存在する場合、特定のポリペプチドコード核酸分子とは区別される。しかしながら、単離されたポリペプチドコード核酸分子は、例えば、その核酸分子が天然の細胞のものとは異なる染色体位置にある場合、通常そのポリペプチドを発現する細胞に含まれるポリペプチドコード核酸分子を含む。

【0265】

用語「調節配列」は、特定の宿主生物中の作動可能に連結されたコード配列の発現のために必要な DNA 配列のことをいう。例えば、原核生物に適した調節配列は、プロモータ

10

20

30

40

50

ー、必要に応じてオペレーター配列およびリボソーム結合部位を包む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを利用することが知られている。

#### 【0266】

核酸は、それが別の核酸配列との機能的関連性の内部におかれる場合に「作動可能に連結」されている。例えば、プレ配列または分泌リーダーに対するDNAは、それがポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合にはそのポリペプチドに対するDNAに作動可能に連結されており；プロモーターもしくはエンハンサーは、それが配列の転写に影響する場合にはコード配列に作動可能に連結されており；または、リボソーム結合部位は、それが翻訳を促進するように位置付けられている場合にコード配列に作動可能に連結されている。一般的に「作動可能に連結された」とは、連結されるDNA配列が隣接しており、そして、分泌リーダーの場合は隣接し、かつリーディングフェーズにあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは、隣接している必要はない。連結は、好都合な制限部位におけるライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを従来の慣行に従って使用する。

10

#### 【0267】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」とは、当業者が容易に決定できるものであり、一般的にプローブ長、洗浄温度および塩濃度に依存した実験的計算値である。一般に、長いプローブほど適切なアニーリングのためにより高温を必要とし、短いプローブほどより低温を必要とする。ハイブリダイゼーションは、一般に、相補鎖がその融点より低温の環境中に存在する場合、変性したDNAが再アニーリングする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間の所望の相同性の程度が高いほど、使用できる相対温度は高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をよりストリンジェントとする傾向があり、より低い温度は、その傾向が小さい。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーに関するさらなる詳細および説明については、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

20

#### 【0268】

「ストリンジェントな条件」または「高ストリンジェンシー条件」とは、本明細書において定義する場合、(1)低いイオン強度および高い洗浄温度、例えば、0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを50において使用するか；(2)ハイブリダイゼーションの間、ホルムアミドなどの変性剤、例えば、50%(v/v)ホルムアミド+0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%Ficoll/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.5+750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを42で使用するか；または(3)50%ホルミアミド、5xSSC(0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5xDenhardt溶液、超音波処理サケ精子DNA(50μg/mL)、0.1%SDSおよび10%デキストラン硫酸を42で使用し、そして洗浄は42で0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)および55の50%ホルムアミド、その後55のEDTA含有0.1xSSCからなる高ストリンジェンシー洗浄条件を使用するものとして特定され得る。

30

40

#### 【0269】

「中等度にストリンジェントな条件」とは、Sambrook et al., Molecular Cloning; A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989による説明と同一と考えてよく、そして、上記したものより低ストリンジェントな洗浄溶液およびハイブリダイゼーションの条件(例えば、温度、イオン強度および%SDS)の使用を包む。中

50

等度にストリンジェントな条件の例は、20%ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×Denhardt溶液、10%デキストラン硫酸および20mg/mL変性攪拌サケ精子DNAを含む溶液中37℃での一晚のインキュベーションおよびその後の約37~50℃における1×SSC中フィルターの洗浄であるプローブ長などのような因子を適合させるために必要に応じて温度、イオン強度などを調節する方法は当業者の認識する通りである。

#### 【0270】

用語「エピトープタグ化」は、本明細書中で使用される場合は、「タグポリペプチド」に融合させられたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドが含まれているキメラポリペプチドを意味する。タグポリペプチドは、対応する抗体が作製できるエピトープを提供するために十分な残基を有するが、融合相手のポリペプチドの活性を妨害しないくらい短い。タグポリペプチドは、好ましくは抗体が他のエピトープと実質的に交差反応しないほど高度に特有のものである。適当なタグポリペプチドは、一般に少なくとも6アミノ酸残基、そして通常は約8~50アミノ酸残基(好ましくは約10~20アミノ酸残基)を有する。

#### 【0271】

本明細書中の目的についての「活性な」または「活性」は、自然界の、または自然界に存在しているPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの生物学的活性および/あるいは免疫学的活性を保持している、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO3

8683、もしくはPRO85161ポリペプチドの形態（単数または複数）を意味する。ここでは、「生物学的」活性は、自然界の、または自然界に存在しているPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドが有している抗原性エピトープに対する抗体の生産を誘導する能力以外の、自然界の、または自然界に存在しているPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドによって引き起こされる生物学的機能（阻害性または刺激性のいずれか）を意味し、そして、「免疫学的」活性は、自然界の、または自然界に存在しているPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドが有している抗原性エピトープに対する抗体の生産を誘導する能力を意味する。

10

20

30

40

50

**【0272】**

用語「アンタゴニスト」は、[他の場所で明確に限定されない限りは]最も広い意味で使用され、そしてこれには、本明細書中に開示される自然界に存在しているPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドが有している抗原性エピトープに対する抗体の生産を誘導する能力を意味する。

44、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの生物学的活性を部分的、あるいは完全にブロックする、阻害する、または中和する任意の分子が含まれる。同様の様式で、用語「アゴニスト」は、[他の場所で明確に限定されない限りは]最も広い意味で使用され、そしてこれには、本明細書中に開示される自然界に存在している自然界に存在しているPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子が含まれる。

10

**【0273】**

適切なアゴニストまたはアンタゴニスト分子としては、特に、自然界に存在しているPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、有機低分子などのアゴニストまたはアンタゴニスト抗体あるいは抗体断片、断片あるいは、アミノ酸配列変異体が挙げられる。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアゴニストあるいはアンタゴニストを同定するための方法には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341

20

30

40

50

、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを、候補のアゴニストもしくはアンタゴニスト分子と接触させる工程、およびPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに通常は関係している1つ以上の生物学的活性における検出可能な変化を測定する工程が含まれ得る。

10

**【0274】**

20

「処置する」または「処置」または「軽減」とは、治療的な施療および予防的または防止的な手段の両方のことをいい、ここで、その目的は、ターゲティングされた病的状態または障害を予防するか緩徐化（低減）することである。処置を必要とする被験体は、すでに疾患を有し得るか、または、疾患を有する傾向にあり得るか、もしくは疾患を予防すべき状態であり得る。

**【0275】**

「長期」投与とは、長期間に亘り初期の処置効果（活性）を維持するために短期の様式とは逆の持続的な様式における薬剤の投与のことをいう。「間欠的」投与は中断なく連続的に行われるのではなく、周期的な性質を有する処置である。

**【0276】**

30

「哺乳動物」とは、処置の目的のためには、哺乳動物に分類される任意の動物のことをいい、それらとしては、ヒト、ラットまたはマウスなどのげっ歯類、家畜および牧場動物および動物園、競技用または愛玩用の動物、例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどが挙げられる。好ましくは、哺乳動物は、ヒトである。

**【0277】**

さらなる1以上の処置薬と「組み合わせた」投与は、同時（併用）および任意の順序での連続投与を含む。

**【0278】**

「担体」とは、本明細書中で使用されるとき、使用する用量および濃度において曝露対象となる細胞または哺乳動物に対して非毒性である薬学的に許容可能な担体、賦形剤または安定化剤を含む。生理学的に許容可能な担体は、水性のpH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容可能な担体の例としては、緩衝剤（例えば、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸）；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシン）；グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む、単糖類、二糖類および他の炭水化物；EDTAなどのキレート化剤；マンニトールおよびソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；ならびに/または非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN<sup>TM</sup>、ポリエチレングリコール（PEG）およびPLURONICS<sup>TM</sup>が挙げられる。

40

50

## 【 0 2 7 9 】

「固相」とは、本発明の抗体が接着できる非水性マトリックスを意味する。本明細書において包含される固相の例としては、ガラス（例えば、細孔性ガラス）、多糖類（例えば、アガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコールおよびシリコンから部分的または完全に形成されているものが挙げられる。文脈に応じて、固相は、アッセイプレートのウェルを含み得；他の場合は精製カラム（例えば、アフィニティークロマトグラフィーカラム）である。この用語はまた、米国特許第 4, 2 7 5, 1 4 9 号に記載されているものなどの個々の粒子の不連続な固相を含む。

## 【 0 2 8 0 】

「リポソーム」は、薬剤（例えば、PRO 2 2 6、PRO 2 5 7、PRO 2 6 8、PRO 2 9 0、PRO 3 6 0 0 6、PRO 3 6 3、PRO 3 6 5、PRO 3 8 2、PRO 4 4 4、PRO 7 0 5、PRO 1 0 7 1、PRO 1 1 2 5、PRO 1 1 3 4、PRO 1 1 5 5、PRO 1 2 8 1、PRO 1 3 4 3、PRO 1 3 7 9、PRO 1 3 8 0、PRO 1 3 8 7、PRO 1 4 1 9、PRO 1 4 3 3、PRO 1 4 7 4、PRO 1 5 5 0、PRO 1 5 7 1、PRO 1 5 7 2、PRO 1 7 5 9、PRO 1 9 0 4、PRO 3 5 1 9 3、PRO 4 3 4 1、PRO 4 3 4 8、PRO 4 3 6 9、PRO 4 3 8 1、PRO 4 4 0 7、PRO 4 4 2 5、PRO 4 9 8 5、PRO 4 9 8 9、PRO 5 7 3 7、PRO 5 8 0 0、PRO 5 9 9 3、PRO 6 0 1 7、PRO 7 1 7 4、PRO 9 7 4 4、PRO 9 8 2 1、PRO 9 8 5 2、PRO 9 8 7 3、PRO 1 0 1 9 6、PRO 3 4 7 7 8、PRO 2 0 2 3 3、PRO 2 1 9 5 6、PRO 5 7 2 9 0、PRO 3 8 4 6 5、PRO 3 8 6 8 3、もしくはPRO 8 5 1 6 1ポリペプチド、あるいはそれらに対する抗体）の哺乳動物への送達に有用な様々なタイプの脂質、リン脂質、および/または界面活性剤から構成される小さい小胞である。リポソームの成分は生物学的膜の脂質の配置と同様に、二層を形成して通常配置される。

## 【 0 2 8 1 】

「低分子」とは、約 5 0 0 ダルトン未満の分子量を有するものとして本明細書においては定義する。

## 【 0 2 8 2 】

PRO 2 2 6、PRO 2 5 7、PRO 2 6 8、PRO 2 9 0、PRO 3 6 0 0 6、PRO 3 6 3、PRO 3 6 5、PRO 3 8 2、PRO 4 4 4、PRO 7 0 5、PRO 1 0 7 1、PRO 1 1 2 5、PRO 1 1 3 4、PRO 1 1 5 5、PRO 1 2 8 1、PRO 1 3 4 3、PRO 1 3 7 9、PRO 1 3 8 0、PRO 1 3 8 7、PRO 1 4 1 9、PRO 1 4 3 3、PRO 1 4 7 4、PRO 1 5 5 0、PRO 1 5 7 1、PRO 1 5 7 2、PRO 1 7 5 9、PRO 1 9 0 4、PRO 3 5 1 9 3、PRO 4 3 4 1、PRO 4 3 4 8、PRO 4 3 6 9、PRO 4 3 8 1、PRO 4 4 0 7、PRO 4 4 2 5、PRO 4 9 8 5、PRO 4 9 8 9、PRO 5 7 3 7、PRO 5 8 0 0、PRO 5 9 9 3、PRO 6 0 1 7、PRO 7 1 7 4、PRO 9 7 4 4、PRO 9 8 2 1、PRO 9 8 5 2、PRO 9 8 7 3、PRO 1 0 1 9 6、PRO 3 4 7 7 8、PRO 2 0 2 3 3、PRO 2 1 9 5 6、PRO 5 7 2 9 0、PRO 3 8 4 6 5、PRO 3 8 6 8 3、もしくはPRO 8 5 1 6 1ポリペプチド、抗PRO 2 2 6、抗PRO 2 5 7、抗PRO 2 6 8、抗PRO 2 9 0、抗PRO 3 6 0 0 6、抗PRO 3 6 3、抗PRO 3 6 5、抗PRO 3 8 2、抗PRO 4 4 4、抗PRO 7 0 5、抗PRO 1 0 7 1、抗PRO 1 1 2 5、抗PRO 1 1 3 4、抗PRO 1 1 5 5、抗PRO 1 2 8 1、抗PRO 1 3 4 3、抗PRO 1 3 7 9、抗PRO 1 3 8 0、抗PRO 1 3 8 7、抗PRO 1 4 1 9、抗PRO 1 4 3 3、抗PRO 1 4 7 4、抗PRO 1 5 5 0、抗PRO 1 5 7 1、抗PRO 1 5 7 2、抗PRO 1 7 5 9、抗PRO 1 9 0 4、抗PRO 3 5 1 9 3、抗PRO 4 3 4 1、抗PRO 4 3 4 8、抗PRO 4 3 6 9、抗PRO 4 3 8 1、抗PRO 4 4 0 7、抗PRO 4 4 2 5、抗PRO 4 9 8 5、抗PRO 4 9 8 9、抗PRO 5 7 3 7、抗PRO 5 8 0 0、抗PRO 5 9 9 3、抗PRO 6 0 1 7、抗PRO 7 1 7 4、抗PRO 9 7 4 4、抗PRO 9 8 2 1、抗PRO 9 8 5 2、抗PRO 9 8 7 3、抗PRO 1 0 1 9 6、抗PRO 3 4 7 7 8、抗PRO 2 0 2 3 3、抗PRO 2 1 9 5 6、抗PRO 5 7



290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合オリゴペプチド、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合有機分子、あるいは本明細書中に開示されるようなそれらのアゴニストまたはアンタゴニストの「有効量」は、具体的に記載される目的を実行するために十分な量である。「有効量」は記載した目的との関係において実験的に、そして日常的な様式で決定され得る。

#### 【0283】

用語「治療有効量」は、被験体または哺乳動物の疾患もしくは障害を「処置」するために有効な、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PR

057290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペ  
プチド、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006  
、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1  
071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1  
343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1  
433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1  
759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO  
4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO  
4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO  
7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO  
10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO5729  
0、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合オリゴペプチ  
ド、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、P  
RO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO107  
1、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO134  
3、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO143  
3、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO175  
9、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO43  
69、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO49  
89、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO71  
74、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10  
196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、  
PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合有機分子、あるい  
は、他の薬物の量を意味する。癌の場合には、治療有効量の薬物によって、癌細胞の数を  
減少させる；腫瘍の大きさを小さくする；癌細胞の抹消器官への浸潤を阻害する（すなわ  
ち、いくらか遅らせる、そして好ましくは、停止させる）；腫瘍の転移を阻害する（すな  
わち、いくらか遅らせる、そして好ましくは、停止させる）；腫瘍の増殖をいくらか阻害  
する；および／または癌に関連する症状の1つ以上をいくらか緩和することができる。「  
処置する」の本明細書における定義を参照のこと。薬剤が、既存の癌細胞の成長を予防し  
得、そして／または既存の癌細胞を殺滅し得る限り、その薬剤は、細胞分裂抑制性および  
／または細胞傷害性であり得る。

#### 【0284】

語句「心臓血管、内皮および血管形成の障害」、「心臓血管、内皮および血管形成の機  
能不全」、「心臓血管、内皮または血管形成の障害」および「心臓血管、内皮または血管  
形成の機能不全」は、交換可能に使用され、部分的には、血管に影響する全身性の障害（  
例えば、真性糖尿病、ならびに、動脈、毛細管、静脈および／またはリンパのような脈管  
自体の疾患）のことをいう。これには、血管形成および／または心臓血管形成を刺激する  
適応症ならびに血管形成および／または心臓血管形成を抑制するものが含まれる。そのよ  
うな障害としては、例えば、動脈疾患（例えば、アテローム性動脈硬化症、高血圧、炎症  
性血管炎、レイノー病およびレイノー現象、動脈瘤、ならびに動脈の再狭窄）；静脈およ  
びリンパ管の障害（例えば、静脈血栓症、リンパ管炎、およびリンパ水腫）；ならびに、  
他の血管の障害（例えば、末梢血管の疾患、癌（例えば、血管の腫瘍（例えば、血管腫（  
毛細血管および海綿状）、グロムス腫瘍、毛細血管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫  
、血管肉腫、血管周囲細胞腫、カポジ肉腫、リンパ管腫、および、リンパ管肉腫）、腫瘍  
の血管形成、外傷（例えば、創傷、熱傷、および他の損傷した組織）、インプラントの固  
定（implant fixation）、瘢痕化、虚血再かん流傷害、関節リウマチ、  
脳血管疾患、腎疾患（例えば、急性腎不全）、あるいは、骨粗鬆症）が挙げられる。これ  
らにはまた、アンギナ、急性心筋梗塞などの心筋梗塞、心臓肥大およびCHFなどの心不  
全が含まれる。

#### 【0285】

10

20

30

40

50

「肥大」とは、本明細書中で使用されるとき、腫瘍形成に関与しない天然の成長とは無関係の器官または構造の嵩の増大として定義される。器官または組織の肥大は、個々の細胞の嵩の増大（真の肥大）またはその組織を構成している細胞の数の増加（過形成）のいずれか、またはそれらの両方によるものである。心臓などの特定の器官は、出生後短期間で分裂する能力を失う。したがって、「心臓肥大」とは、成人において同時細胞分裂を伴わない心筋細胞のサイズおよび収縮タンパク質含有量の増大を特徴とする心臓の嵩の増大として定義される。肥大を刺激する原因となるストレスの特徴（例えば、心筋梗塞の場合のような、前負荷の増大、後負荷の増大、筋細胞の減少、または収縮力の一次的低下）が応答の性質を決定する場合に重要な役割を果たしていると考えられる。心臓肥大の早期の段階は、通常、筋原線維の大きさおよびミトコンドリアの増大により、ならびに、ミトコンドリアおよび核の膨大により形態学的に特徴付けられる。この段階において、筋細胞は、正常よりも大型となるが、細胞の組織は、大半は温存されている。心臓肥大のより進行した段階において、ミトコンドリアなどの特定の細胞内小器官のサイズまたは数の優先的な増大が生じ、そして、新しい収縮エレメントが不規則な様式で細胞の局所的領域に付加される。長期にわたって肥大している細胞は、細胞構成においてより明白な破壊を示し、これには、高度に分葉状となった膜を有している顕著に長くなった核が含まれる。これは、隣接する筋原線維に置き換わり、そして正常なZ - バンドレジストレーション（Z - band registration）の崩壊を引き起こす。表現「心臓肥大」は、根底にある心臓の傷害とは無関係に、様々な程度の心筋の構造上の損傷を特徴とするこの状態の進行の全ての段階を含むように使用される。したがって、この用語はまた、心臓肥大（例えば、血圧の上昇、大動脈の狭窄または心筋梗塞）の発生に寄与する生理学的状態を含む。

10

20

#### 【0286】

「心不全」とは、代謝している組織の要求に対して必要とされる速度では心臓が血液を送液しない心臓機能の異常のことをいう。心不全は、虚血性、先天性、リウマチ性または特発性の形態を含む多くの要因により誘発され得る。

#### 【0287】

「鬱血性心不全」（CHF）は、心臓が末梢組織に対し酸素付加された血液を送達するために十分な心拍出量（経時的に心臓により送液される血液の容量）を供給することがますます不可能になっている進行性の病的状態である。CHFが進行するに従い、構造的および血行力学的な損傷が生じる。これらの損傷は、種々の徴候を有するが、1つの特徴的な症状は、心室の肥大である。CHFは、多くの様々な心臓障害の共通した最終結果である。

30

#### 【0288】

「心筋梗塞」は、一般に冠状動脈のアテローム性動脈硬化症から生じ、混合型の冠状動脈血栓を伴う場合が多い。これは2つの主要な型：心筋の壊死が心室壁の厚みすべてに関与している経壁梗塞、およびその壊死が心室壁から心外膜に至るまでの拡張を伴わない心内膜下、壁内心筋層、またはその両方が関与する心内膜下（非貫壁性）梗塞に分類され得る。心筋梗塞は、血行力学的作用の変化および心臓の損傷部および健常部における構造の変化の両方をもたらすことが知られている。すなわち、例えば、心筋梗塞は、心臓の最大心拍出量および一回拍出量を減少させる。また、間隙において生じるDNA合成の刺激ならびに罹患していない心臓の領域におけるコラーゲンの形成の増大が、心筋梗塞に関連する。

40

#### 【0289】

例えば、全末梢血管抵抗の増大に起因する長期間高血圧である心臓に対して与えられるストレスまたは緊張の増大の結果として、心臓肥大には「高血圧」が長く関わっている。慢性的な圧力の過剰負荷の結果として肥大した心室の特徴は減損した拡張期の機能である。Fouad et al., J. Am. Coll. Cardiol., 4: 1500 - 1506 (1984); Smith et al., J. Am. Coll. Cardiol., 5: 869 - 874 (1985)。長期の左心室の弛緩は、正常または過剰な収縮

50

機能にも関わらず、早期の本態性高血圧において検出されている。Hartford et al., *Hypertension*, 6:329-338 (1984)。しかしながら、血圧のレベルと心臓肥大の間には緊密な平行性はない。抗高血圧療法に応答した左心室機能の改善がヒトにおいて報告されているが、利尿剤（ヒドロクロロチアジド）、 $\beta$ -遮断薬（プロプラノロール）またはカルシウムチャネル遮断薬（ジルチアゼム）で多様に処置されている患者は、拡張機能の改善を伴わない左心室肥大の回復を示している。Inouye et al., *Am. J. Cardiol.*, 53:1583-7 (1984)。

#### 【0290】

心臓肥大に伴う別の複合的心臓疾患は、「肥大性心筋症」である。この状態は、非常に多様な形態学的、機能的および臨床的な特徴により特徴付けられ (Maron et al., *N. Engl. J. Med.*, 316:780-789 (1987); Spirito et al., *N. Engl. J. Med.*, 320:749-755 (1989); Louie and Edwards, *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 36:275-308 (1994); Wigle et al., *Circulation*, 92:1680-1692 (1995))、その不均質性は、それが全世代の患者に及んでいるという事実により強調されている。Spirito et al., *N. Engl. J. Med.*, 336:775-785 (1997)。肥大性心筋症の原因もまた多様であり、ほとんど解明されていない。一般に、筋節タンパク質をコードする遺伝子における変異が、肥大性心筋症に関連している。最近のデータによれば、 $\beta$ -ミオシン重鎖の変異が、家族性の肥大性心筋症の症例の約30~40パーセントを占め得ることが示唆されている。Watkins et al., *N. Engl. J. Med.*, 326:1108-1114 (1992); Schwartz et al., *Circulation*, 91:532-540 (1995); Marian and Roberts, *Circulation*, 92:1336-1347 (1995); Thierfelder et al., *Cell*, 77:701-712 (1994); Watkins et al., *Nat. Gen.*, 11:434-437 (1995)。 $\beta$ -ミオシン重鎖以外に、他の位置の遺伝子変異としては、心臓トロポニンT、アルファトロポニン、心臓ミオシン結合タンパク質C、必須ミオシン軽鎖および調節ミオシン軽鎖が挙げられる。Malik and Watkins, *Curr. Opin. Cardiol.*, 12:295-302 (1997)を参照のこと。

#### 【0291】

弁上部「大動脈狭窄症」は、上行大動脈の狭窄を特徴とする遺伝性の血管障害であるが、肺動脈を含む他の動脈も罹患する場合がある。未処置の大動脈狭窄は、心筋の肥大ならびに最終的には心不全および死亡の原因となる心臓内圧の上昇をもたらす場合がある。この障害の病因は、完全には解明されていないが、内側平滑筋の肥大および恐らくは過形成が、この障害の顕著な特徴である。エラスチン遺伝子の分子改変体が、大動脈狭窄の発症および病因に関与していると報告されている。1997年7月22日発行の米国特許第5,650,282号。

#### 【0292】

「弁逆流」は、心臓の弁の障害をもたらす心臓疾患の結果として生じる。リウマチ熱のような様々な疾患は、弁開口部の収縮または引き離しをもたらす場合があるが、他の疾患は、心内膜炎、心内膜または房室開口部の内膜の炎症および心臓手術の原因となる場合がある。弁狭窄部の狭小化および弁の閉鎖欠陥などの欠陥は、心臓腔中の血液の蓄積または弁を通過する血液の逆流をもたらす。改善されない場合、長期の弁の狭窄または不全により、心臓肥大および関連する心筋の損傷をもたらされ、それにより最終的には弁の交換が必要となる場合がある。

#### 【0293】

用語「免疫関連疾患」は、哺乳動物の免疫系の構成要素が、哺乳動物における罹患に対し、誘発、媒介または他の方法で寄与する疾患を意味する。同様に含まれるものは、免疫

応答の刺激または介入が疾患の進行に対して寛解作用を有する疾患である。この用語に含まれるものは、免疫媒介炎症性疾患、非免疫媒介炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全疾患、新生物形成などである。

#### 【0294】

用語「T細胞媒介疾患」は、T細胞が哺乳動物における罹患を直接的または間接的に媒介するか、他の方法において寄与する疾患を意味する。T細胞媒介疾患は、細胞媒介作用、リンフォカイン媒介作用などに関連し得、そしてB細胞が、例えばT細胞の分泌したリンフォカインにより刺激される場合にはB細胞関連作用にも関連し得る。

#### 【0295】

免疫関連疾患および炎症性疾患（そのいくつかは免疫細胞またはT細胞によって媒介される）の例としては以下が挙げられる：全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症（強皮症）、特発性炎症性筋疾患（皮膚筋炎、多発性筋炎）シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症）、自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症）、甲状腺炎（グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）、真性糖尿病、免疫媒介性腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）、中枢および末梢神経系の脱髄疾患（例えば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギラン・バレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー）、肝胆疾患（例えば、感染性肝炎（A型、B型、C型、D型、E型肝炎および他の非肝向性（non-hepatotropic）のウイルスによる肝炎）、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎）、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎：クローン病）、グルテン過敏性腸症およびホイップル病、水疱性疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫媒介性の皮膚疾患、乾癬、アレルギー性疾患（例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹）、肺の免疫学的疾患（例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎）、または移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患。感染性疾患には、ウイルス性疾患（例えば、AIDS（HIV感染）、A型、B型、C型、D型、およびE型肝炎、ヘルペスなど）、細菌感染、真菌感染、原虫感染、および寄生虫感染が含まれる。

#### 【0296】

本明細書中の「自己免疫疾患」は、個体の自己組織またはそれらのco-segregateもしくは発現によって生じるか、またはそれらに対して特異的な疾患あるいは障害、あるいはそれらによって生じる状態である。自己免疫疾患または障害の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定はされない：関節炎（例えば、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬性関節炎、および、強直性脊椎炎）、乾癬、アトピー性皮膚炎を含む皮膚炎；慢性特発性蕁麻疹（慢性自己免疫性蕁麻疹、多発性筋炎/皮膚筋炎、中毒性表皮剥離症、全身性硬化症および硬化症が含まれる）、炎症性腸疾患（IBD）に関連する応答（クローン病、潰瘍性大腸炎）、および壊疽性膿皮症のco-segregateを伴うIBD、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、および/または上強膜炎）、呼吸窮迫症候群（成人呼吸窮迫症候群、（ARDS）が含まれる）、髄膜炎、IGE媒介性疾患（例えば、アナフィラキシーおよびアレルギー性鼻炎）、脳炎（例えば、ラスマッセン脳炎、ブドウ膜炎）、大腸炎（例えば、顕微鏡的大腸炎およびコラーゲン蓄積大腸炎）、糸球体腎炎（GN）（例えば、膜形成性GN、特発性膜形成性GN、膜形成性増殖性GN（MPGN）（I型およびII型が含まれる）、および急性進行性GN）、アレルギー症状、湿疹、喘息、T細胞の浸潤が関係している症状、および慢性炎症反応、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性心筋炎、白血球接着不全症、全身性エリテマトーデス（SLE）（例えば、皮膚のSLE、狼瘡（腎炎、脳炎、小児の、非腎性、円盤状、脱毛症が含まれる）、若年発症型糖尿病、多発性硬化症（MS）（例えば、spino-optical MS、アレルギー性脳脊髄炎、サイトカインもしくはTリンパ球によって媒介される急性および遅延型過敏症に関連する炎症応答、結核症、サルコイドーシス、肉芽腫症（

10

20

30

40

50

ウェゲナー肉芽腫症が含まれる)、無顆粒球症、脈管炎(大血管の脈管炎(リウマチ性多発筋痛症、および巨細胞(高安)動脈炎が含まれる)、中型の血管の脈管炎(川崎病、および結節性多発動脈炎が含まれる)、CNS脈管炎、およびANCA関連脈管炎(例えば、チャージ・ストラウス症候群(CSS)が含まれる)、再生不良性貧血、クームズ陽性貧血、Diamond Blackfan貧血、免疫性溶血性貧血(自己免疫性溶血性貧血(AIHA)が含まれる)、悪性貧血、赤芽球癆(PRCA)、第V因子欠乏、血友病A、自己免疫性好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球の血管外遊出が関係している疾患、CNS炎症性障害、多臓器損傷症候群、重症筋無力症、抗原-抗体複合体によって媒介される疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット病、キャスルマン症候群、グッドパスチャー症候群、Lambert-Eaton筋無力症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、ステーブンス・ジョンソン症候群、固形臓器の移植拒絶(高度なパネル反応性抗体力価についての前処理、組織中でのIgAの蓄積、および腎臓移植、肝臓移植、小腸の移植、心臓移植などによって生じる拒絶が含まれる)、移植片対宿主病(GVHD)、水疱性類天疱瘡、天疱瘡(座瘡、天疱瘡、および天疱瘡粘膜類天疱瘡が含まれる)、自己免疫性多腺性内分泌障害、ライター症候群、スティフマン症候群、免疫複合体性腎炎、IgM多発性ニューロパシー、またはIgMによって媒介される神経障害、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、血小板減少症(例えば、心筋梗塞の患者によって生じる)(自己免疫性血小板減少症が含まれる)、精巣および卵巣の自己免疫性疾患(自己免疫性精巣炎および卵巣炎が含まれる)、原発性甲状腺機能低下症;自己免疫性内分泌疾患(自己免疫性甲状腺炎が含まれる)、慢性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)、亜急性甲状腺炎、特発性甲状腺機能低下症、アジソン病、グレーブス病、自己免疫性多腺症候群(または多腺内分泌障害症候群)I型糖尿病(インシュリン依存性真性糖尿病(IDDM)とも呼ばれる)(小児性IDDM、およびシーハン症候群が含まれる);自己免疫性肝炎、リンパ球様間質性肺炎(HIV)、閉塞性細気管支炎(非移植性)対NSIP、ギラン・バレー症候群、バージャー病(IgA腎症)、原発性胆汁性肝硬変、セリアック病(グルテン性腸症)、co-segregate疱疹状皮膚炎を伴う軟治性スプルー、クリオグロブリン血症、筋萎縮側索硬化症(ALS;ルー・ゲーリック病)、冠動脈疾患、自己免疫性内耳疾患(AIED)、自己免疫性難聴、眼球クロオスミオクロオス症候群(OMS)、多発性軟骨炎(例えば、軟治性多発性軟骨炎、肺胞タンパク症、アミロイドシス、巨細胞性肝炎、強膜炎、意義が特定されていない/意義不明単クローン性免疫グロブリン血症(MGUS)、末梢神経障害、腫瘍随伴症候群、チャネル病(channelopathies)(例えば、てんかん、偏頭痛、不整脈、筋肉の障害、難聴、失明、周期性四肢麻痺、およびCNSのチャネル病;自閉症、炎症性筋疾患、ならびに、巣状分節状糸球体硬化症(FSGS)。

#### 【0297】

用語「不安関連障害」とは、不安、気分および薬物乱用の障害のこといい、それらとしては、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥障害、睡眠障害、多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害が挙げられるがこれらに限定されない。そのような障害としては、軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、特段に特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴ったパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、社会不安、自閉症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、一極性障害、I型またはII型双極性障害、特段に特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害、認知機能の増強、認知機能の低下(アルツハイマー病、脳卒中または脳の外傷に関連するものが挙げられるがこれらに限定されない)、疾患または損傷から生じる発作(癲癇、学習障害/障害、脳性麻痺が挙げられるがこれらに限定されない)が挙げられる。さらに、不安障害は、人格障害(以下のタイプ:妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない)に適用し得

10

20

30

40

50

る。

【0298】

用語「脂質代謝障害」とは、コレステロールおよびトリグリセリドの異常な臨床化学レベルのことをいい、ここでこれらの脂質の高いレベルは、アテローム性動脈硬化症の指標となる。さらに、異常な血清中脂質レベルは、様々な心臓血管疾患（高血圧、脳卒中、冠状動脈疾患、糖尿病および／または肥満症を含む）の指標となり得る。

【0299】

語句「眼の異常」とは、アテローム性動脈硬化症または様々な眼科学的異常に関連し得る眼の潜在的障害のことをいう。そのような障害としては、以下：網膜形成不全、様々な網膜症、再狭窄、網膜動脈閉塞もしくは閉鎖；網膜血管系の二次的萎縮を引き起こす網膜変性症、色素性網膜炎、黄斑ジストロフィー、シュタルガルト病、先天性停在性夜盲症、コロイデレミア、脳回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ・マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー・ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群、コケーン症候群、先天性脊椎・骨端異形成症、フリン・エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス・シェーンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンプルグ症候群、アラジール症候群、筋緊張性ジストロフィー、オリーブ橋小脳萎縮症、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、バッセン・コロンツヴァイク症候群、無リポタンパク質血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症またはマンノシドーシスが挙げられるがこれらに限定されない。白内障もまた眼の異常と考えられ、そしてヒトダウン症候群、ハレルマン・ストレフ症候群、ロウ症候群、ガラクトース血症、マルファン症候群、トリソミー13-15、アルポート症候群、筋緊張性ジストロフィー、ファブリー病、上皮小体機能低下症またはコンラーディ症候群などの全身性疾患と関連している。他の眼の発達異常としては、無虹彩症、前区および発育不全症候群が挙げられる。白内障はまた、眼内感染または炎症（ブドウ膜炎）の結果として生じる場合もある。

【0300】

抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO5729

10

20

30

40

50

50



155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合オリゴペプチド、あるいは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合有機分子の「増殖阻害量」は、新生物性の細胞の増殖を阻害する目的については、経験的に、そして日常的に行われている様式で決定することができる。

10

20

#### 【0301】

抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、P

30

40

50

RO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合オリゴペプチド、あるいは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合有機分子の「細胞傷害量」は、インビトロまたはインビボのいずれかで、細胞（特に、腫瘍、例えば、癌細胞）の破壊を引き起こすことができる量である。抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO

5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合オリゴペプチド、あるいは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合有機分子の「細胞傷害量」は、新生物性の細胞の増殖を阻害する目的について、経験的に、そして日常的に行われている様式で決定することができる。

10

20

30

40

50

### 【0302】

用語「抗体」は最も広い意味で使用され、そして、特に、例えば、1つの抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体モノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、および中和抗体が含まれる）、多エピトープ特異性を有している抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体組成物、ポリクローナル抗体、単鎖抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO

1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体、ならびに、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体の断片（以下を参照のこと）が、これらが所望される生物学的活性または免疫学的活性を示す限りは、含まれる。用語「免疫グロブリン」（Ig）は、本明細書においては抗体と交換可能に使用される。

10

20

30

40

50

### 【0303】

「単離された抗体」とは、その天然の環境の成分中から同定ならびに分離および／または回収されるものを意味する。その天然の環境の夾雑成分は、抗体の診断または治療上の使用を妨害する物質であり、それらとしては、酵素、ホルモンおよび他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質が挙げられ得る。本発明は、（１）Lowry法により測定した場合に抗体の95重量%超まで、最も好ましくは99重量%超まで、（２）スピニングカップ配列決定装置を用いてN末端または内部のアミノ酸配列の少なくとも15残基を得るために十分な程度まで、または（３）クマシーブルーもしくは好ましくは銀染色を用いた還元または非還元条件下のSDS-PAGEによる均質性となるように、抗体が精製されることを可能とする。単離された抗体は、組換え細胞内のin situの抗体を含むが、その理由は抗体の天然の環境の少なくとも1つの成分が存在しないためである。しかしながら、通常、単離された抗体は、少なくとも1つの精製工程により調製される。

### 【0304】

基本的な4鎖抗体単位は、2本の同一の軽（L）鎖および2本の同一の重（H）鎖～構成されるヘテロ4量体の糖タンパク質である（IgM抗体は、J鎖と呼ばれるさらなるポリペプチドと共に基本的なヘテロ4量体単位5つからなり、したがって、10個の抗原結合部位を含有するのに対し、分泌IgA抗体は、重合してJ鎖と共に基本的4鎖単位2～5つを含む多価の組立物を形成することができる）。IgGの場合は、4鎖単位は、一般に約150,000ダルトンである。各L鎖は、ジスルフィド共有結合1つによりH鎖に連結されているのに対し、2本のH鎖は、H鎖のアイソタイプに応じて1つ以上のジスルフィド結合により相互に連結されている。各H鎖および各L鎖はまた、規則的な間隔で鎖内ジスルフィド架橋を有する。各H鎖はN末端において可変ドメイン（V<sub>H</sub>）とその後の3つの定常ドメイン（C<sub>H</sub>）を各鎖および各鎖について、そして4つのC<sub>H</sub>ドメインをμおよびアイソタイプについて有している。各L鎖は、N末端において可変ドメイン（V<sub>L</sub>）とその後の定常ドメイン（C<sub>L</sub>）をそのもう一端において有している。V<sub>L</sub>は、V<sub>H</sub>と並列され、そしてC<sub>L</sub>は、重鎖の最初の定常ドメイン（C<sub>H1</sub>）と並列される。特定のアミノ酸残基が、軽鎖および重鎖の可変ドメインの間の界面を形成すると考えられている。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>の対形成により、単一の抗原結合部位が形成される。様々なクラスの抗

体の構造および特性については、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, p. 71およびChapter 6を参照のこと。

#### 【0305】

任意の脊椎動物種に由来するL鎖を、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてカッパおよびラムダと称される2つの明確に異なった型の1つに割りあて得る。その重鎖の定常ドメイン( $C_H$ )のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは、様々なクラスまたはアイソタイプに割りあてられ得る。免疫グロブリンには、5クラス: Ig A、Ig D、Ig E、Ig GおよびIg Mがあり、それぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ および $\lambda$ と表記される重鎖を有する。およびのクラスはさらに、 $C_H$ 配列および機能の比較的小さい差異に基づいてサブクラスに分類され、例えば、ヒトは、以下のサブクラス: Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig A 1およびIg A 2を発現する。

10

#### 【0306】

用語「可変」は、可変ドメインの特定のセグメントが、抗体の間で配列が大きく異なっているという事実のことをいう。Vドメインは、抗原の結合を媒介し、そして、特定の抗体のその特定の抗原に対する特異性を決定する。しかしながら、可変性は、可変ドメインの110アミノ酸に亘って均一に分布していない。その代わり、V領域は、各々が9~12アミノ酸長の「超可変領域」と称される究極的な可変性のより短い領域によって分断された15~30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と称される比較的不変の部分からなる。ネイティブの重鎖および軽鎖の可変ドメインは各々、シート構造を連結する、そして一部の場合においてはその部分を形成するループを形成する3つの超可変領域により連結されたシート配置を大半が採用している4つのFRを含む。個々の鎖の中の超可変領域は、FRによって、他の鎖に由来する超可変領域と互いに接近した状態で保たれ、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照のこと)。定常ドメインは、抗原への抗体の結合に直接関与していないが、様々なエフェクター機能(例えば、抗体依存性細胞内細胞傷害(ADCC)への抗体の関与)を示す。

20

30

#### 【0307】

用語「超可変領域」は、本明細書中で使用されるとき、抗原結合の原因となる抗体のアミノ酸残基のことをいう。超可変領域には、通常、「相補性決定領域」すなわち「CDR」に由来するアミノ酸残基(例えば、 $V_L$ 中の約24~34(L1)、50~56(L2)、および89~97(L3)付近のアミノ酸残基、ならびに、 $V_H$ 中の約1~35(H1)、50~65(H2)、および95~102(H3)付近のアミノ酸残基; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))、ならびに/あるいは、「超可変ループ」に由来するアミノ酸残基(例えば、 $V_L$ 中の約26~32(L1)、50~52(L2)、および91~96(L3)、ならびに、 $V_H$ 中の26~32(H1)、53~55(H2)、および96~101(H3); Chothia and Lesk J. Mol. Biol., 196: 901~917 (1987))が含まれる。

40

#### 【0308】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書中で使用されるとき、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体のことをいい、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、わずかな量で存在し得る、天然に存在する可能性のある突然変異を除き同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に指向されている。さらに、さまざま

50

まな決定基（エピトープ）に対して指向されたさまざまな抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向されている。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体の混入を伴うことなく合成され得る点において好都合である。修飾語の「モノクローナル」とは、任意の特定の方法による抗体の作製を必要とするものとみなしてはならない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975) により最初に報告されたハイブリドーマ法により調製され得るか、または、細菌、真核生物または植物の細胞において組換えDNA法を用いて作製され得る（例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと）。「モノクローナル抗体」は、例えば、Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) および Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) に記載の手法を用いてファージ抗体ライブラリーから単離され得る。

10

#### 【0309】

本明細書中のモノクローナル抗体には、「キメラ」抗体（その中の重鎖および/または軽鎖の部分は、特定の種に由来するかまたは特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属している抗体の中の対応している配列と同一であるかあるいはそれらと相同であるが、鎖（単数または複数）の残りは、別の種に由来するかまたは別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属している抗体の中の対応している配列と同一であるかまたはそれらに相同である）、ならびに、そのような抗体の断片が、それらが所望される生物学的活性を示す限りは、含まれる（米国特許第4,816,567号；およびMorrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851~6855 (1984) を参照のこと）。本明細書における目的のキメラ抗体は、非ヒト霊長類（例えば、旧世界ザル、類人猿など）から得られた可変ドメイン抗原結合配列およびヒト定常領域配列を含む「霊長類化」抗体を含む。

20

#### 【0310】

「インタクトな」抗体とは、抗原結合部位ならびにC<sub>L</sub>および少なくとも重鎖定常ドメインC<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3を含むものである。定常ドメインは、ネイティブの配列の定常ドメイン（例えば、ヒトネイティブ配列定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列改変体であり得る。好ましくはインタクトな抗体は、1つ以上のエフェクター機能を有する。

30

#### 【0311】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の一部分、好ましくはインタクトな抗体の抗原結合または可変の領域を含む。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> およびFvフラグメント；ダイアボディ；線状抗体（米国特許第5,641,870号の実施例2；Zapata et al., Protein Eng., 8(10): 1057-1062 [1995] を参照のこと）；一本鎖抗体分子；ならびに抗体フラグメントから形成された多重特異性の抗体が挙げられる。

#### 【0312】

抗体のパパイン消化により、「Fab」フラグメントと称される2本の同一の抗原結合フラグメント、および容易に結晶化する能力を反映した表記である残りの部分の「Fc」フラグメントが得られる。Fabフラグメントは、H鎖の可変領域ドメイン（V<sub>H</sub>）とともにL鎖全体および1本の重鎖の第1の定常ドメイン（C<sub>H</sub>1）からなる。各Fabフラグメントは、抗原結合に関しては1価であり、すなわち、単一の抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、単一の大型のF(ab')<sub>2</sub> フラグメントが得られ、これは2価の抗原結合活性を有する2つのジスルフィド結合したFabフラグメントに概ね相当し、そしてなお抗原に交差結合することができる。Fab'フラグメントは、抗体のヒンジ領域に由来する1つ以上のシステインを含むC<sub>H</sub>1ドメインのカルボキシ末端にさらに数残基を有することによりFabフラグメントとは、異なっている。Fab'-SHは、本明細書においては定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を担持しているFab'に対する表記である。F(ab')<sub>2</sub> 抗体フラグメントは、当初はそれらの間にヒ

40

50

ンジシステインを有する F a b ' フラグメントの対として作製された。抗体フラグメントの他の化学的カップリングも知られている。

【 0 3 1 3 】

F c フラグメントは、ジスルフィドで共に保持された両方の H 鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、F c 領域における配列により決定され、この領域は、特定の型の細胞に存在する F c レセプター ( F c R ) により認識される部分でもある。

【 0 3 1 4 】

「 F v 」は、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。このフラグメントは、堅固な非共有結合の会合型としての 1 つの重鎖と 1 つの軽鎖との可変領域ドメインの 2 量体からなる。これらの 2 ドメインの折り畳みにより、6 つの超可変ループ ( 3 ループは各々 H 鎖および L 鎖由来 ) が生じ、これらは抗原結合のためのアミノ酸残基を与え、そして抗体に抗原結合特異性をもたらす。しかしながら、単一の可変ドメイン ( または抗原に対して特異的なわずか 3 つの C D R のみを含む F v の半分 ) であっても、結合部位全体よりも低親和性ではあるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

【 0 3 1 5 】

「 s F v 」または「 s c F v 」とも略記される「一本鎖 F v 」は、連結されて単一のポリペプチド鎖となっている V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> 抗体ドメインを含む抗体フラグメントである。好ましくは、s F v ポリペプチドはさらに、抗原結合のために所望の構造を s F v が形成できるようにする V<sub>H</sub> ドメインと V<sub>L</sub> ドメインとの間のポリペプチドリンカーを含む。s F v に関する概説は、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315 ( 1994 ); Borrebaeck 1999, 後出を参照のこと。

【 0 3 1 6 】

用語「ダイアボディ」は、V ドメインの鎖内ではなく鎖間の対形成が達成されることにより 2 価のフラグメント、すなわち 2 つの抗原結合部位を有するフラグメントが生じるように V<sub>H</sub> ドメインと V<sub>L</sub> ドメインの間により短いリンカー ( 約 5 ~ 10 残基 ) と共に s F v フラグメント ( 前パラグラフを参照のこと ) を構築することにより調製される小型抗体フラグメントのことをいう。2 重特異性のダイアボディは、2 つの「クロスオーバー」 s F v フラグメントのヘテロ 2 量体であり、この場合、2 つの抗体の V<sub>H</sub> ドメインおよび V<sub>L</sub> ドメインは異なるポリペプチド鎖上に存在する。ダイアボディは、例えば、EP 404, 097; WO 93 / 11161; および Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444 - 6448 ( 1993 ) により詳細に記載されている。

【 0 3 1 7 】

非ヒト ( 例えば、げっ歯類 ) 抗体の「ヒト化」型は、非ヒト抗体から得られた最小の配列を含むキメラ抗体である。大部分に関しては、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域に由来する残基が、所望の抗体の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種 ( 例えば、マウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類 ) ( ドナー抗体 ) の超可変領域に由来する残基で置き換えられているヒト免疫グロブリン ( レシピエント抗体 ) である。一部の情况においては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域 ( F R ) の残基が対応する非ヒト残基により置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に存在しない残基を含んでよい。これらの改変は、抗体の性能をさらに精密化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも 1 つ、そして代表的には 2 つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、その場合、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが、非ヒト免疫グロブリンのそれに相当し、そして F R のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のそれとなる。ヒト化抗体は、必要に応じてまた、免疫グロブリン定常領域 ( F c ) 、代表的にはヒト免疫グロブリンのメンエキグロブリン定常領域の少なく

とも一部分を含む。さらに詳細な説明は、Jones et al., Nature 321: 522 - 525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323 - 329 (1988); および Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593 - 596 (1992) を参照のこと。

【0318】

「種依存性抗体」、例えば、哺乳動物非ヒトIgE抗体は、第1の哺乳動物種由来の抗原に対して、第2の哺乳動物種由来のその抗原のホモログに対するよりも、より強力な結合親和性を有する抗体である。通常、種依存性抗体は、ヒト抗原に対して「特異的に結合する」（すなわち、たった約  $1 \times 10^{-7}$  M、好ましくはたった約  $1 \times 10^{-8}$  M、そして最も好ましくはたった約  $1 \times 10^{-9}$  Mの結合親和性(Kd)値を有する)が、第2の非ヒト哺乳動物種由来の抗原のホモログに対しては、ヒト抗原に対するその結合親和性よりも、少なくとも約50倍、または少なくとも約500倍、または少なくとも約1000倍弱い結合親和性を有する。種依存性抗体は、上記の抗体の様々な型のいずれかであり得るが、好ましくはヒト化抗体またはヒト抗体である。

10

【0319】

「PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合オリゴペプチド」は、本明細書中に記載されるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対して、（好ましくは、特異的に）結合するオリゴペプチドである。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合オリゴペプチドは、公知のオリゴペプチド合成方法論を使用して化学合成し、そして組み換え技術を使用して調製

20

30

40

50



し、精製することができる。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合オリゴペプチドは、通常は、少なくとも約5アミノ酸長であるか、あるいは、少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100アミノ酸長、あるいはそれ以上である。ここでは、そのようなオリゴペプチドは、本明細書中に記載されるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対して、（好ましくは特異的に）結合することができる。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合オリゴペプチドは、周知の技術を使用して過度の実験を行うことなく同定することができる。この点に関し、ポリペプチド標的に特異的に結合することができるオリゴペプチドについてオリゴペプチドライブラリーをスクリーニングするための手法が当該分野で周知であることに注意されたい（例えば、米国特許第5,556,762号、同第5,750,373号、同第4,708,871号、同第4,833,092号、同第5,223,409号、同第5,403,484号、同第5,571,689号、同第5,663,143号；PCT公開WO84/03506およびWO84/03564；Geysen et al., Proc. Na

tl. Acad. Sci. USA., 81:3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82:178-182 (1985); Geysen et al., Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirlla, S. E. et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H. B. et al., (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. et al., (1991) Nature, 352:624; Marks, J. D. et al., (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A. S. et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363およびSmith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668を参照のこと。

10

**【0320】**

「PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合有機分子」は、本明細書中に記載されるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対して（好ましくは特異的に）結合する、本明細書中で定義されるオリゴペプチドまたは抗体以外の有機分子である。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合有機分子は、公知の方法論を使用して同定し、そして化学合成すること

20

30

40

50

ができる（例えば、PCT公開WO 00 / 00823およびWO 00 / 39585を参照のこと）。PRO 226、PRO 257、PRO 268、PRO 290、PRO 36006、PRO 363、PRO 365、PRO 382、PRO 444、PRO 705、PRO 1071、PRO 1125、PRO 1134、PRO 1155、PRO 1281、PRO 1343、PRO 1379、PRO 1380、PRO 1387、PRO 1419、PRO 1433、PRO 1474、PRO 1550、PRO 1571、PRO 1572、PRO 1759、PRO 1904、PRO 35193、PRO 4341、PRO 4348、PRO 4369、PRO 4381、PRO 4407、PRO 4425、PRO 4985、PRO 4989、PRO 5737、PRO 5800、PRO 5993、PRO 6017、PRO 7174、PRO 9744、PRO 9821、PRO 9852、PRO 9873、PRO 10196、PRO 34778、PRO 20233、PRO 21956、PRO 57290、PRO 38465、PRO 38683、もしくはPRO 85161結合有機分子は、通常、約2000ダルトン未満の大きさであるか、あるいは、約1500、750、500、250、または200ダルトン未満の大きさである。ここでは、本明細書中に記載されるPRO 226、PRO 257、PRO 268、PRO 290、PRO 36006、PRO 363、PRO 365、PRO 382、PRO 444、PRO 705、PRO 1071、PRO 1125、PRO 1134、PRO 1155、PRO 1281、PRO 1343、PRO 1379、PRO 1380、PRO 1387、PRO 1419、PRO 1433、PRO 1474、PRO 1550、PRO 1571、PRO 1572、PRO 1759、PRO 1904、PRO 35193、PRO 4341、PRO 4348、PRO 4369、PRO 4381、PRO 4407、PRO 4425、PRO 4985、PRO 4989、PRO 5737、PRO 5800、PRO 5993、PRO 6017、PRO 7174、PRO 9744、PRO 9821、PRO 9852、PRO 9873、PRO 10196、PRO 34778、PRO 20233、PRO 21956、PRO 57290、PRO 38465、PRO 38683、もしくはPRO 85161ポリペプチドに対して（好ましくは、特異的に）結合することができるそのような有機分子は、周知の技術を使用して過度の実験を行うことなく同定することができる。この点に関し、ポリペプチド標的に結合できる分子について有機分子ライブラリーをスクリーニングする手法が当該分野で周知であることに注意されたい（例えば、PCT公開WO 00 / 00823およびWO 00 / 39585を参照のこと）。

#### 【0321】

目的の抗原、例えば、腫瘍関連ポリペプチド抗原標的に「結合する」抗体、オリゴペプチドまたは他の有機分子は、好ましくは、抗体、オリゴペプチドまたは他の有機分子が抗原を発現している細胞または組織をターゲティングする場合の診断薬および/または処置薬として有用であり、そして他のタンパク質とは、有意な交差反応を起こさないような十分な親和性で抗原に結合するものである。「非標的」タンパク質への抗体、オリゴペプチドまたは他の有機分子の結合の程度は、蛍光励起細胞分取（FACS）解析または放射免疫沈降（RIA）により測定した場合に、抗体、オリゴペプチドまたは他の有機分子のその特定の標的タンパク質への結合の約10%未満である。標的分子への抗体、オリゴペプチドまたは他の有機分子の結合に関しては、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド標的上のエピトープに対して、用語「特異的結合」または「特異的に結合する」または「特異的である」は、非特異的な相互作用とは測定可能な差違がある結合を意味する。特異的結合は、例えば、一般には結合活性を有しない同様の構造の分子であるコントロール分子の結合と比較して分子の結合を決定することにより測定することができる。例えば、特異的結合は、標的と同様のコントロール分子、例えば、過剰量の非標識標的との競合により決定できる。この場合、プローブへの標識標的の結合が、過剰な非標識標的により競合的に抑制された場合に、特異的結合が示唆される。用語特定のポリペプチドあるいは特定のポリペプチド標的上のエピトープに対する「特異的結合」またはそれらに「対して特異的に結合する」またはそれらに「対して特異的である」は、本明細書中で使用される場合は、例えば、少なくとも約 $10^{-4}$  M、あるいは、少なくとも約 $10^{-5}$  M、あるいは

、少なくとも約  $10^{-6}$  M、あるいは、少なくとも約  $10^{-7}$  M、あるいは、少なくとも約  $10^{-8}$  M、あるいは、少なくとも約  $10^{-9}$  M、あるいは、少なくとも約  $10^{-10}$  M、あるいは、少なくとも約  $10^{-11}$  M、あるいは、少なくとも約  $10^{-12}$  M、あるいはそれ以上の標的に対する Kd を有している分子を示す。用語「特異的結合」は、分子が、任意の他のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープに対しては実質的には結合することなく、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープに結合する結合を意味する。

# 【0322】

「PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161を発現している腫瘍細胞の増殖を阻害する」抗体、オリゴペプチド、または他の有機分子、あるいは「増殖阻害」抗体、オリゴペプチド、または他の有機分子は、適切なPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを発現または過剰発現している癌細胞の測定可能な増殖阻害を生じるものである。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドは、癌細胞の表面上で発現させられる膜貫通ポリペプチドである場合も、また、癌細胞によって生産され、そして分泌されるポリペプチドである場合もある。好ましい増殖阻害性抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474

10

20

30

40

50

、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体、オリゴペプチド、あるいは有機分子は、PRO226-、PRO257-、PRO268-、PRO290-、PRO36006-、PRO363-、PRO365-、PRO382-、PRO444-、PRO705-、PRO1071-、PRO1125-、PRO1134-、PRO1155-、PRO1281-、PRO1343-、PRO1379-、PRO1380-、PRO1387-、PRO1419-、PRO1433-、PRO1474-、PRO1550-、PRO1571-、PRO1572-、PRO1759-、PRO1904-、PRO35193-、PRO4341-、PRO4348-、PRO4369-、PRO4381-、PRO4407-、PRO4425-、PRO4985-、PRO4989-、PRO5737-、PRO5800-、PRO5993-、PRO6017-、PRO7174-、PRO9744-、PRO9821-、PRO9852-、PRO9873-、PRO10196-、PRO34778-、PRO20233-、PRO21956-、PRO57290-、PRO38465-、PRO38683-、もしくはPRO85161を発現している腫瘍細胞の増殖を、適切な対照と比較して、20%または20%以上、好ましくは、約20%から約50%、そしてなおより好ましくは、50%または50%以上（例えば、約50%から約100%）阻害する。対照は、通常は、試験される抗体、オリゴペプチド、または他の有機分子で処理されていない腫瘍細胞である。増殖阻害は、細胞培養物中、約0.1~30 $\mu$ g/mLまたは約0.5nM~200nMの抗体濃度において測定することができ、ここで増殖阻害は、抗体への腫瘍細胞の曝露から1~10日後に測定される。インビボの腫瘍細胞の増殖阻害は、様々な方法で決定できる。抗体は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、または抗PRO85161抗体の、約1 $\mu$ g/kgから約100mg/kg体重での投与によって、腫瘍の大きさの縮小、または腫瘍の増殖の減少が、抗体の最初の投与から約5日から3ヶ月以内に、好ましくは、約5日から30日以内に生じる場合に、増殖阻害性である。

#### 【0323】

「アポトーシスを誘導する」抗体、オリゴペプチドまたは他の有機分子は、アネキシンVの結合、DNAのフラグメント化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞の断片化および/または膜ベシクル（アポトーシス体と称する）の形成により判断されるプログラムされた細胞死を誘導するものである。細胞は、通常は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO

1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを過剰発現している細胞である。好ましくは、細胞は、腫瘍細胞、例えば、前立腺、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、肺、腎臓、結腸、膀胱の細胞である。アポトーシスに関連する細胞事象を評価するために様々な方法が利用できる。例えば、ホスファチジルセリン（PS）転座は、アネキシン結合により測定でき；DNAフラグメント化は、DNAラダー化を介して評価でき；そして、DNAフラグメント化に伴う核/クロマチン縮合は、低二倍体細胞の任意の増大により評価できる。好ましくは、アポトーシスを誘導する抗体、オリゴペプチドまたは他の有機分子は、アネキシン結合アッセイにおいて非投与の細胞と比較してアネキシン結合の約2～50倍、好ましくは約5～50倍、そして最も好ましくは約10～50倍の誘導をもたらすものである。

#### 【0324】

抗体の「エフェクター機能」は、抗体のFc領域（ネイティブ配列のFc領域またはアミノ酸配列改変体のFc領域）に起因し得る生物学的活性のことをいい、そして、抗体アイソタイプと共に変動する。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合および補体依存性細胞傷害；Fcレセプター結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）；貪食作用；細胞表面レセプター（例えば、B細胞レセプター）のダウンレギュレーション；およびB細胞活性化が挙げられる。

#### 【0325】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」すなわち「ADCC」とは、特定の細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球およびマクロファージ）上に存在するFcレセプター（FcR）に結合している分泌Igにより、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原担持標的細胞に特異的に結合し、そしてその後、細胞毒素により標的細胞を殺滅することができるようにするという細胞傷害の形態のことをいう。抗体は、細胞傷害性細胞を「武装」させ、そしてそのような殺滅のために絶対に必要なものである。ADCCを媒介する主要な細胞であるNK細胞は、FcRIIIのみを発現するのに対し、単球は、FcRI、FcRIIおよびFcRIIIを発現する。造血細胞上のFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)の464ページの表3に総括されている。目的の分子のADCC活性を評価するためには、米国特許第5,500,362号または同第5,821,337号に記載されているようなインビトロのADCCアッセイを実施してよい。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられる。あるいは、または追加的に、目的の分子のADCC活性は、例えば、Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95: 652-656 (1998)に開示されているような動物モデルにおいてインビボで評価してよい。

#### 【0326】

「Fcレセプター」すなわち「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを説明する。好ましいFcRは、ネイティブ配列のヒトFcRである。さらに、好ましいFcRは、IgG抗体に結合するもの（レセプター）であり、FcRI、FcRIIおよびFcRIIIのサブクラスのレセプターが挙げられ、これらのレセプターの対立遺伝子改変体および選択的スプライシング型も含まれる。FcRIIIレセプターは、FcRIIIA（「活性化レセプター」）およびFcRIIB（「抑制レセプター」）を包含し、これらはその細胞質ドメインにおいて主に異なっている類似のアミノ酸配列を有する。活性化レセプターFcRIIIAは、その細胞質ドメイン中に免疫受容活性化チロシ

10

20

30

40

50

ンモチーフ (ITAM) を含む。抑制レセプター Fc R I I B は、その細胞質ドメインに免疫受容抑制性チロシンモチーフ (ITIM) を含む (Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203 - 234 (1997) の概説 M を参照のこと)。Fc R は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457 - 492 (1991); Capel et al., Immunomethods 4: 25 - 34 (1994); および de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330 - 41 (1995) において概説されている。将来同定されるものを含む他の Fc R は、本明細書においては用語「Fc R」に包含される。この用語はまた、胎児への母体 Ig G の移行の原因となる新生児レセプター Fc R n も含む (Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) および Kim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994))。

10

#### 【0327】

「ヒトエフェクター細胞」は、1つ以上の Fc R を発現し、エフェクター機能を示す白血球である。好ましくは、この細胞は、少なくとも Fc R I I I を発現し、そして ADCC エフェクター機能を示す。ADCC を媒介するヒト白血球の例としては、末梢血単核細胞 (PBMC)、ナチュラルキラー (NK) 細胞、単球、細胞傷害性 T 細胞および好中球が挙げられ；PBMC および NK 細胞が好ましい。エフェクター細胞は、天然の起源から、例えば、血液から単離され得る。

#### 【0328】

「補体依存性細胞傷害」すなわち「CDC」は、補体の存在下における標的細胞の溶解のことをいう。古典的補体経路の活性化は、その同種抗原に結合している (適切なサブクラスの) 抗体に補体系の第 1 成分 (C1q) が結合することにより開始される。補体活性化を評価するためには、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996) に記載されているような CDC アッセイを実施してよい。

20

#### 【0329】

用語「癌」および「癌性の」は、代表的には調節されていない細胞の成長を特徴とする哺乳動物における生理学的状態のことをいうか、それを説明するものである。癌の例としては、癌腫、リンパ種、芽腫、肉腫および白血病が挙げられるがこれらに限定されない。このような癌のより特定の例としては、扁平上皮癌、肺癌 (小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌)、腹膜の癌、肝細胞癌、胃癌 (消化器癌を含む)、脾癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、直腸結腸癌、子宮体癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝臓癌種および様々な型の頭頸部癌ならびに B 細胞リンパ腫 (低悪性度 / 濾胞性非ホジキンリンパ腫 (NHL) ; 小リンパ球性 (SL) NHL ; 中悪性度 / 濾胞性 NHL ; 中悪性度のびまん性 NHL ; 高悪性度の免疫芽球性 NHL ; 高悪性度のリンパ芽球性 NHL ; 高悪性度の小型非分割細胞 NHL ; 嵩高い疾患 (bulky disease) NHL ; マントル細胞リンパ腫 ; AID S 関連リンパ腫 ; およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症を含む) ; 慢性リンパ性白血病 (CLL) ; 急性リンパ芽球性白血病 (ALL) ; ヘアリー細胞白血病 ; 慢性骨髄芽球性白血病 ; および移植後のリンパ増殖性障害 (PTLD) が挙げられる。好ましくは、癌は、IGF レセプターを発現する腫瘍、より好ましくは乳癌、肺癌、直腸結腸癌または前立腺癌、そして最も好ましくは乳癌または前立腺癌を含む。

30

40

#### 【0330】

「化学療法剤」とは、癌の処置において有用な化合物である。化学療法剤の例としては、アルキル化剤 (例えば、チオテパおよび CYTOXAN (登録商標) シクロホスファミド) ; スルホン酸アルキル (例えば、ブスルファン、インプロスルファンおよびビボスルファン) ; アジリジン (例えば、ベンゾドパ (benzodopa)、カルボコン、メツレドパ (meturedopa) およびウレドパ (uredopa)) ; エチレンイミン およびメチラメラミン (アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホル

50

アミド、トリエチレンチオホスホルアミド (triethylenethiophosphoramidate) およびトリメチロールメラミン (trimethylololomelamine) を含む) ; アセトゲニン (特にブラタシンおよびブラタシノン) ; カンプト  
 テシン (合成アナログトポテカンを含む) ; プリオスタチン ; カリスタチン (callystatin) ; CC - 1065 (アドゼレシン、カルゼレシン (carzelesin) およびビゼレシン合成アナログを含む) ; クリプトフィシン (cryptophycin) (特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8) ; ドラスタチン ; デュオカル  
 マイシン (合成アナログ、KW - 2189およびCB1 - TM1を含む) ; エレウテロビン (eleutherobin) ; パンクラチスタチン (pancratistatin) ; サルコジクチン (sarcodictyin) ; スポンジスタチン (spongistatin) ; ナイトロジェンマスタード (例えば、クロラムブシル、クロルナファジン  
 、クロロホスファミド (cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミン、メルファラン、ノベンブシン (novembichin)、フェネステリン (phenesterine)、プレドニムスチン (prednimustine)、トロフォスファミド (trofosfamide)、ウラシルマスタード) ; ニトロソ尿素 (nitrosurea) (例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン (fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン  
 およびラニムヌスチン (ranimnustine)) ; 抗生物質 (例えば、エネジン抗生物質 (例えば、カリケアマイシン、特にカリケミシガンマ1IおよびカリケミシンオメガI1 (例えば、Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183 - 186 (1994)) ; ダイネミシン (dynemicin) (ダイネミシンAが含まれる)、ビスホスホネート (例えば、クロドロネート、エスペラマイシン、ならびにネ  
 オカルジノスタチン発色団 (neocarzinostatin chromophore)、および関連する色素タンパク質エンジン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン (aclacinomycin)、アクチノマイシン、オートラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン (carabycin)、カルミノマイ  
 シン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、アドリアマイシン (ADRIAMYCIN (登録商標)) ドキソルビシン (モルホリノ - ドキソルビシン、シアノモルホリノドキソルビシン、2 - ピロリノ - ドキソルビシン、およびデオキシドキソルビシンが含まれる)、エビルビシン、エソルビシン、イダラルビシン、マルセロマイシン (marcellomycin)、マイトマイシン、(例えば、マイトマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾトシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルビシン ; 代謝拮抗物質 (例えば、メ  
 トトレキセートおよび5 - フルオロウラシル (5 - FU) ; 葉酸アナログ (例えば、デノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトトレキセート、プリンアナログ (例えば、フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン ; ビリミジンアナログ (例えば、アンシタビン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン (doxifluridine)、エノシタビン (enocitabine)、フロキシウリジン (floxuridine) ; アンドロゲン (例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール (epitiosstanol)、メピチオスタン (mepitiosstane)、テストラクトン、抗副腎薬 (anti - adrenals (例えば、アミノグルテチミド (aminoglutehimide)、ミトタン (mitotane)、トリロスタン (trilostane) ; 葉酸補充薬 (例えば、フロリン酸 (frolinic acid)) ; アセグラトン (aceglatone)、アルドホスファミドグリコシド、アミノレブリン酸 ; エニルウラシル ; アムサクリン ; ベストラブシル ; ビサントレン ; エダトラキセート (edatraxate) ; デフォファミン (defofamine) ; デメコルシン ; ジアジコン (diaziquone) ; エルホルニチン (elforn



ithine) ; 酢酸エリブチニウム ; エボチロン ; エトグルシド ; 硝酸ガリウム ; ヒドロキシ尿素 ; レンチナン ; ロニダミン ; メイタンシノイド (例えば、メイタンシンおよびアンサミトシン) ; ミトグアゾン ; ミトキサントロン ; モビダモール ; ニトラクリン (nitraerine) ; ペントスタチン ; フェナメト ; ピラルピシン ; ロソキサントロン ; ポドフィリン酸 (podophyllinic acid) 、 2 - エチルヒドラジド、プロカルバジン ; PSK (登録商標) 多糖複合体 (JHS Natural Products, Eugene, OR) ; ラゾキサン ; リゾキシン ; シゾフィラン、スピロゲルマニウム ; テヌアゾン酸 ; トリアジコン ; 2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン ; トリコテセン (trichothecene) (特に、T - 2 毒素、ベラクリン A、ロリジン A、およびアングイジン) ; ウレタン (urethan) ; ビンデシン ; ダカルバジン ; マンノムスチン ; ミトブロニトール ; ミトラクトール ; ピボプロマン ; ガシトシン (gacytosine) ; アラビノシド (「Ara - C」) ; シクロホスファミド ; チオテパ ; タキソイド (taxoid) (例えば、TAXOL (登録商標) パクリタキセル (Bristol - Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) 、 ABRAAXANE (登録商標) Cremophor - free、パクリタキセルのアルブミン操作された (albumin - engineered) ナノ粒子処方物ドキシタキセル (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 、および TAXOTERE (登録商標) ドセタキセル (Rhone - Poulenc Rorer, Antony, France) ) ; クロラムブシル (chlorambucil) ; GEMZAR (登録商標) ゲムシタピン ; 6 - チオグアニン ; メルカプトプリン ; メトトレキセート ; 白金アナログ (例えば、シスプラチン、およびカルボプラチン) ; ビンブラスチン ; 白金 ; エトボシド (VP - 16) ; イホスファミド ; ミゴキサントロン ; ピンクリスチン ; NAVELBINE (登録商標) ビノレルピン ; ノバントロン ; テニボシド ; エダトレキセート ; ダウノマイシン ; アミノプテリン ; キセロダ (xeloda) ; イバンドロネート (ibandronate) ; CPT - I1 ; トポイソメラーゼインヒビター RFS 2000 ; ジフルオロメチルオルニチン (DMFO) ; レチノイド (例えば、レチン酸) ; カペシタビン (capecitabine) ; ならびに上記の任意のものの薬学的に受容可能な塩、酸または誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

### 【0331】

この定義に同様に含まれるものは、腫瘍に対するホルモンの作用を制御または阻害する作用を有する抗ホルモン剤 (例えば、抗エストロゲンおよび選択的エストロゲンレセプターモジュレーター (modulator) (SERM) (タモキシフェン (例えば、NOLVADEX (登録商標) タモキシフェンを含む) 、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン (trioxifene) 、ケオキシフェン (keoxifene) 、LY117018、オナプリストン (onapristone) および FARESTON トレミフェン ; 副腎におけるエストロゲン産生を制御する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼインヒビター (例えば、4 (5) - イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE (登録商標) 酢酸メゲストロール、AROMASIN (登録商標) エキセメスタン、フォルメスタニー (formestanie) 、ファドロゾール、RIVISOR (登録商標) ボロゾール (vorozole) 、FEMARA (登録商標) レトロゾールおよび ARIMIDEX (登録商標) アナストロゾール) ; および抗アンドロゲン (例えば、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリドおよびゴセレリン) ; ならびにトロキサシタビン (troxacitabine) (1, 3 - ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ) ; アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に例えば、PKC - アルファ、Ral f および H - Ras などの異常な細胞増殖に関与するとされるシグナリ伝達経路における遺伝子の発現を抑制するもの ; リボザイム (例えば、VEGF 発現インヒビター (例えば、ANGIOZYME (登録商標) リボザイム) および HER2 発現インヒビター) ; ワクチン (例えば、遺伝子療法ワクチン、例えば、ALLOVECTIN (登録商標) ワクチン、LEUVECTIN (登録商標) ワク

10

20

30

40

50

チンおよびVAXID（登録商標）ワクチン；PROLEUKIN（登録商標）rIL-2；LURTOTECAN（登録商標）トポイソメラーゼ1インヒビター；ABARELIX（登録商標）rmRH；および上記のいずれかの製薬上許容しうる塩、酸または誘導体である。

【0332】

用語「細胞増殖性障害」および「増殖性障害」は、ある程度の異常な細胞増殖に関連する障害のことをいう。本発明の1つの態様において、細胞増殖性障害は、癌である。

【0333】

「腫瘍」とは、本明細書中で使用されるとき、悪性良性に関わらずすべての新生物細胞の成長および増殖ならびにすべての前癌および癌性の細胞および組織のことをいう。

10

【0334】

「細胞死を誘導する」抗体、オリゴペプチドまたは他の有機分子は、生存細胞を非生存性とするものである。細胞は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを発現する細胞であり、好ましくは、同じタイプの組織の正常な細胞と比較して、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを過剰発現する細胞である。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドは、癌細胞の表面上で発現される膜貫通ポリペプチドである場合も、また、癌細胞によって生産され、分泌されるポリペプチドである場合もある。好ましくは、その細胞は、癌細胞、例えば、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、膵臓または膀胱の細胞である。インビトロでの細胞死は、抗体依存性細胞媒介細胞傷害

20

30

40

50

(A D C C) または補体依存性細胞傷害 (C D C) により誘導された細胞死を識別するために補体および免疫エフェクター細胞の非存在下において決定され得る。すなわち、細胞死に関するアッセイは、熱不活性化血清を用い (すなわち補体非存在下において)、そして免疫エフェクター細胞の非存在下において実施され得る。抗体、オリゴペプチドまたは他の有機分子が細胞死を誘導することができるか否かを判定するためには、ヨウ化プロピジウム (P I)、トリパンプルー (M o o r e e t a l . , C y t o t e c h n o l o g y 17: 1 - 11 (1995) を参照のこと) または 7 A A D の取り込みにより評価される膜完全性の喪失を、未処理細胞と比較して評価することができる。好ましい細胞死誘導性の抗体、オリゴペプチドまたは他の有機分子は、B T 474 細胞における P I 取り込みアッセイにおいて P I 取り込みを誘導するものである。

10

#### 【0335】

本明細書中で使用されるとき、用語「免疫接着物 (i m m u n o a d h e s i o n)」は、免疫グロブリンの定常ドメインのエフェクター機能に異種タンパク質の結合特異性 (「接着」) を組み合わせた抗体様分子を表す。構造的には、免疫接着物は、抗体の抗原認識結合部位および抗原結合部位以外の所望の結合特異性を有する (すなわち「異種」) アミノ酸配列と免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合を含む。免疫接着分子の接着部分は、代表的には、少なくともレセプターまたはリガンドの結合部位を含む隣接するアミノ酸配列である。免疫接着物における免疫グロブリン定常ドメイン配列は、任意の免疫グロブリン (例えば、I g G - 1、I g G - 2、I g G - 3 または I g G - 4 サブタイプ、I g A (I g A - 1 および I g A - 2 を含む)、I g E、I g D または I g M) から得てよい。

20

#### 【0336】

用語「標識」は、本明細書中で使用されるとき、「標識された」抗体を作製するために抗体に直接的または間接的に結合体化された検出可能な化合物または組成物のことをいう。標識は、それ自体が検出可能であり得る (例えば、放射性同位体標識または蛍光標識) か、または、酵素標識の場合は、検出可能な基質化合物または基質組成物の化学的改変を触媒し得る。

#### 【0337】

「複製防止剤」とは、アポトーシス、血管形成抑制、細胞増加、腫瘍殺傷、有糸分裂抑制、細胞周期進行遮断、細胞成長の停止、腫瘍への結合、細胞メディエーターとしての作用などの機序に関わらず、細胞の複製、機能および / または成長を抑制または防止するか、または細胞を破壊する薬剤である。そのような薬剤としては、化学療法剤、細胞傷害性薬剤、サイトカイン、増殖阻害剤もしくは抗ホルモン剤、例えば、抗エストロゲン化合物 (例えば、タモキシフェン、オナプリストン (E P 6 1 6 8 1 2 参照) などの抗プロゲステロン; またはフルタミドなどの抗アンドロゲン、ならびにアロミダーゼインヒビターまたはアンドロゲンなどのホルモン剤が挙げられる。

30

#### 【0338】

用語「細胞傷害性薬剤」は、本明細書中で使用されるとき、細胞の機能を抑制または防止および / または細胞の破壊を引き起こす物質のことをいう。この用語は、放射性同位元素 (例えば、A t <sup>211</sup>、I <sup>131</sup>、I <sup>125</sup>、Y <sup>90</sup>、R e <sup>186</sup>、R e <sup>188</sup>、S m <sup>153</sup>、B i <sup>212</sup>、P <sup>32</sup>、および L u の放射性同位体) 化学療法薬 (例えば、メトトレキセート、アドリアマイシン、ピンカルカロイド (ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド)、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシン C、クロラムブシル、ダウノルビシン、または他の挿入剤)、およびそれらの酵素および断片 (例えば、核酸分解酵素、抗生物質、および毒素 (例えば、低分子毒素、または細菌、真菌、植物、もしくは動物を起源とする酵素活性のある毒素 (それらの断片および / または変異体が含まれる))、ならびに、以下に開示される様々な抗腫瘍薬または抗癌剤を含むように意図される。他の細胞傷害性薬剤は、下に記載する。殺腫瘍傷性薬剤は、腫瘍細胞の破壊をもたらす。

40

#### 【0339】

50

本明細書においてアンタゴニストと組み合わせて使用するための特定の腫瘍型に対する本明細書中の好ましい細胞傷害性薬剤は、以下の通りである：

1．前立腺癌：アンドロゲン、ドセタキセル、パクリタキセル、エストラムスチン（*estramustine*）、ドキシソルビン、ミトキサントロン、*ErbB2*ドメイン（単数または複数）に対する抗体（例えば、*2C4*（*WO01/00245*；ハイブリドーマ *ATCC HB-12697*）（これは、*ErbB2*の細胞外ドメインの中の1つの領域（例えば、*ErbB2*の約残基22から約残基584（それらが含まれる）までの領域の中の任意の1つ以上の残基）に結合する）、*AVASTIN*（登録商標）抗血管内皮成長因子（*VEGF*）、*TARCEVA*（登録商標）*OSI-774*（エルロチニブ（*erlotinib*））（*Genenetech and OSI Pharmaceuticals*）、または他の上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤（*EGFR TKI's*）。

2．胃癌：5-フルオロウラシル（*5FU*）、*XELODA<sup>TM</sup>*カペシタビン、メトトレキサート、エトポシド、シスプラチン/カルボプラチン、パクリタキセル（*paclitaxel*）、ドセタキセル、ゲムシタビン、ドキシソルビンおよび*CPT-11*（カンプトテシン（*camptothecin*）-11；イリノテカン、米国商標名：*CAMPTOSAR*（登録商標））。

3．膵臓癌：ゲムシタビン、*5FU*、*XELODA<sup>TM</sup>*カペシタビン、*CPT-11*、ドセタキセル、パクリタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、*TARCEVA<sup>TM</sup>*エルロチニブおよび他の*EGFR TKI*。

4．直腸結腸癌：5FU、*XELODA<sup>TM</sup>*カペシタビン、*CPT-11*、オキサリプラチン、*AVASTIN<sup>TM</sup>*抗*VEGF*、*TARCEVA<sup>TM</sup>*エルロチニブおよび他の*EGFR TKI*ならびに*EGFR*に結合しレセプター活性化および腫瘍へのシグナル伝達を開始する*EGF*の能力を阻止する*ERBITUX<sup>TM</sup>*（旧称*IMC-C225*）ヒト：マウス-キメラ化モノクローナル抗体。

5．腎臓癌：*IL-2*、インターフェロンアルファ、*AVASTIN<sup>TM</sup>*抗*VEGF*、*MEGACE<sup>TM</sup>*（酢酸メゲストロール）プロゲステロン、ビンブラスチン、*TARCEVA<sup>TM</sup>*エルロチニブおよび他の*EGFR TKI*。

#### 【0340】

「増殖阻害剤」は、本明細書中で使用される場合は、細胞の増殖を阻害する化合物または組成物を意味し、特に、*PRO226-*、*PRO257-*、*PRO268-*、*PRO290-*、*PRO36006-*、*PRO363-*、*PRO365-*、*PRO382-*、*PRO444-*、*PRO705-*、*PRO1071-*、*PRO1125-*、*PRO1134-*、*PRO1155-*、*PRO1281-*、*PRO1343-*、*PRO1379-*、*PRO1380-*、*PRO1387-*、*PRO1419-*、*PRO1433-*、*PRO1474-*、*PRO1550-*、*PRO1571-*、*PRO1572-*、*PRO1759-*、*PRO1904-*、*PRO35193-*、*PRO4341-*、*PRO4348-*、*PRO4369-*、*PRO4381-*、*PRO4407-*、*PRO4425-*、*PRO4985-*、*PRO4989-*、*PRO5737-*、*PRO5800-*、*PRO5993-*、*PRO6017-*、*PRO7174-*、*PRO9744-*、*PRO9821-*、*PRO9852-*、*PRO9873-*、*PRO10196-*、*PRO34778-*、*PRO20233-*、*PRO21956-*、*PRO57290-*、*PRO38465-*、*PRO38683-*、もしくは*PRO85161-*をインビトロもしくはインビボのいずれかで発現している癌細胞を意味する。したがって、増殖阻害剤は、S期にある*PRO226-*、*PRO257-*、*PRO268-*、*PRO290-*、*PRO36006-*、*PRO363-*、*PRO365-*、*PRO382-*、*PRO444-*、*PRO705-*、*PRO1071-*、*PRO1125-*、*PRO1134-*、*PRO1155-*、*PRO1281-*、*PRO1343-*、*PRO1379-*、*PRO1380-*、*PRO1387-*、*PRO1419-*、*PRO1433-*、*PRO1474-*、*PRO1550-*、*PRO1571-*、*PRO1572-*、*PRO1759-*、*PRO1904-*、*PRO35193-*、*PRO4341-*、

10

20

30

40

50

PRO 4 3 4 8 -、PRO 4 3 6 9 -、PRO 4 3 8 1 -、PRO 4 4 0 7 -、PRO 4 4 2 5 -、PRO 4 9 8 5 -、PRO 4 9 8 9 -、PRO 5 7 3 7 -、PRO 5 8 0 0 -、PRO 5 9 9 3 -、PRO 6 0 1 7 -、PRO 7 1 7 4 -、PRO 9 7 4 4 -、PRO 9 8 2 1 -、PRO 9 8 5 2 -、PRO 9 8 7 3 -、PRO 1 0 1 9 6 -、PRO 3 4 7 7 8 -、PRO 2 0 2 3 3 -、PRO 2 1 9 5 6 -、PRO 5 7 2 9 0 -、PRO 3 8 4 6 5 -、PRO 3 8 6 8 3 -、もしくはPRO 8 5 1 6 1 -を発現している細胞のパーセンテージを有意に低下させる薬剤であり得る。増殖阻害剤の例としては、細胞周期の進行を阻止する（S期以外の位置において）薬剤（例えば、G1停止およびM期停止を誘導する薬剤）が挙げられる。従来のM期遮断薬としては、ビンカ（ビンクリスチンおよびビンブラスチン）、タキサンおよびトポイソメラーゼIIインヒビター（例えば、ドキシルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシドおよびブレオマイシン）が挙げられる。G1を停止させる薬剤、例えば、DNAアルキル化剤（例えば、タモキシフェン、ブレドニソン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシルおよびara-C）はまた、S期停止にまで及ぶ。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", Murakami et al., (WB Saunders: Philadelphia, 1995)の特に13ページに見ることができる。タキサン類（パクリタキセルおよびドセタキセル）は、共にイチイ属の木から得られた抗癌剤である。ヨーロッパイチイから得られたドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、Rhône-Poulenc Rorer）は、パクリタキセル（TAXOL（登録商標）、Bristol-Myers Squibb）の半合成アナログである。パクリタキセルおよびドセタキセルは、チューブリン2量体からの微小管の組立を促進し、そして脱重合の防止によって微小管を安定化させることにより、細胞の有糸分裂の抑制をもたらす。

#### 【0341】

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

#### 【0342】

用語「サイトカイン」は、ある細胞集団により放出され、細胞間メディエーターとして別の細胞に作用するタンパク質に関する総称である。このようなサイトカインの例は、リンフォカイン、モノカインおよび従来のポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるものは、成長ホルモン（例えば、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモン）；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン（例えば、卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）および黄体形成ホルモン（LH））；肝成長因子；線維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤性ラクトーゲン；腫瘍壊死因子 - および - ；ミューラー阻害物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンプオエチン（TPO）；神経成長因子（例えば、NGF - ）；血小板成長因子；トランスフォーミング成長因子（TGF）（例えば、TGF - およびTGF - ）；インスリン様成長因子 - Iおよび - II；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子（osteogenic factor）；インターフェロン（例えば、インターフェロン - 、 - および - ）；コロニー刺激因子（CSF）（例えば、マクロファージ-CSF（M-CSF））；顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF）；および顆粒球-CSF（G-CSF）；インターロイキン（IL）（例えば、IL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12）；腫瘍壊死因

10

20

30

40

50

子（例えば、TNF- またはTNF- ）；および他のポリペプチド因子（LIFおよびキトリグンド（KL）を含む）である。本明細書中で使用されるとき、用語サイトカインは、天然起源由来または組換え細胞培養物由来のタンパク質およびネイティブ配列のサイトカインの生物学的活性同等物を含む。

【0343】

用語「添付文書」とは、治療用製品の市販用パッケージ内に慣習的に含まれる指示書のことをいうために用いられ、そのような治療用製品の使用に関する適応症、使用法、用量、投与、禁忌および/または警告に関する情報を含んでいる。

【0344】

用語「遺伝子」とは、（a）本明細書に開示したDNA配列の少なくとも1つを含む遺伝子；（b）本明細書中で開示するDNA配列によりコードされるアミノ酸配列をコードする任意のDNA配列および/または（c）本明細書中で開示するコード配列の相補物にハイブリダイズする任意のDNA配列のことをいう。好ましくは、この用語は、コード領域ならびに非コード領域を含み、好ましくは、正常な遺伝子発現に必要なすべての配列を包む。

10

【0345】

用語「遺伝子ターゲティング」とは、ゲノムDNAフラグメントが哺乳動物細胞内に導入され、そしてそのフラグメントが内在性の相同配列を特定して組換えを起こす場合に生じる相同組換えの型のことをいう。相同組換えによる遺伝子ターゲティングは、特定のゲノム配列を特定の設計の外因性DNAと置き換える組換えDNA技術を使用する。

20

【0346】

用語「相同組換え」とは、相同なヌクレオチド配列の部位における2つのDNA分子または染色分体の間のDNAフラグメントの交換のことをいう。

【0347】

用語「標的遺伝子」（あるいは「標的遺伝子配列」または「標的DNA配列」とも呼ばれる）は、相同組換えにより改変されるべき任意の核酸分子、ポリヌクレオチドまたは遺伝子のことをいう。標的配列は、インタクトな遺伝子、エクソンもしくはイントロン、調節配列または遺伝子間の任意の領域を含む。標的遺伝子は、個々のゲノムDNAにおける特定の遺伝子または遺伝子座の一部を含み得る。

30

【0348】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161遺伝子の「破壊」は、ゲノムDNAの断片が、内因性の相同配列とともに存在しているかまたはそれらと組み換えられる場合に生じる。この場合、破壊は、自然界に存在している遺伝子もしくはその一部の欠失、または自然界に存在している遺伝子の変異であるか、あるいは、破壊は、自然界に存在している遺伝子の機能的な不活化である。あるいは、配列の破壊は、遺伝子トラップベクターを用いた非特異的な挿入性の不活性化により生じてよい（すなわち、ランダムに挿入されたトランスジーンを含み、発現する非ヒトトランスジェニック動物；例えば、2002年8月20日に発行された米国特許第6,436,707号を参照のこと）。これらの配列の破壊または改変としては、DNA配列の挿入、ミスセンス、フレームシフト、欠失または置換もしくは置き換えあるいはそれらの任意の組合せが挙げられ得る。挿

40

50

入は、動物、植物、真菌、昆虫、原生動物またはウイルス起源であり得る遺伝子全体の挿入を含む。破壊は、例えば、正常な遺伝子産物の産生を部分的または完全に抑制するか、または正常な遺伝子産物の活性を増強することにより、その正常な遺伝子産物を変更することができる。好ましくは、破壊は無意味な破壊であり、この場合、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161遺伝子の有意な発現は存在しない。

10

**【0349】**

用語「自然な発現」は、野生型のマウスの中に存在する発現レベルでの、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161遺伝子によってコードされる全長のポリペプチドの発現を意味する。したがって、内因性のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161遺伝子の「自然ではない発現」が存在する破壊は、1つの細胞、選択された細胞、または哺乳動物の全ての細胞の、内因性のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PR

20

30

40

50

O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9 0、P R O 3 8 4 6 5、P R O 3 8 6 8 3、もしくはP R O 8 5 1 6 1 遺伝子によってコードされるポリペプチドの少なくとも一部の発現の部分的あるいは完全な低下を意味する。

【0350】

用語「ノックアウト」とは、破壊によりネイティブの遺伝子の機能的不活性化；ネイティブ遺伝子またはその一部分の欠失；またはネイティブの遺伝子の変異がもたらされるP R O 2 2 6、P R O 2 5 7、P R O 2 6 8、P R O 2 9 0、P R O 3 6 0 0 6、P R O 3 6 3、P R O 3 6 5、P R O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、P R O 1 1 2 5、P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、P R O 1 3 7 9、P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、P R O 1 4 7 4、P R O 1 5 5 0、P R O 1 5 7 1、P R O 1 5 7 2、P R O 1 7 5 9、P R O 1 9 0 4、P R O 3 5 1 9 3、P R O 4 3 4 1、P R O 4 3 4 8、P R O 4 3 6 9、P R O 4 3 8 1、P R O 4 4 0 7、P R O 4 4 2 5、P R O 4 9 8 5、P R O 4 9 8 9、P R O 5 7 3 7、P R O 5 8 0 0、P R O 5 9 9 3、P R O 6 0 1 7、P R O 7 1 7 4、P R O 9 7 4 4、P R O 9 8 2 1、P R O 9 8 5 2、P R O 9 8 7 3、P R O 1 0 1 9 6、P R O 3 4 7 7 8、P R O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9 0、P R O 3 8 4 6 5、P R O 3 8 6 8 3、もしくはP R O 8 5 1 6 1 遺伝子の破壊のことをいう。

【0351】

用語「ノックイン(knock-in)」は、マウスのオルトログ(または他のマウスの遺伝子)の、特異的なヒトP R O 2 2 6 -、P R O 2 5 7 -、P R O 2 6 8 -、P R O 2 9 0 -、P R O 3 6 0 0 6 -、P R O 3 6 3 -、P R O 3 6 5 -、P R O 3 8 2 -、P R O 4 4 4 -、P R O 7 0 5 -、P R O 1 0 7 1 -、P R O 1 1 2 5 -、P R O 1 1 3 4 -、P R O 1 1 5 5 -、P R O 1 2 8 1 -、P R O 1 3 4 3 -、P R O 1 3 7 9 -、P R O 1 3 8 0 -、P R O 1 3 8 7 -、P R O 1 4 1 9 -、P R O 1 4 3 3 -、P R O 1 4 7 4 -、P R O 1 5 5 0 -、P R O 1 5 7 1 -、P R O 1 5 7 2 -、P R O 1 7 5 9 -、P R O 1 9 0 4 -、P R O 3 5 1 9 3 -、P R O 4 3 4 1 -、P R O 4 3 4 8 -、P R O 4 3 6 9 -、P R O 4 3 8 1 -、P R O 4 4 0 7 -、P R O 4 4 2 5 -、P R O 4 9 8 5 -、P R O 4 9 8 9 -、P R O 5 7 3 7 -、P R O 5 8 0 0 -、P R O 5 9 9 3 -、P R O 6 0 1 7 -、P R O 7 1 7 4 -、P R O 9 7 4 4 -、P R O 9 8 2 1 -、P R O 9 8 5 2 -、P R O 9 8 7 3 -、P R O 1 0 1 9 6 -、P R O 3 4 7 7 8 -、P R O 2 0 2 3 3 -、P R O 2 1 9 5 6 -、P R O 5 7 2 9 0 -、P R O 3 8 4 6 5 -、P R O 3 8 6 8 3 -、もしくはP R O 8 5 1 6 1 -をコードする遺伝子、あるいはそれらの変異体のうちの任意のものをコードするヒトcDNAでの置き換えを意味する(すなわち、破壊によって、自然界に存在しているヒト遺伝子での自然界に存在しているマウスの遺伝子の置き換えが生じる)。

【0352】

用語「構築物」または「ターゲティング構築物」とは、標的の組織、細胞株または動物内に移行されるべき人工的に組み立てられたDNAセグメントのことをいう。代表的には、ターゲティング構築物は、特定の目的の遺伝子または核酸配列、マーカー遺伝子および適切なコントロール配列を含む。本明細書中で提供される場合は、標的化構築物には、P R O 2 2 6、P R O 2 5 7、P R O 2 6 8、P R O 2 9 0、P R O 3 6 0 0 6、P R O 3 6 3、P R O 3 6 5、P R O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、P R O 1 1 2 5、P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、P R O 1 3 7 9、P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、P R O 1 4 7 4、P R O 1 5 5 0、P R O 1 5 7 1、P R O 1 5 7 2、P R O 1 7 5 9、P R O 1 9 0 4、P R O 3 5 1 9 3、P R O 4 3 4 1、P R O 4 3 4 8、P R O 4 3 6 9、P R O 4 3 8 1、P R O 4 4 0 7、P R O 4 4 2 5、P R O 4 9 8 5、P R O 4 9 8 9、P R O 5 7 3 7、P R O 5 8 0 0、P R O 5 9 9 3、P R O 6 0 1 7、P R O 7 1 7 4、P R O 9 7 4 4、P R O 9 8 2 1、P R O 9 8 5 2、P R O 9 8 7 3、P R O 1 0 1 9 6、P R O 3 4 7 7 8、P R O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9



0、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161標的化構築物が含まれる。「PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161標的化構築物」には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161遺伝子の少なくとも一部に対して相同であるDNA配列が含まれ、これらは、宿主細胞の中でPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161遺伝子の破壊を生じることができる。

10

20

30

40

50

#### 【0353】

用語「トランスジェニック細胞」は、そのゲノムの中に、破壊されている、修飾されている、変更されている、あるいは、遺伝子標的化の方法によって完全にまたは部分的に置き換えられているPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161遺伝子が含まれている細胞を意味する。

## 【0354】

用語「トランスジェニック動物」とは、本明細書に記載した方法または当該分野で周知の他の方法により破壊または他の方法で改変または変異されている特定の遺伝子をそのゲノム内に含む動物のことをいう。好ましくは、その非ヒトトランスジェニック動物は、哺乳動物である。より好ましくは、その哺乳動物は、げっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）である。さらに、「トランスジェニック動物」は、ヘテロ接合の動物（すなわち、1つの欠損対立遺伝子および1つの野生型対立遺伝子）またはホモ接合の動物（すなわち、2つの欠損対立遺伝子）であり得る。胚は、動物の定義内に属するとみなす。動物を提供することは、胚が在胎期を満了するかどうかにかかわらず、交配もしくは他の方法によって、子宮内に胚または胎児を提供することを含む。

10

## 【0355】

本明細書中で使用されるとき、用語「選択マーカー」および「位置選択マーカー」とは、遺伝子を有している細胞のみを特定の条件下で生存および／または成長させることができる、ある産物をコードする遺伝子のことをいう。例えば、導入されたネオマイシン耐性（Neo<sup>r</sup>）遺伝子を発現する植物細胞および動物細胞は、化合物G418に耐性である。Neo<sup>r</sup>遺伝子マーカーを有しない細胞は、G418により殺滅される。他の陽性選択マーカーは、当業者に公知であるか、または推測できるものである。

## 【0356】

用語「調節する」または「調節」は、本明細書中で使用される場合は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161遺伝子の機能、発現、活性、またはあるいは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161遺伝子に関連する表現形の、低下、阻害、減少、緩和、増大、あるいは増強を意味する。

20

30

40

## 【0357】

用語「寛解する」または「寛解」は、本明細書中で使用されるとき、状態、疾患、障害または表現型（異常または症状を含む）の減少、低減または排除のことをいう。

## 【0358】

用語「異常性」は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO141

50

9、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161が関与している任意の疾患、障害、状態、あるいは表現形（病状および行動観察が含まれる）を意味する。

【0359】

【化1】

10

表1

```

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

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

```

20

30

【0360】

【化 2】

表 1 (続き)

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

【 0 3 6 1 】

【化 3】

表 1 (続き)

```

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

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

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

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

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

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

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

```

【 0 3 6 2 】

【化 4】

表 1 (続き)

```

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

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;
    /* fill in match matrix
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

【 0 3 6 3 】

40

【 化 5 】

表 1 ( 続 き )

```

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

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

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

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

    id = xx - yy + len1 - 1;
    if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
        col1[yy] = mis;

```

【 0 3 6 4 】

40

【化 6】

表 1 (続き)

```

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

```

10

20

30

40

【 0 3 6 5 】



【化 7】

表 1 (続き)

<pre> /* * * print() -- only routine visible outside this module * * static: * getmat() -- trace back best path, count matches: print() * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print() * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align() * nums() -- put out a number line: dumpblock() * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock() * stars() -- put a line of stars: dumpblock() * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname */ </pre>	10
<pre> #include "nw.h"  #define SPC      3 #define P_LINE   256    /* maximum output line */ #define P_SPC    3      /* space between name or num and seq */  extern  _day[26][26]; int     olen;           /* set output line length */ FILE    *fx;            /* output file */ </pre>	
<pre> print() {     int     lx, ly, firstgap, lastgap;    /* overlap */      if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {         fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);         cleanup(1);     }     fprintf(fx, "&lt;first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);     fprintf(fx, "&lt;second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);     olen = 60;     lx = len0;     ly = len1;     firstgap = lastgap = 0;     if (dmax &lt; len1 - 1) {    /* leading gap in x */         pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;         ly -= pp[0].spc;     }     else if (dmax &gt; len1 - 1) {    /* leading gap in y */         pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);         lx -= pp[1].spc;     }     if (dmax0 &lt; len0 - 1) {    /* trailing gap in x */         lastgap = len0 - dmax0 - 1;         lx -= lastgap;     }     else if (dmax0 &gt; len0 - 1) {    /* trailing gap in y */         lastgap = dmax0 - (len0 - 1);         ly -= lastgap;     }     getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);     pr_align(); } </pre>	20
	30
	40
【 0 3 6 6 】	

【化 8】

表 1 (続き)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
{
    int      lx, ly;                                           /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap;                                /* leading trailing overlap */

    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char      outx[32];
    double    pct;
    register  n0, n1;
    register char *p0, *p1;
    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;
    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

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

```

【 0 3 6 7 】

10

20

30

40

【化 9】

表1(続き)

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        gapx, (dna)? "base":"residue", (gapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        gapy, (dna)? "base":"residue", (gapy == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINSO, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINSO, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
static nm; /* matches in core -- for checking */
static lmax; /* lengths of stripped file names */
static ij[2]; /* jmp index for a path */
static nc[2]; /* number at start of current line */
static ni[2]; /* current elem number -- for gapping */
static siz[2];
static char *ps[2]; /* ptr to current element */
static char *po[2]; /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int nn; /* char count */
    int more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(nameex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;
        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

10

20

pr\_align

30

40

【 0 3 6 8 】

【化 1 0】

表 1 (続き)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (I = more = 0; I < 2; I++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;
        more++;
        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else {
            /* we're putting a seq element
             */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;
            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]]++;
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]]++;
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (I = 0; I < 2; I++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register I;
    for (I = 0; I < 2; I++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr\_align

10

20

30

dumpblock

40

【 0 3 6 9 】

【化 1 1】

表 1 (続き)

...dumpblock

```

(void) putc('\n', fx);
for (I = 0; I < 2; I++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (I == 0)
            nums(I);
        if (I == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(I);
        if (I == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (I == 1)
            nums(I);
    }
}
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int ix; /* index in out[] holding seq line */
{
    char nline[P_LINE];
    register I, j;
    register char *pn, *px, *py;
    for (pn = nline, I = 0; I < lmax+P_SPC; I++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (I = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (I%10 == 0 || (I == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (I < 0)? -I : I;
                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (I < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            I++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = I;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int ix;
{

```

10

20

30

40

nums

putline

【 0 3 7 0 】

【化 1 2】

表 1 (続き)

	<pre> int          I; register char *px;  for (px = namex[ix], I = 0; *px &amp;&amp; *px != '\0'; px++, I++)     (void) putc(*px, fx); for (; I &lt; lmax+P_SPC; I++)     (void) putc(' ', fx);  /* these count from 1:  * ni[] is current element (from 1)  * nc[] is number at start of current line  */ for (px = out[ix]; *px; px++)     (void) putc(*px&amp;0x7F, fx); (void) putc('\n', fx); </pre>	...putline	10
/* * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock() */	<pre> static stars() {     int          I;     register char *p0, *p1, cx, *px;      if (!*out[0]    (*out[0] == ' ' &amp;&amp; *(p0[0]) == ' ')            !*out[1]    (*out[1] == ' ' &amp;&amp; *(p0[1]) == ' '))         return;     px = star;     for (I = lmax+P_SPC; I; I--)         *px++ = ' ';      for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 &amp;&amp; *p1; p0++, p1++) {         if (isalpha(*p0) &amp;&amp; isalpha(*p1)) {             if (xbm[*p0-'A'] &amp; xbm[*p1-'A']) {                 cx = '*';                 nm++;             }             else if (!dna &amp;&amp; _day[*p0-'A'][*p1-'A'] &gt; 0)                 cx = '.';             else                 cx = ' ';         }         else             cx = ' ';         *px++ = cx;     }     *px++ = '\n';     *px = '\0'; } </pre>	stars	20
【 0 3 7 1】			40

【 化 1 3 】

表 1 ( 続 き )

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

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

**stripname**

10

【 0 3 7 2 】

【化 1 4】

表 1 (続き)

```

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

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE    *fj;
int      cleanup();                          /* cleanup tmp file */
long     lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(I)
    int    I;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(I);
}
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)
    char    *file;    /* file name */
    int      *len;    /* seq len */
{
    char      line[1024], *pseq;
    register char    *px, *py;
    int      natgc, tlen;
    FILE     *fp;
    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

```

10

cleanup

20

getseq

30

40

【 0 3 7 3 】



【化 1 5】

表 1 (続き)

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}
char *
g_calloc(msg, nx, sz)                                g_calloc
char *msg;                                           /* program, calling routine */
int nx, sz;                                           /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();
    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()                                           readjmps
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register I, j, xx;
    if (tf) {
        (void) fclose(tf);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (I = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; I++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;
        }
    }
}

```

【 0 3 7 4 】

40

【化 1 6】

表 1 (続き)

...readjumps

```

    if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }

    else
        break;
}

if (I >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}

if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1 */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}

else
    break;
}

/* reverse the order of jumps */
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    I = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = I;
    I = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = I;
}

for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    I = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = I;
    I = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = I;
}

if (fd >= 0)
    (void) close(fd);

if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}

```

【 0 3 7 5】

40

【 化 1 7 】

表 1 ( 続 き )

```

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

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

```

**writejumps**

10

【 0 3 7 6 】

【化 1 8】

表2

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

%アミノ酸配列同一性=

ALIGN-2により決定した場合の2つのポリペプチド配列の間の同一で一致するアミノ酸残基の数)÷(PROポリペプチドのアミノ酸残基の総数)=

10

 $5 \div 15 = 33.3\%$ 

表3

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

%アミノ酸配列同一性=

20

ALIGN-2により決定した場合の2つのポリペプチド配列の間の同一で一致するアミノ酸残基の数)÷(PROポリペプチドのアミノ酸残基の総数)=

 $5 \div 10 = 50\%$ 

表4

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

30

%核酸配列同一性=

ALIGN-2により決定した場合の2つの核酸配列の間の同一で一致するヌクレオチドの数)÷(PRO-DNA核酸配列のヌクレオチドの総数)=

 $6 \div 14 = 42.9\%$ 

【 0 3 7 7】

40

【化 19】

表5

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

%核酸配列同一性＝

ALIGN-2により決定した場合の2つの核酸配列の間の同一で一致するヌクレオチドの数)÷(PRO-DNA核酸配列のヌクレオチドの総数)＝

10

4÷12＝33. 3%

#### II. 本発明の組成物および方法

A. 全長のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド

20

本発明により、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドと本出願において呼ばれるポリペプチドをコードする、新しく同定され、単離されたヌクレオチド配列が提供される。具体的には、様々なPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするcDNAが、以下の実施例にさらに

30

40

50

詳細に開示されるように、同定され、そして単離されている。異なる回の発現において生産されたタンパク質は、様々なPRO数を生じ得るが、UNQ数は、任意の所定のDNAおよびコードされるタンパク質について固有であり、変化しないであろうことに留意されたい。しかしながら、簡便のため、本明細書においては、本明細書中で開示する完全長のネイティブの核酸分子によりコードされるタンパク質ならびにPROの前記した定義に含まれるすべてのさらなるネイティブの相同体および改変体は、その起源または調製様式に関わらず、「PRO/番号」と呼ぶ。

#### 【0378】

後述する実施例に開示するように、様々なcDNAクローンがATCCに寄託されている。当業者は、これらのクローンの実際のヌクレオチド配列を、当該分野の日常的方法を用いて寄託クローンの配列決定により容易に決定することができる。予測されるアミノ酸配列は、日常的技術を用いてヌクレオチド配列から決定できる。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド、および本明細書中に記載されるコード核酸について、出願人は、その時点で利用できる配列情報を用いて同定することができる最良のリーディングフレームであると考えたものを同定した。

#### 【0379】

B. PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド変異体  
本明細書中に記載される全長の自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに加えて、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PR

10

20

30

40

50

O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、P R O 1 1 2 5、P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、P R O 1 3 7 9、P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、P R O 1 4 7 4、P R O 1 5 5 0、P R O 1 5 7 1、P R O 1 5 7 2、P R O 1 7 5 9、P R O 1 9 0 4、P R O 3 5 1 9 3、P R O 4 3 4 1、P R O 4 3 4 8、P R O 4 3 6 9、P R O 4 3 8 1、P R O 4 4 0 7、P R O 4 4 2 5、P R O 4 9 8 5、P R O 4 9 8 9、P R O 5 7 3 7、P R O 5 8 0 0、P R O 5 9 9 3、P R O 6 0 1 7、P R O 7 1 7 4、P R O 9 7 4 4、P R O 9 8 2 1、P R O 9 8 5 2、P R O 9 8 7 3、P R O 1 0 1 9 6、P R O 3 4 7 7 8、P R O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9 0、P R O 3 8 4 6 5、P R O 3 8 6 8 3、もしくはP R O 8 5 1 6 1 変異体を調製することができることが想定される。P R O 2 2 6、P R O 2 5 7、P R O 2 6 8、P R O 2 9 0、P R O 3 6 0 0 6、P R O 3 6 3、P R O 3 6 5、P R O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、P R O 1 1 2 5、P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、P R O 1 3 7 9、P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、P R O 1 4 7 4、P R O 1 5 5 0、P R O 1 5 7 1、P R O 1 5 7 2、P R O 1 7 5 9、P R O 1 9 0 4、P R O 3 5 1 9 3、P R O 4 3 4 1、P R O 4 3 4 8、P R O 4 3 6 9、P R O 4 3 8 1、P R O 4 4 0 7、P R O 4 4 2 5、P R O 4 9 8 5、P R O 4 9 8 9、P R O 5 7 3 7、P R O 5 8 0 0、P R O 5 9 9 3、P R O 6 0 1 7、P R O 7 1 7 4、P R O 9 7 4 4、P R O 9 8 2 1、P R O 9 8 5 2、P R O 9 8 7 3、P R O 1 0 1 9 6、P R O 3 4 7 7 8、P R O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9 0、P R O 3 8 4 6 5、P R O 3 8 6 8 3、もしくはP R O 8 5 1 6 1 変異体は、適切なヌクレオチドの変化を、P R O 2 2 6、P R O 2 5 7、P R O 2 6 8、P R O 2 9 0、P R O 3 6 0 0 6、P R O 3 6 3、P R O 3 6 5、P R O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、P R O 1 1 2 5、P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、P R O 1 3 7 9、P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、P R O 1 4 7 4、P R O 1 5 5 0、P R O 1 5 7 1、P R O 1 5 7 2、P R O 1 7 5 9、P R O 1 9 0 4、P R O 3 5 1 9 3、P R O 4 3 4 1、P R O 4 3 4 8、P R O 4 3 6 9、P R O 4 3 8 1、P R O 4 4 0 7、P R O 4 4 2 5、P R O 4 9 8 5、P R O 4 9 8 9、P R O 5 7 3 7、P R O 5 8 0 0、P R O 5 9 9 3、P R O 6 0 1 7、P R O 7 1 7 4、P R O 9 7 4 4、P R O 9 8 2 1、P R O 9 8 5 2、P R O 9 8 7 3、P R O 1 0 1 9 6、P R O 3 4 7 7 8、P R O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9 0、P R O 3 8 4 6 5、P R O 3 8 6 8 3、もしくはP R O 8 5 1 6 1 DNAの中に導入することによって、そして/あるいは、所望されるP R O 2 2 6、P R O 2 5 7、P R O 2 6 8、P R O 2 9 0、P R O 3 6 0 0 6、P R O 3 6 3、P R O 3 6 5、P R O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、P R O 1 1 2 5、P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、P R O 1 3 7 9、P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、P R O 1 4 7 4、P R O 1 5 5 0、P R O 1 5 7 1、P R O 1 5 7 2、P R O 1 7 5 9、P R O 1 9 0 4、P R O 3 5 1 9 3、P R O 4 3 4 1、P R O 4 3 4 8、P R O 4 3 6 9、P R O 4 3 8 1、P R O 4 4 0 7、P R O 4 4 2 5、P R O 4 9 8 5、P R O 4 9 8 9、P R O 5 7 3 7、P R O 5 8 0 0、P R O 5 9 9 3、P R O 6 0 1 7、P R O 7 1 7 4、P R O 9 7 4 4、P R O 9 8 2 1、P R O 9 8 5 2、P R O 9 8 7 3、P R O 1 0 1 9 6、P R O 3 4 7 7 8、P R O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9 0、P R O 3 8 4 6 5、P R O 3 8 6 8 3、もしくはP R O 8 5 1 6 1 ポリペプチドの合成によって調製することができる。アミノ酸の変化によって、P R O 2 2 6、P R O 2 5 7、P R O 2 6 8、P R O 2 9 0、P R O 3 6 0 0 6、P R O 3 6 3、P R O 3 6 5、P R O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、P R O 1 1 2 5、P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、P R O 1 3 7 9、P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、P R O 1 4 7 4、P R O 1 5 5 0、P R O 1 5 7 1、P R O 1 5 7 2、P R O 1 7 5 9、P R O 1 9 0 4、P R O 3 5 1 9 3、P R O 4 3 4 1、P R O 4 3 4

8、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの翻訳後プロセスを変化させる（例えば、グリコシル化部位の数もしくはその位置を変化させる、または膜結合特性を変更する）ことができることは、当業者には明らかであろう。

#### 【0380】

自然界に存在している全長の配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドにおける、あるいは、本明細書中に記載されるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの様々なドメインにおけるバリエーションは、例えば、米国特許第5,364,934号に示されている保存的変異および非保存的変異についての技術およびガイドラインのうちの任意のものを使用して、作成することができる。バリエーションは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする1つ以上のコドンの置換、欠失、あるいは、挿入であり得、これによって、自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380



、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550  
、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO3519  
3、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO440  
7、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO580  
0、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO982  
1、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO2  
0233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683  
、もしくはPRO85161ポリペプチドと比較して、PRO226、PRO257、P  
RO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO3  
82、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134 10  
、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380  
、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550  
、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO3519  
3、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO440  
7、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO580  
0、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO982  
1、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO2  
0233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683  
、もしくはPRO85161ポリペプチドのアミノ酸配列の中に変化が生じる。任意選択  
で、バリエーションは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、P 20  
RO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO7  
05、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO12  
81、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO14  
19、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO15  
72、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4  
348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4  
985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6  
017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9  
873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、  
PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリ 30  
ペプチドの1つ以上のドメインの中の任意の他のアミノ酸での、少なくとも1つのアミ  
ノ酸の置換による。どのアミノ酸残基を、所望される活性に有害な影響を及ぼすことなく  
挿入する、置換する、または欠失させることができるかを決定する指針は、PRO226  
、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PR  
O365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO112  
5、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO137  
9、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO147  
4、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO190  
4、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO43 40  
81、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO57  
37、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO97  
44、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO3  
4778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465  
、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの配列を、相同である公知  
のタンパク質分子の配列と比較すること、そして相同性の高い領域の中に作成されたアミ  
ノ酸配列の変化の数を最少にすることによって見出すことができる。アミノ酸置換は、1  
つのアミノ酸を同様の構造的および/または化学的特性を有する別のアミノ酸と置き換え  
ること、例えば、ロイシンをセリンで置き換えること、すなわち保存的なアミノ酸の置き  
換えの結果であり得る。挿入および欠失は、必要に応じて約1～5個のアミノ酸の範囲で  
あってよい。許容される変異は、配列におけるアミノ酸の挿入、欠失または置換を系統的 50

に行うことおよび得られた改変体を完全長または成熟ネイティブ配列により示される活性について試験することにより決定され得る。

【0381】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド断片が、本明細書中で提供される。そのようなフラグメントは、例えば、完全長のネイティブのタンパク質と比較した場合にN末端またはC末端で切断されているか、または、内部残基を欠いている場合がある。特定の断片には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの所望される生物学的活性については不可欠ではないアミノ酸残基は含まれない。

10

20

30

【0382】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161断片は、多数の従来技術のうちの任意のものによって調製することができる。所望のペプチドフラグメントは、化学的に合成され得る。別のアプローチには、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO

40

50

5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161断片を、酵素消化によって、例えば、タンパク質を、特定のアミノ酸残基によって定義される部位でタンパク質を切断することが公知の酵素でタンパク質を処理することによって、または、適切な制限酵素でDNAを消化し、そして所望される断片を単離することによって、作成することが含まれる。さらに別の適当な手法では、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により所望のポリペプチドフラグメントをコードするDNAフラグメントを単離して増幅する。そのDNAフラグメントの所望の末端を定義するオリゴヌクレオチドをPCRにおける5'および3'のプライマーとして使用する。好ましくは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド断片は、本明細書中に開示される自然界に存在しているPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドと、少なくとも1つの生物学的活性および/または免疫学的活性を共有する。

10

20

30

**【0383】**

目的の保存的置換は、好ましい置換という見出しの下に表6に示す通りである。このような置換が、生物学的活性の変化をもたらす場合、より実質的な変化、表6において例示される置換と称される置換、またはアミノ酸クラスを参照して後でさらに説明するものが好ましく導入され、その生成物がスクリーニングされる。

**【0384】**

40

【化 2 0】

表6

もとの残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン ; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの機能または免疫学的実体の実質的な修飾は、(a)置換の領域のポリペプチド骨格の構造(例えば、シート構造またはヘリックス構造)、(b)標的部位での分子の電荷または疎水性、あるいは(c)側鎖の大きさを維持することに対するそれらの効果が有意に異なる置換を選択することによって行われる。天然に存在する残基は、共通の側鎖の特性に基づいて群分けされ：

アミノ酸は、その側鎖の特性における類似性(A. L. Lehninger, Biochemistry, Second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975))に従って：

(1) 非極性：Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M)

(2) 無電荷極性：Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)

(3) 酸性：Asp (D)、Glu (E)

(4) 塩基性：Lys (K)、Arg (R)、His (H)

に群分けされ得る。

あるいは、天然に存在する残基は、共通の側鎖の特性に基づいて：

(1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3) 酸性：Asp、Glu；

(4) 塩基性：His、Lys、Arg；

(5) 鎖の方向に影響する残基：Gly、Pro；

(6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe

に群分けされ得る。

#### 【0385】

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスと交換することを含む。そのような置換された残基はまた、保存的置換部位内に、またはより好ましくは残りの(非保存的な)部位に導入され得る。

#### 【0386】

変異は、オリゴヌクレオチド媒介性(部位指向性)突然変異誘発、アラニンスキャニングおよびPCR突然変異誘発などの当該分野で公知の方法を用いて生成することができる。部位指向性突然変異誘発[Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331(1986); Zoller et al., Nucl. Acid Res., 10:6487(1987)]、カセット突然変異誘発[Wells et al., Gene, 34:315(1985)]、制限選択突然変異誘発[Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317:415(1986)]または他の公知の手法をクローニングされたDNAに対して実施することによりPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161変異体DNAを生成することができる。改変体DNAを生成することができる。

#### 【0387】

スキャニングアミノ酸分析もまた、隣接する配列に沿って1つ以上のアミノ酸を同定するために使用できる。好ましいスキャニングアミノ酸には比較的小型の中性のアミノ酸が含まれる。このようなアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリンおよびシステインが挙げられる。アラニンは、代表的には、それがベータ炭素を超えた側鎖を排除し、改変体の主鎖のコンホメーションを変更する可能性が低いため、この群の中では好ましいスキャニングアミノ酸である[Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085(1989)]。アラニンはまた、代表的には、それが最も一般的なアミノ酸であるため好ましい。さらに、アラニンは、頻繁に埋没した位置および曝露される位置の両方において存在する[Creighton, The Prote

10

20

30

40

50

ins, (W. H. Freeman & Co., N. Y.) ; Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976) ]。アラニン置換が十分な量の改変体をもたらさない場合は、同配体 (isoteric) アミノ酸を使用できる。

【0388】

C. PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの修飾  
PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの共有結合による修飾が、本発明の範囲に含まれる。共有結合による修飾の1つのタイプには、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの標的化されたアミノ酸残基を、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの選択された側鎖あるいはN末端またはC末端残基と反応することができる有機誘導体

10

20

30

40

50

化剤と反応させる工程が含まれる。二官能性物質での誘導は、例えば、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体を精製するための方法に使用される水不溶性支持マトリックスまたは表面への、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの架橋のため、ならびにその逆に、有用である。一般に使用される架橋結合剤としては、例えば、1,1-ビス(ジアゾセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば、4-アジドサリチル酸とのエステル、ホモ2官能性イミドエステル(3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)などのジスクシンイミジルエステルを含む)、2官能性マレイミド(例えば、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタンおよびメチル-3-[ (p-アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミデート)などの薬剤が挙げられる。

#### 【0389】

他の改変としては、グルタミル残基およびアスパルギニル残基からそれぞれ対応するグルタミル残基およびアスパルチル残基への脱アミド化、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリル残基またはスレオニル残基のヒドロキシル基のホスホリル化、リシン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化 [T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化ならびに任意のC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

#### 【0390】

本発明の範囲に含まれるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO

6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの別のタイプの共有結合による修飾には、ポリペプチドの自然界でのグリコシル化パターンを変更することが含まれる。「自然界でのグリコシル化パターンを変更すること」は、本明細書中での目的については、自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの中に見られる1つ以上の炭水化物部分を欠失させること（根底にあるグリコシル化部位を除去することによるか、または、化学的および/もしくは酵素的手段によりグリコシル化を欠失させることのいずれかによる）、ならびに/あるいは、自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの中には存在しない1つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味する。さらに、この語句は、存在する様々な炭水化物部分の性質および比率の変化を含む、ネイティブタンパク質のグリコシル化の定性的変化を含む。

【0391】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対するグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を変更することによって行われる場合がある。変更は、例えば、自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1



155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161に対する、1つ以上のセリンまたはスレオニン残基の付加、あるいはそれらによる置換によって作成される場合がある（O-結合グリコシル化部位について）。  
PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161アミノ酸配列は、任意選択で、DNAレベルでの変化によって、特に、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするDNAを、所望されるアミノ酸に翻訳されるであろうコドンを生じるように予め選択された塩基で変異させることによって、変化させられる場合がある。

10

20

30

**【0392】**

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、ポリペプチドへのグリコシドの化学的または酵素的カップリングによる。そのような方法は、当該分野において、例えば、1987年9月11日公開のWO87/05330およびApplin and Wriston, CRC

40

50

Crit. Rev. Biochem., pp. 259 - 306 (1981) に記載されている。

【0393】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド上に存在している炭水化物部分の除去は、グリコシル化の標的とされるアミノ酸残基をコードしているコドンの、化学的、または酵素的、または突然変異による置換によって行われる場合がある。化学的脱グリコシル化手法は、当該分野で公知であり、そして例えば、Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987) および Edge et al., Anal. Biochem., 118: 131 (1981) に記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura et al., Meth. Enzymol. 138: 350 (1987) に記載されている種々のエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼの使用によって達成され得る。

10

20

【0394】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの別のタイプの共有結合による修飾には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを、様々な非タンパク質性のポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレン）のうちの1つに対して、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号または同第4,1

30

40

50

79, 337号に示されている様式で連結させることが含まれる。

【0395】

本発明のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドはまた、別の、異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に対して融合させられたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドが含まれているキメラ分子を形成させるような方法で修飾される場合もある。

10

20

【0396】

そのようなキメラ分子には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの、それに対して抗tag抗体を選択的に結合させることができるエピトープを提供するタグポリペプチドとの融合体が含まれる。エピトープタグは、一般的には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、

30

40

50

PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に配置される。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのそのようなエピトープタグ化形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を使用して検出することができる。また、エピトープタグが提供されることにより、抗タグ抗体またはエピトープタグに結合する別のタイプの親和性マトリックスを使用する親和性による精製によって、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを容易に精製することが可能となる。様々なタグポリペプチドおよびその対応する抗体が当該分野で周知である。例としては、ポリヒスチジン（ポリ-his）またはポリヒスチジン-グリシン（ポリ-his-gly）タグ；インフルエンザHAタグポリペプチドおよびその抗体12CA5 [Field et al., Mol. Cell Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグおよびそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7および9E10抗体 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]；ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD) タグおよびその抗体 [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)] が挙げられる。他のタグポリペプチドとしては、Flag-ペプチド [Hopp et al., Biotechnology, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]；-チューブリンエピトープペプチド [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；およびT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)] が挙げられる。

#### 【0397】

キメラ分子には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572

、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの、免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定の領域との融合体が含まれ得る。キメラ分子の2価の形態（「イムノアドヘシン」とも称する）については、このような融合はIgG分子のFc領域に対するものであり得る。Ig融合体には、好ましくは、Ig分子の中の少なくとも1つの可変領域の代わりに、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの可溶性（膜貫通ドメインが欠失させられているか、または不活化させられている）形態の置換が含まれる。本発明の特に好ましい態様において、免疫グロブリン融合は、IgG1分子のヒンジ、CH2およびCH3；またはIgG1分子のヒンジ、CH1、CH2およびCH3領域を含む。免疫グロブリン融合の生成については、1995年6月27日発行の米国特許第5,428,130号も参照のこと。

10

20

**【0398】**

D、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの調製

以下の記載は、主に、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161核酸が含まれているベクターで形質転換またはトランスフェクトされた細胞を培養すること

30

40

50

による、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの生産に関する。もちろん、当該分野で周知の別の方法が、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを調製するために使用される場合があることも想定される。例えば、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161配列、あるいはその一部は、固相技術を使用して直接的なペプチド合成によって生産することができる[例えば、Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)を参照のこと]。インビトロのタンパク質合成を、手動の手法または自動により実施してよい。自動合成は、例えば、Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA)を用いて製造元の指示書により達成され得る。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO982

1、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの様々な部分を別々に化学合成し、そして化学的もしくは酵素的方法を使用して結合させて、全長のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを生産することができる。

10

【0399】

1. PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするDNAの単離

20

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするDNAは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161 mRNAを

30

40

50

有しており、そして検出可能なレベルでそれを発現すると考えられる組織から調製された cDNA ライブラリーから得ることができる。したがって、ヒト PRO226 -、PRO257 -、PRO268 -、PRO290 -、PRO36006 -、PRO363 -、PRO365 -、PRO382 -、PRO444 -、PRO705 -、PRO1071 -、PRO1125 -、PRO1134 -、PRO1155 -、PRO1281 -、PRO1343 -、PRO1379 -、PRO1380 -、PRO1387 -、PRO1419 -、PRO1433 -、PRO1474 -、PRO1550 -、PRO1571 -、PRO1572 -、PRO1759 -、PRO1904 -、PRO35193 -、PRO4341 -、PRO4348 -、PRO4369 -、PRO4381 -、PRO4407 -、PRO4425 -、PRO4985 -、PRO4989 -、PRO5737 -、PRO5800 -、PRO5993 -、PRO6017 -、PRO7174 -、PRO9744 -、PRO9821 -、PRO9852 -、PRO9873 -、PRO10196 -、PRO34778 -、PRO20233 -、PRO21956 -、PRO57290 -、PRO38465 -、PRO38683 -、もしくは PRO85161 - DNA は、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製された cDNA ライブラリーから簡単に得ることができる。PRO226 -、PRO257 -、PRO268 -、PRO290 -、PRO36006 -、PRO363 -、PRO365 -、PRO382 -、PRO444 -、PRO705 -、PRO1071 -、PRO1125 -、PRO1134 -、PRO1155 -、PRO1281 -、PRO1343 -、PRO1379 -、PRO1380 -、PRO1387 -、PRO1419 -、PRO1433 -、PRO1474 -、PRO1550 -、PRO1571 -、PRO1572 -、PRO1759 -、PRO1904 -、PRO35193 -、PRO4341 -、PRO4348 -、PRO4369 -、PRO4381 -、PRO4407 -、PRO4425 -、PRO4985 -、PRO4989 -、PRO5737 -、PRO5800 -、PRO5993 -、PRO6017 -、PRO7174 -、PRO9744 -、PRO9821 -、PRO9852 -、PRO9873 -、PRO10196 -、PRO34778 -、PRO20233 -、PRO21956 -、PRO57290 -、PRO38465 -、PRO38683 -、もしくは PRO85161 - をコードする遺伝子はまた、ゲノムライブラリーから、あるいは公知の合成手順によって得ることもできる（例えば、自動核酸合成）。

10

20

30

40

50

#### 【0400】

ライブラリーは、目的の遺伝子またはそれによってコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ（例えば、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくは PRO85161 ポリペプチドに対する抗体、あるいは少なくとも約 20 ~ 80 塩基のオリゴヌクレオチド）を用いてスクリーニングすることができる。選択されたプローブを用いた cDNA ライブラリーまたはゲノムライブラリーのスクリーニングは、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載されているような標準的な手順を用いて実施され得る。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO10



71、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161をコードする遺伝子を単離するための別の手段は、PCR方法を使用することである[Sambrook et al. , 前出; Dieffenbach et al. , PCR Primer : A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1995) ]。

10

20

30

40

50

#### 【0401】

後述する実施例は、cDNAライブラリーをスクリーニングするための手法を説明するものである。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、偽陽性を最小限とするために十分な長さのものであり、そして十分明白なものでなければならない。このオリゴヌクレオチドは、好ましくは、スクリーニングされるライブラリーのDNAへのハイブリダイゼーション時にそれが検出できるように標識される。標識方法は、当該分野で周知であり、それらとしては、<sup>32</sup>P標識ATPのような放射性標識、ビオチニル化または酵素標識の使用が挙げられる。中ストリンジェンシーおよび高ストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、Sambrook et al. , 前出に記載されている。

#### 【0402】

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列は、GenBankなどの公的データベースまたは他の私的配列データベースに寄託され入手可能である他の既知配列と比較し、アラインメントすることができる。分子の所定領域内または完全長配列に渡る配列同一性(アミノ酸またはヌクレオチドレベルのいずれかで)は、当該分野で公知の方法を用いて、そして、本明細書に記載するように決定することができる。

#### 【0403】

タンパク質コード配列を有する核酸は、本明細書において初めて開示された推定アミノ酸配列を用いて、そして、必要に応じて、前出のSambrook et al. に記載されている従来のプライマー伸長手順を用いて、選択されたcDNAまたはゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより前駆体を検出すること、および、cDNAに逆転写されていないmRNAの中間体をプロセッシングすることにより得られうる。

#### 【0404】

##### 2. 宿主細胞の選択および形質転換

宿主細胞は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの生産のための本明細書中に記載される発現ベクターまたはクローニングベクターでトランスフェクトされるかまたは形質転換され、そして、プロモーターを誘導する、形質転

換体を選択する、または所望される配列をコードしている遺伝子を増幅することに適するように修飾された通常の栄養培地の中で培養される。培地、温度、pHなどのような培養条件は、過度の実験を要することなく当業者が選択できる。一般に、細胞培養の産生性を最大にするための原理、プロトコルおよび実際の手法は、*Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) および *Sambrook et al.*, 前出に見ることができる。

#### 【0405】

真核生物細胞トランスフェクションおよび原核生物細胞トランスフェクションの方法は、当業者に公知であり、例えば、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{CaPO}_4$ 、リボソーム媒介およびエレクトロポレーションである。使用する宿主細胞に応じて、形質転換は、その細胞に適切な標準的手法を用いて実施する。前出の *Sambrook et al.*, に記載されているように塩化カルシウムを使用するカルシウム処理またはエレクトロポレーションが原核生物に対して一般に使用される。*Shaw et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) および 1989年6月29日公開のWO89/05859に記載されているように、特定の植物細胞の形質転換には、*Agrobacterium tumefaciens* による感染が使用される。細胞壁を有しない哺乳動物細胞に対しては、*Graham and van der Eb*, *Virology*, 52:456-457 (1978) のリン酸カルシウム沈降法を使用できる。哺乳動物細胞宿主系トランスフェクションの一般的態様は、米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母への形質転換は、代表的には、*Van Solingen et al.*, *J. Bact.* 130:946 (1977) および *Hsiao et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979) の方法に従って実施される。しかしながら、細胞にDNAを導入するための別の方法（例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、インタクトな細胞との細菌プロトプラスト融合またはポリカチオン、例えば、ポリブレン、ポリオルニチン）も使用され得る。哺乳動物細胞を形質転換するための様々な手法については、*Keown et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) および *Mansour et al.*, *Nature*, 336:348-352 (1988) を参照のこと。

#### 【0406】

本明細書におけるベクター内のDNAをクローニングまたは発現するために適当な宿主細胞としては、原核生物、酵母または高等真核生物の細胞が挙げられる。適当な原核生物としては、真正細菌（例えば、グラム陰性またはグラム陽性の生物体、例えば、*E. coli* などの *Enterobacteriaceae* 科）が挙げられるがこれらに限定されない。様々な *E. coli* 株（例えば、*E. coli* K12株MM294 (ATCC31,446); *E. coli* X1776 (ATCC31,537); *E. coli* 株W3110 (ATCC27,325) および K5 772 (ATCC53,635)) が公的に入手できる。他の適当な原核生物宿主細胞としては、*Enterobacteriaceae* 科（例えば、*E. coli* などの *Escherichia* 属、*Enterobacter* 属、*Erwinia* 属、*Klebsiella* 属、*Proteus* 属、*Salmonella* 属（例えば、*Salmonella typhimurium*）、*Serratia* 属（例えば、*Serratia marcescans*）および *Shigella* 属ならびに *Bacilli* 属（例えば、*B. subtilis* および *B. licheniformis*（例えば、1989年4月12日公開のDD266,710に開示されている *B. licheniformis* 41P)）、*P. aeruginosa* などの *Pseudomonas* 属および *Streptomyces* 属が挙げられる。これらの例は、説明であって限定するものではない。株W3110は、組換えDNA産物の発酵のための一般的な宿主菌株であるため、1つの特に好ましい宿主または親宿主である。好ましくは、宿主細胞は、最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、菌株W3110は、宿主に内在性であるタンパク質をコードする遺伝子における遺伝的変異に影響を及ぼすように

10 改変してよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型 *tonA* を有する *E. coli* W3110 株 1A2；完全な遺伝子型 *tonA ptr3* を有する *E. coli* W3110 株 9E4；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169degP ompT kan<sup>r</sup>* を有する *E. coli* W3110 株 27C7 (ATCC55, 244)；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169degP ompT rbs7 ilvG kan<sup>r</sup>* を有する *E. coli* W3110 株 37D6；非カナマイシン耐性 *degP* 欠失変異を有する株 37D6 である *E. coli* W3110 菌株 40B4；および、1990 年 8 月 7 日に発行された米国特許第 4, 946, 783 号に開示されている変異体の細胞周辺腔プロテアーゼを有する *E. coli* 株が挙げられる。あるいは、インビトロにおけるクローニング方法、例えば、PCR または他の核酸ポリメラーゼ反応が適当である。

#### 【0407】

原核生物に加えて、真核微生物（例えば、糸状菌または酵母）も、PRO226-、PRO257-、PRO268-、PRO290-、PRO36006-、PRO363-、PRO365-、PRO382-、PRO444-、PRO705-、PRO1071-、PRO1125-、PRO1134-、PRO1155-、PRO1281-、PRO1343-、PRO1379-、PRO1380-、PRO1387-、PRO1419-、PRO1433-、PRO1474-、PRO1550-、PRO1571-、PRO1572-、PRO1759-、PRO1904-、PRO35193-、PRO4341-、PRO4348-、PRO4369-、PRO4381-、PRO4407-、PRO4425-、PRO4985-、PRO4989-、PRO5737-、PRO5800-、PRO5993-、PRO6017-、PRO7174-、PRO9744-、PRO9821-、PRO9852-、PRO9873-、PRO10196-、PRO34778-、PRO20233-、PRO21956-、PRO57290-、PRO38465-、PRO38683-、もしくは PRO85161- をコードするベクターについての適切なクローニングまたは発現宿主である。*Saccharomyces cerevisiae* は、一般に使用されている下等真核生物の宿主微生物である。他のものとしては、*Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]；1985 年 5 月 2 日公開の EP139, 383)；*Kluyveromyces* 属宿主（米国特許第 4, 943, 529 号；Fleer et al., Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)）（例えば、*K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574；Louvencourt et al., J. Bacteriol., 154 (2): 737-742 [1983])、*K. fragilis* (ATCC12, 424)、*K. bulgaricus* (ATCC16, 045)、*K. wickerhamii* (ATCC24, 178)、*K. waltii* (ATCC56, 500)、*K. dr osophilum* (ATCC36, 906；Van den Berg et al., Bio/Technology, 8: 135 (1990))、*K. thermotolerans* および *K. marxianus*)；*Yarrowia* 属 (EP402, 226)；*Pichia pastoris* (EP183, 070；Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28: 265-278 [1988])；*Candida* 属；*Trichoderma reesia* (EP244, 234)；*Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979])；*Schwanniomyces* 属（例えば、*Schwanniomyces occidentalis* (1990 年 10 月 31 日公開の EP394, 538)）；および糸状菌（例えば、*Neurospora* 属、*Penicillium* 属、*Tolypocladium* 属 (1991 年 1 月 10 日公開の WO91/00357) および *Aspergillus* 属宿主（例えば、*A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]

] ; Tilburn et al. , Gene , 26 : 205 - 221 [ 1983 ] ; Yelton et al. , Proc . Natl . Acad . Sci . USA , 81 : 1470 - 1474 [ 1984 ] ) および A . niger ( Kelly and Hynes , EMBO J . , 4 : 475 - 479 [ 1985 ] ) ) が挙げられる。メチロトロピック (Methylotropic) 酵母が、本発明において適しており、そしてそれらとしては、Hansenula 属、Candida 属、Kloeckera 属、Pichia 属、Saccharomyces 属、Torulopsis 属および Rhodotulula 属からなる属から選択される、メタノールで生育できる酵母が挙げられるがこれらに限定されない。このクラスの酵母の例となる特定の種のリストは、C . Anthony , The Biochemistry of Methylotrophs , 269 ( 1982 ) に見ることができる。

10

#### 【0408】

グリコシル化された PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくは PRO85161 ポリペプチドの発現に適している宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物の細胞の例としては、昆虫細胞 (例えば、Drosophila S2 および Spodoptera Sf9) ならびに植物細胞が挙げられる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例としては、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞および COS 細胞が挙げられる。より特定の例としては、SV40 で形質転換したサル腎臓 CV1 株 (COS-7、ATCC CRL 1651) ; ヒト胚性腎株 (293 細胞または懸濁培地中の生育のためにサブクローニングされた 293 細胞、Graham et al. , J . Gen . Virol . , 36 : 59 ( 1977 ) ) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO、Urlaub and Chasin , Proc . Natl . Acad . Sci . USA , 77 : 4216 ( 1980 ) ) ; マウスセルトリー細胞 (TM4、Mather , Biol . Reprod . , 23 : 243 - 251 ( 1980 ) ) ; ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL 75) ; ヒト肝細胞 (Hep G2 , HB8065) ; およびマウス乳癌 (MMT060562、ATCC CCL 51) が挙げられる。適切な宿主細胞の選択は、当業者の知る通りである。

20

30

#### 【0409】

##### 3 . 複製可能なベクターの選択および使用

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくは PRO85161 ポリペプチドをコードす

40

50

る核酸（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）は、クローニング（DNAの増幅）のため、または発現のための複製可能なベクターに挿入される場合がある。様々なベクターが公的に入手可能である。そのベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子またはファージの形態であり得る。適切な核酸配列が、種々の手順によりベクター内に挿入され得る。一般に、DNAは、当該分野で公知の手法を用いて適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター構成要素としては、一般に、シグナル配列の1つ以上、複製起点、マーカー遺伝子の1つ以上、エンハンサーエレメント、プロモーターおよび転写終止配列が挙げられるがこれらに限定されない。これらの構成要素の1つ以上を含む適当なベクターの構築は、当業者に公知の標準的なライゲーション手法を用いる。

#### 【0410】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドは、組み換えによって直接生産することができるだけでなく、また、シグナル配列であり得る異種ポリペプチド、または、成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有している他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても生産することができる。一般的には、シグナル配列はベクターの成分であり得るか、あるいは、ベクターの中に挿入されるPRO226-、PRO257-、PRO268-、PRO290-、PRO36006-、PRO363-、PRO365-、PRO382-、PRO444-、PRO705-、PRO1071-、PRO1125-、PRO1134-、PRO1155-、PRO1281-、PRO1343-、PRO1379-、PRO1380-、PRO1387-、PRO1419-、PRO1433-、PRO1474-、PRO1550-、PRO1571-、PRO1572-、PRO1759-、PRO1904-、PRO35193-、PRO4341-、PRO4348-、PRO4369-、PRO4381-、PRO4407-、PRO4425-、PRO4985-、PRO4989-、PRO5737-、PRO5800-、PRO5993-、PRO6017-、PRO7174-、PRO9744-、PRO9821-、PRO9852-、PRO9873-、PRO10196-、PRO34778-、PRO20233-、PRO21956-、PRO57290-、PRO38465-、PRO38683-、もしくはPRO85161-をコードするDNAの一部であり得る。シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppまたは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物のシグナル配列であり得る。酵母の分泌のためには、シグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（*Saccharomyces* および *Kluyveromyces* の - 因子リーダーを包み、後者は、米国特許第5,010,182号に記載）または酸ホスファターゼリーダー、*Calbicans* グルコアミラーゼリーダー（1990年4月4日公開のEP362,179）または1990年11月15日公開のWO90/13646に記載のシグナルであり得る。哺乳動物細胞発現においては、同じに関連する種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列などの哺乳動物シグナル配列を用いてタンパク質の分泌を誘導し得、ウイルスの分泌リーダーも使用され得る。

#### 【0411】

発現およびクローニングベクターは、両方とも1つ以上の選択された宿主細胞において

10

20

30

40

50

ベクターを複製可能とする核酸配列を含む。そのような配列は、種々の細菌、酵母およびウイルスに関して周知である。プラスミド p B R 3 2 2 由来の複製起点が、大部分のグラム陰性細菌に適しており、2  $\mu$  プラスミド起点は、酵母に適しており、そして様々なウイルス起点 ( S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V または B P V ) は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターのために有用である。

#### 【0412】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、選択可能なマーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含む。代表的な選択遺伝子は、( a ) 抗生物質または他のトキシン、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサートまたはテトラサイクリンに対する耐性を付与するタンパク質、( b ) 栄養要求性の欠損を補うタンパク質、または ( c ) 複合培地から利用できない重要な栄養を供給するタンパク質をコードしており、例えば、B a c i l l i のための D - アラニンラセマーゼをコードする遺伝子である。

10

#### 【0413】

哺乳動物細胞についての適切な選択マーカーの一例は、P R O 2 2 6 -、P R O 2 5 7 -、P R O 2 6 8 -、P R O 2 9 0 -、P R O 3 6 0 0 6 -、P R O 3 6 3 -、P R O 3 6 5 -、P R O 3 8 2 -、P R O 4 4 4 -、P R O 7 0 5 -、P R O 1 0 7 1 -、P R O 1 1 2 5 -、P R O 1 1 3 4 -、P R O 1 1 5 5 -、P R O 1 2 8 1 -、P R O 1 3 4 3 -、P R O 1 3 7 9 -、P R O 1 3 8 0 -、P R O 1 3 8 7 -、P R O 1 4 1 9 -、P R O 1 4 3 3 -、P R O 1 4 7 4 -、P R O 1 5 5 0 -、P R O 1 5 7 1 -、P R O 1 5 7 2 -、P R O 1 7 5 9 -、P R O 1 9 0 4 -、P R O 3 5 1 9 3 -、P R O 4 3 4 1 -、P R O 4 3 4 8 -、P R O 4 3 6 9 -、P R O 4 3 8 1 -、P R O 4 4 0 7 -、P R O 4 4 2 5 -、P R O 4 9 8 5 -、P R O 4 9 8 9 -、P R O 5 7 3 7 -、P R O 5 8 0 0 -、P R O 5 9 9 3 -、P R O 6 0 1 7 -、P R O 7 1 7 4 -、P R O 9 7 4 4 -、P R O 9 8 2 1 -、P R O 9 8 5 2 -、P R O 9 8 7 3 -、P R O 1 0 1 9 6 -、P R O 3 4 7 7 8 -、P R O 2 0 2 3 3 -、P R O 2 1 9 5 6 -、P R O 5 7 2 9 0 -、P R O 3 8 4 6 5 -、P R O 3 8 6 8 3 -、もしくは P R O 8 5 1 6 1 - をコードする核酸を取り込むための細胞成分の同定が可能なマーカーであり、例えば、D H F R またはチミジンキナーゼである。野生型 D H F R を使用する場合の適切な宿主細胞は、U r l a u b e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 7 7 : 4 2 1 6 ( 1 9 8 0 ) に記載されているように調製および増殖させた D H F R 活性欠損の C H O 細胞である。酵母において使用に適した選択遺伝子は、酵母プラスミド Y R p 7 中に存在する t r p 1 遺伝子である [ S t i n c h c o m b e t a l . , N a t u r e , 2 8 2 : 3 9 ( 1 9 7 9 ) ; K i n g s m a n e t a l . , G e n e , 7 : 1 4 1 ( 1 9 7 9 ) ; T s c h e m p e r e t a l . , G e n e , 1 0 : 1 5 7 ( 1 9 8 0 ) ]。t r p 1 遺伝子は、トリプトファン中で生育する能力を欠いた酵母の変異株、例えば、A T C C 番号 4 4 0 7 6 または P E P 4 - 1 のための選択マーカーを提供する [ J o n e s , G e n e t i c s , 8 5 : 1 2 ( 1 9 7 7 ) ]。

20

30

#### 【0414】

発現およびクローニングベクターには、通常、m R N A の合成を指示するための、P R O 2 2 6 -、P R O 2 5 7 -、P R O 2 6 8 -、P R O 2 9 0 -、P R O 3 6 0 0 6 -、P R O 3 6 3 -、P R O 3 6 5 -、P R O 3 8 2 -、P R O 4 4 4 -、P R O 7 0 5 -、P R O 1 0 7 1 -、P R O 1 1 2 5 -、P R O 1 1 3 4 -、P R O 1 1 5 5 -、P R O 1 2 8 1 -、P R O 1 3 4 3 -、P R O 1 3 7 9 -、P R O 1 3 8 0 -、P R O 1 3 8 7 -、P R O 1 4 1 9 -、P R O 1 4 3 3 -、P R O 1 4 7 4 -、P R O 1 5 5 0 -、P R O 1 5 7 1 -、P R O 1 5 7 2 -、P R O 1 7 5 9 -、P R O 1 9 0 4 -、P R O 3 5 1 9 3 -、P R O 4 3 4 1 -、P R O 4 3 4 8 -、P R O 4 3 6 9 -、P R O 4 3 8 1 -、P R O 4 4 0 7 -、P R O 4 4 2 5 -、P R O 4 9 8 5 -、P R O 4 9 8 9 -、P R O 5 7 3 7 -、P R O 5 8 0 0 -、P R O 5 9 9 3 -、P R O 6 0 1 7 -、P R O 7 1 7 4 -、P R O 9 7 4 4 -、P R O 9 8 2 1 -、P R O 9 8 5 2 -、P R O 9 8 7 3 -、P R O 1 0 1 9 6 -、P R O 3 4 7 7 8 -、P R O 2 0 2 3 3 -、P R O 2 1 9 5 6 -、P R O 5

40

50

7290 -、PRO38465 -、PRO38683 -、もしくはPRO85161 - をコードする核酸配列に対して動作可能であるように連結されたプロモーターが含まれる。種々の潜在的宿主細胞により認識されるプロモーターは、周知である。原核生物の宿主と共に使用するのに適したプロモーターとしては、 $\beta$ -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系 [Chang et al., Nature, 275: 615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281: 544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980); EP36, 776] およびハイブリッドプロモーター (例えば、tac プロモーター [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983)] ) が挙げられる。細菌システムにおいて使用されるプロモーターには、また、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161 ポリペプチドをコードするDNAに対して動作可能であるように連結されたシャインダルガノ (Shine-Dalgarno (S.D.)) 配列も含まれるであろう。

#### 【0415】

酵母である宿主とともに使用される適切なプロモーター配列の例としては、3 - ホスホグリセレートキナーゼ [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980)] または他のタンパク質分解酵素 [Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900 (1978)]、例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ビルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ、3 - ホスホグリセレートムターゼ、ビルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼのプロモーターが挙げられる。

#### 【0416】

生育条件により制御される転写のさらなる利点を有する誘導プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素およびマルトースおよびガラクトースの利用を担う酵素のためのプロモーター領域である。酵母発現において使用するために適したベクターおよびプロモーターは、EP73, 657においてさらに記載されている。

#### 【0417】

哺乳動物宿主細胞の中のベクターからのPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5

10

20

30

40

50

993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161の転写は、例えば、ウイルス（例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス（1989年7月5日に公開されたUK2, 211, 504）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス2）、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、およびシミアンウイルス40（SV40））のゲノムから得られたプロモーターによって、異種哺乳動物のプロモーター（例えば、アクチンプロモーター、または免疫グロブリンプロモーター）から得られたプロモーターによって、あるいは、熱ショックプロモーターから得られたプロモーターによって、そのようなプロモーターが宿主細胞システムと適合性であるとの条件で制御される。

10

#### 【0418】

高等真核生物によるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクターの中にエンハンサー配列を挿入することによって増大させることができる。エンハンサーは、通常、転写を増大させるプロモーターに対して作用する約10～300bpのDNAのシス作用性エレメントである。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、  
- フェトプロテインおよびインスリン）。しかしながら代表的には、真核生物細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用する。例としては、複製起点の後側上のSV40エンハンサー（bp100-270）、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後側上のポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。エンハンサーは、ベクターの中では、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161をコードする配列に対して5'位置または3'位置でスプライシングされ得るが、プロモーターの5'位置にあることが好ましい。

20

30

40

#### 【0419】

真核生物宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒトまたは他の多細胞生物体由来の有核細胞）中で使用される発現ベクターはまた、転写の終止のため、およびmRNAの安定化のために必要な配列を含む。そのような配列は、真核生物またはウイルスのDNAまたはcDNAの5'側、場合によっては3'側の非翻訳領域から一般に得られる。これ

50



らの領域には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするmRNAの非翻訳部分の中に、ポリアデニル化された断片として転写されるヌクレオチドセグメントが含まれる。

10

#### 【0420】

組み換え体である脊椎動物細胞培養物中でのPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの合成に適応させるために適しているさらに他の方法、ベクター、および宿主細胞は、Gething et al., Nature, 293: 620-625 (1981); Mantel et al., Nature, 281: 40-46 (1979); EP 117,060; およびEP 117,058に記載されている。

20

30

#### 【0421】

##### 4. 遺伝子の増幅 / 発現の検出

遺伝子の増幅および / または発現は、例えば、mRNAの転写を定量するための従来のサザンブロッティング、ノーザンブロッティング [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)]、ドットブロッティング (DNA分析) またはin situハイブリダイゼーションにより、適切に標識されたプローブを用い、本明細書において提供される配列に基づいて、直接試料中で測定してよい。あるいは、DNA二重鎖、RNA二重鎖およびDNA-RNAハイブリッド二重鎖またはDNA-タンパク質二重鎖を含む特定の二重鎖を認識できる抗体を使用してよい。そしてその抗体が標識され得、表面上の二重鎖の形成により二重鎖に結合した抗体の存在が検出できるように二重鎖が表面に結合した状態でアッセイが実施され得る。

40

#### 【0422】

あるいは、遺伝子発現が、細胞または組織の切片の免疫組織化学的染色などの免疫学的方法および細胞培養物または体液のアッセイにより測定されることにより、遺伝子産物の発現が直接定量され得る。免疫組織化学的染色および / またはサンプル液体のアッセイに有用な抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかであり得、そして任意の哺乳動物において調製され得る。好都合であるには、抗体は、自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO

50

1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対して、あるいは、本明細書中で提供されるDNA配列に基づく合成ペプチドに対して、あるいは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161 DNAに対して融合させられた、特異的な抗体エピトープをコードする外来配列に対して調製され得る。

10

20

#### 【0423】

##### 5. ポリペプチドの精製

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの複数の形態を、培養培地から、または宿主細胞溶解物から回収することができる。膜結合の場合は、適当な界面活性溶液（例えば、Triton-X100）を用いるか、酵素的切断により、膜から遊離させることができる。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの発現に使用される細胞は、様々な物理的手段または化学的手段（例えば、凍結解凍サイクル、超音波処理、機械的な破壊、または細胞溶解剤）によって

30

40

50

破壊することができる。

【0424】

組み換え体細胞タンパク質またはポリペプチドからPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを精製することが所望される場合がある。以下の手順、すなわち、イオン交換カラムによる分画；エタノール沈降；逆相HPLC；シリカまたは陽イオン交換樹脂（例えば、DEAE）によるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈降法；例えば、Sephadex G-75を用いたゲル濾過；IgGなどの夾雑物を除去するためのプロテインAセファロースカラム；およびPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのエピトプタグ化型を結合させるための金属キレートカラムが適当な精製の手順の例である。タンパク質精製の様々な方法を使用してよく、そのような方法は、当該分野で公知であり、例えば、Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載されている。選択される精製抗体（単数または複数）は、例えば、使用される生産プロセスと、生産される特定のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの性質に応じて様々であろう。

【0425】

E. PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO10

10

20

30

40

50

71、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの使用  
PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（あるいはそれらの相補鎖）は、分子生物学の分野において様々な用途を有している。これには、染色体および遺伝子のマッピングにおけるハイブリダイゼーションプローブとしての使用、ならびにアンチセンスRNAおよびDNAの作成における使用が含まれる。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161核酸はまた、本明細書中に記載される組み換え技術による、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの調製にも有用であろう。

#### 【0426】

全長の自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155

10

20

30

40

50

、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387  
、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571  
、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO434  
1、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO442  
5、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO599  
3、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO985  
2、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO  
21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO  
85161 遺伝子、あるいはそれらの一部は、全長のPRO226、PRO257、PR  
O268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO38 10  
2、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、  
PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、  
PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、  
PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193  
、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407  
、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800  
、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821  
、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20  
233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、  
もしくはPRO85161 cDNAを単離するため、あるいは、さらに他のcDNA ( 20  
例えば、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006  
、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1  
071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1  
343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1  
433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1  
759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO  
4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO  
4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO  
7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO  
10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO5729 30  
0、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161 ポリペプチドの自  
然界に存在している変異体、または他の種に由来するPRO226、PRO257、PR  
O268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO38  
2、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、  
PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、  
PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、  
PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193  
、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407  
、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800  
、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821 40  
、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20  
233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、  
もしくはPRO85161 ポリペプチドをコードするcDNA)を単離するためのハイブ  
リダイゼーションプローブとして使用される場合がある。これらは、本明細書中に開示さ  
れる自然界に存在しているPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、  
PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO  
705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1  
281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1  
419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1  
572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO 50

4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161配列に対して、所望される配列同一性を有している。必要に応じて、プローブの長さは、約20～約50塩基であろう。ハイブリダイゼーションプローブは、全長の自然界に存在しているヌクレオチド配列の少なくとも部分的に新規である領域に由来し得る。この場合、これらの領域は、過度の実験を行うことなく、そして自然界に存在している配列のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161のプロモーター、エンハンサーエレメント、およびイントロンが含まれているゲノム配列から、決定され得る。例として、スクリーニング方法には、約40塩基の選択されたプローブを合成するために、公知のDNA配列を使用して、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161遺伝子のコード領域を単離する工程が含まれるであろう。ハイブリダイゼーションプローブは、<sup>32</sup>Pもしくは<sup>35</sup>Sなどの放射性核種を含む種々の標識、またはアビジン/ビオチンカップリング系を介してプローブに結合されたアルカリホスファターゼなどの酵素標識により標識され得る。本発明のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161遺伝子の配列に対して相補的である配列を有している標識されたプローブは、そのようなライブラリーのどのメンバーに対してプローブがハイブリダイズするかを決定するために、ヒトcDNA、ゲノムDNA、またはmRNAのライブラリーをスクリーニングす

るために使用することができる。ハイブリダイゼーションの手法は、後述する実施例においてさらに詳細に説明する。

【0427】

本出願に開示する任意のEST配列を、本明細書中で開示する方法を用いてプローブとして同様に使用してよい。

【0428】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161 核酸の他の有用な断片には、アンチセンスまたはセンスのオリゴヌクレオチドが含まれ、これらには、標的であるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161 mRNA (センス)、あるいは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161 DNA (アンチセンス) 配列に結合することができる一本鎖の核酸配列 (RNAまたはDNAのいずれか) が含まれる。本発明のアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドには、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9

744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161 DNAのコード領域の断片が含まれる。そのようなフラグメントは、一般に、少なくとも約14ヌクレオチド、好ましくは、約14～30ヌクレオチドを含む。所与のタンパク質をコードするcDNA配列に基づいてアンチセンスまたはセンスのオリゴヌクレオチドを誘導する能力は、例えば、Stein and Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988) および van der Kroel et al. (BioTechniques 6:958, 1988) に記載されている。

#### 【0429】

標的核酸配列へのアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはセンスオリゴヌクレオチドの結合により、増強された二重鎖分解、転写または翻訳の早期の終了を含むいくつかの手段の1つによるか、または他の手段による、標的配列の転写または翻訳を阻止する二重鎖の形成がもたらされる。したがって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161の発現をブロックするために使用することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはセンスオリゴヌクレオチドはさらに、改変された糖ホスホジエステル骨格（または他の糖連結部、例えば、WO91/06629に記載のもの）を有するオリゴヌクレオチドを含み、ここで、そのような糖連結部は、内因性ヌクレアーゼに対して抵抗性である。抵抗性の糖連結部を有するそのようなオリゴヌクレオチドは、インピボで安定である（すなわち酵素による分解に抵抗することができる）が、標的ヌクレオチド配列に結合することができる配列特異性は、保持している。

#### 【0430】

センスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例としては、WO90/10048に記載されているような有機部分、およびポリ-（L-リシン）などの標的核酸配列に対するオリゴヌクレオチドの親和性を増大させる他の部分に共有結合したオリゴヌクレオチドが挙げられる。エリブチシンなどのさらに別のインターカレート剤およびアルキル化剤または金属錯体をセンスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合させることにより標的核酸配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはセンスオリゴヌクレオチドの結合特異性を改変し得る。

#### 【0431】

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはセンスオリゴヌクレオチドは、任意の遺伝子導入法（例えば、CaPO<sub>4</sub>媒介DNAトランスフェクション、エレクトロポレーションを含む）によってか、またはエプスタイン・バーウイルスなどの遺伝子導入ベクターを使用することにより、標的核酸配列を含む細胞内に導入され得る。好ましい操作法においては、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはセンスオリゴヌクレオチドは、適当なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞を組換えレトロウイルスベクターにインピボまたはex vivoのいずれかで接触させる。適当なレトロウイルスベクターとしては、マウスレトロウイルスM-MuLV、N2（M-MuLV由来のレトロウイルス）から得られたもの、またはDCT5A、DCT5BおよびDCT5Cと表記されるダブルコピーベクター（WO90/13641を参照のこと）が挙げられるがこれらに限

10

20

30

40

50



定されない。

【0432】

センスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、WO 91 / 04753に記載されるようにリガンド結合分子との結合体の形成により標的ヌクレオチド配列を含む細胞内に導入され得る。適当なリガンド結合分子としては、細胞表面レセプター、成長因子、他のサイトカインまたは細胞表面レセプターに結合する他のリガンドが挙げられるがこれらに限定されない。好ましくは、リガンド結合分子の結合体化は、リガンド結合分子がその対応する分子またはレセプターに結合する能力を実質的に妨害したり、センスオリゴヌクレオチドもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはそのコンジュゲート型の細胞内への進入を阻止したりすることはない。

10

【0433】

あるいは、センスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドは、WO 90 / 10448に記載されるようにオリゴヌクレオチド - 脂質複合体の形成により標的核酸配列を含む細胞内に導入され得る。センスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド - 脂質複合体は、好ましくは、内在性リパーゼにより細胞内で解離される。

【0434】

アンチセンスまたはセンスのRNAまたはDNA分子は、一般に、少なくとも約5塩基長、約10塩基長、約15塩基長、約20塩基長、約25塩基長、約30塩基長、約35塩基長、約40塩基長、約45塩基長、約50塩基長、約55塩基長、約60塩基長、約65塩基長、約70塩基長、約75塩基長、約80塩基長、約85塩基長、約90塩基長、約95塩基長、約100塩基長またはそれより長い。

20

【0435】

プローブはまた、密接に関係しているPRO 226、PRO 257、PRO 268、PRO 290、PRO 36006、PRO 363、PRO 365、PRO 382、PRO 444、PRO 705、PRO 1071、PRO 1125、PRO 1134、PRO 1155、PRO 1281、PRO 1343、PRO 1379、PRO 1380、PRO 1387、PRO 1419、PRO 1433、PRO 1474、PRO 1550、PRO 1571、PRO 1572、PRO 1759、PRO 1904、PRO 35193、PRO 4341、PRO 4348、PRO 4369、PRO 4381、PRO 4407、PRO 4425、PRO 4985、PRO 4989、PRO 5737、PRO 5800、PRO 5993、PRO 6017、PRO 7174、PRO 9744、PRO 9821、PRO 9852、PRO 9873、PRO 10196、PRO 34778、PRO 20233、PRO 21956、PRO 57290、PRO 38465、PRO 38683、もしくはPRO 85161コをコードする配列の同定のための配列のプールを作成するためのPCR技術において使用される場合もある。

30

【0436】

PRO 226、PRO 257、PRO 268、PRO 290、PRO 36006、PRO 363、PRO 365、PRO 382、PRO 444、PRO 705、PRO 1071、PRO 1125、PRO 1134、PRO 1155、PRO 1281、PRO 1343、PRO 1379、PRO 1380、PRO 1387、PRO 1419、PRO 1433、PRO 1474、PRO 1550、PRO 1571、PRO 1572、PRO 1759、PRO 1904、PRO 35193、PRO 4341、PRO 4348、PRO 4369、PRO 4381、PRO 4407、PRO 4425、PRO 4985、PRO 4989、PRO 5737、PRO 5800、PRO 5993、PRO 6017、PRO 7174、PRO 9744、PRO 9821、PRO 9852、PRO 9873、PRO 10196、PRO 34778、PRO 20233、PRO 21956、PRO 57290、PRO 38465、PRO 38683、もしくはPRO 85161ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列はまた、PRO 226、PRO 257、PRO 268、PRO 290、PRO 36006、PRO 363、PRO 365、PRO 382、PRO 444、PR

40

50

PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子のマッピングのため、あるいは、遺伝的障害を有している個体の遺伝子分析のためのハイブリダイゼーションプローブを構築するためにも、使用することができる。本明細書において提供されるヌクレオチド配列は、既知の手法（例えば、*in situ* ハイブリダイゼーション、既知染色体マーカーに対する連鎖分析およびライブラリーを用いたハイブリダイゼーションスクリーニング）を用いて染色体および染色体の特定の領域にマッピングされ得る。

10

【0437】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161をコードする配列が別のタンパク質に結合するタンパク質をコードする場合（例えば、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161が受容体である場合）には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドは、結合相互作用に関係している他の

20

30

40

50

タンパク質あるいは分子を同定するためのアッセイにおいて使用することができる。そのような方法により、レセプター/リガンド結合相互作用のインヒビターを同定できる。そのような結合相互作用に関与するタンパク質はまた、結合相互作用のペプチドまたは低分子のインヒビターまたはアゴニストについてのスクリーニングにおいて使用できる。また、受容体 PRO 226、PRO 257、PRO 268、PRO 290、PRO 36006、PRO 363、PRO 365、PRO 382、PRO 444、PRO 705、PRO 1071、PRO 1125、PRO 1134、PRO 1155、PRO 1281、PRO 1343、PRO 1379、PRO 1380、PRO 1387、PRO 1419、PRO 1433、PRO 1474、PRO 1550、PRO 1571、PRO 1572、PRO 1759、PRO 1904、PRO 35193、PRO 4341、PRO 4348、PRO 4369、PRO 4381、PRO 4407、PRO 4425、PRO 4985、PRO 4989、PRO 5737、PRO 5800、PRO 5993、PRO 6017、PRO 7174、PRO 9744、PRO 9821、PRO 9852、PRO 9873、PRO 10196、PRO 34778、PRO 20233、PRO 21956、PRO 57290、PRO 38465、PRO 38683、もしくは PRO 85161 は、相関するリガンド（単数または複数）を単離するために使用することもできる。スクリーニングアッセイは、自然界に存在している PRO 226、PRO 257、PRO 268、PRO 290、PRO 36006、PRO 363、PRO 365、PRO 382、PRO 444、PRO 705、PRO 1071、PRO 1125、PRO 1134、PRO 1155、PRO 1281、PRO 1343、PRO 1379、PRO 1380、PRO 1387、PRO 1419、PRO 1433、PRO 1474、PRO 1550、PRO 1571、PRO 1572、PRO 1759、PRO 1904、PRO 35193、PRO 4341、PRO 4348、PRO 4369、PRO 4381、PRO 4407、PRO 4425、PRO 4985、PRO 4989、PRO 5737、PRO 5800、PRO 5993、PRO 6017、PRO 7174、PRO 9744、PRO 9821、PRO 9852、PRO 9873、PRO 10196、PRO 34778、PRO 20233、PRO 21956、PRO 57290、PRO 38465、PRO 38683、もしくは PRO 85161 ポリペプチド、あるいは、PRO 226、PRO 257、PRO 268、PRO 290、PRO 36006、PRO 363、PRO 365、PRO 382、PRO 444、PRO 705、PRO 1071、PRO 1125、PRO 1134、PRO 1155、PRO 1281、PRO 1343、PRO 1379、PRO 1380、PRO 1387、PRO 1419、PRO 1433、PRO 1474、PRO 1550、PRO 1571、PRO 1572、PRO 1759、PRO 1904、PRO 35193、PRO 4341、PRO 4348、PRO 4369、PRO 4381、PRO 4407、PRO 4425、PRO 4985、PRO 4989、PRO 5737、PRO 5800、PRO 5993、PRO 6017、PRO 7174、PRO 9744、PRO 9821、PRO 9852、PRO 9873、PRO 10196、PRO 34778、PRO 20233、PRO 21956、PRO 57290、PRO 38465、PRO 38683、もしくは PRO 85161 ポリペプチドの受容体の生物学的活性を模倣するリード化合物を見つけるために設計することができる。そのようなスクリーニングアッセイは、化学物質ライブラリーのハイスループットスクリーニングに適したアッセイを含み、低分子薬剤候補の同定に特に適するものとなっている。企図される低分子は、合成の有機または無機の化合物を含む。アッセイは、タンパク質 - タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイおよび細胞ベースアッセイを含む種々の形式で実施でき、これらは、当該分野で十分に特徴付けられている。

**【0438】**

PRO 226、PRO 257、PRO 268、PRO 290、PRO 36006、PRO 363、PRO 365、PRO 382、PRO 444、PRO 705、PRO 1071、PRO 1125、PRO 1134、PRO 1155、PRO 1281、PRO 1343、PRO 1379、PRO 1380、PRO 1387、PRO 1419、PRO 1433

、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする核酸、あるいはその修飾された形態はまた、トランスジェニック動物または「ノックアウト」動物のいずれかを作成するためにも使用することができる。これはその後、治療上  
10 有用である試薬の開発およびスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物（例えば、マウスまたはラット）は、トランスジーンを含む細胞を有する動物であり、そのトランスジーンは、出生前、例えば、胚の段階において動物または動物の先祖に導入されている。トランスジーンは、トランスジェニック動物を発生する細胞のゲノム内に組み込まれるDNAである。本発明により、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341  
20 、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするcDNAが提供され、これは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作成するために使用される確立されている技術およびゲ  
30 ノム配列にしたがって、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするゲノムDNAをクローニングするために使用することができる。  
40 当該分野で公知の任意の手法を用いて、標的遺伝子トランスジーンを動物に導入すること  
50

により、トランスジェニック動物の創始者が作製され得る。そのような技術としては、前核マイクロインジェクション (pronuclear microinjection) (米国仮特許出願番号 4,873,191 号、同第 4,736,866 号、および同第 4,870,009 号) ; 生殖系へのレトロウイルス媒介性遺伝子導入 (Van der Putten, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82:6148-6152 (1985)) ; 胚性幹細胞の中での遺伝子標的化 (Thompson, et al., Cell, 56:313-321 (1989)) ; 遺伝子トラップベクターを使用する非特異的な挿入による不活化 (nonspecific insertional inactivation using a gene trap vector) (米国特許第 6,436,707 号) ; 胚のエレクトロポレーション (Lo, Mol. Cell. Biol., 3:1803-1814 (1983)) ; および精子媒介性遺伝子導入 (Lavitrano, et al., Cell, 57:717-723 (1989)) ; などが挙げられるが、これらに限定はされない。通常、特定の細胞は、組織特異的エンハンサーを用いた PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくは PRO85161 トランスジーンを取り込みについて標的化される。胚段階で動物の生殖系に導入された PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくは PRO85161 ポリペプチドをコードするトランスジーンのコピーが含まれているトランスジェニック動物は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくは PRO85161 ポリペプチドをコードする DNA の発現の増大の効果を試験するために使用することができる。そのような動物は、例えば、過剰発現に関連する病的状態からの保護を付与すると考えられる試薬に対する供試動物として使

10

20

30

40

50

用できる。本発明のこの側面によれば、その試薬で動物を処置し、そして病的状態の発生率がトランスジーンを有する非処置の動物と比較して低減していれば、病的状態に対する潜在的治療的介入があったことを示す。あるいは、PRO 226、PRO 257、PRO 268、PRO 290、PRO 36006、PRO 363、PRO 365、PRO 382、PRO 444、PRO 705、PRO 1071、PRO 1125、PRO 1134、PRO 1155、PRO 1281、PRO 1343、PRO 1379、PRO 1380、PRO 1387、PRO 1419、PRO 1433、PRO 1474、PRO 1550、PRO 1571、PRO 1572、PRO 1759、PRO 1904、PRO 35193、PRO 4341、PRO 4348、PRO 4369、PRO 4381、PRO 4407、PRO 4425、PRO 4985、PRO 4989、PRO 5737、PRO 5800、PRO 5993、PRO 6017、PRO 7174、PRO 9744、PRO 9821、PRO 9852、PRO 9873、PRO 10196、PRO 34778、PRO 20233、PRO 21956、PRO 57290、PRO 38465、PRO 38683、もしくはPRO 85161ポリペプチドのヒト以外のホモログを使用して、PRO 226、PRO 257、PRO 268、PRO 290、PRO 36006、PRO 363、PRO 365、PRO 382、PRO 444、PRO 705、PRO 1071、PRO 1125、PRO 1134、PRO 1155、PRO 1281、PRO 1343、PRO 1379、PRO 1380、PRO 1387、PRO 1419、PRO 1433、PRO 1474、PRO 1550、PRO 1571、PRO 1572、PRO 1759、PRO 1904、PRO 35193、PRO 4341、PRO 4348、PRO 4369、PRO 4381、PRO 4407、PRO 4425、PRO 4985、PRO 4989、PRO 5737、PRO 5800、PRO 5993、PRO 6017、PRO 7174、PRO 9744、PRO 9821、PRO 9852、PRO 9873、PRO 10196、PRO 34778、PRO 20233、PRO 21956、PRO 57290、PRO 38465、P

10

20

30

40

50

PRO 38683、もしくはPRO 85161「ノックアウト」動物を構築することができる。これは、PRO 226、PRO 257、PRO 268、PRO 290、PRO 36006、PRO 363、PRO 365、PRO 382、PRO 444、PRO 705、PRO 1071、PRO 1125、PRO 1134、PRO 1155、PRO 1281、PRO 1343、PRO 1379、PRO 1380、PRO 1387、PRO 1419、PRO 1433、PRO 1474、PRO 1550、PRO 1571、PRO 1572、PRO 1759、PRO 1904、PRO 35193、PRO 4341、PRO 4348、PRO 4369、PRO 4381、PRO 4407、PRO 4425、PRO 4985、PRO 4989、PRO 5737、PRO 5800、PRO 5993、PRO 6017、PRO 7174、PRO 9744、PRO 9821、PRO 9852、PRO 9873、PRO 10196、PRO 34778、PRO 20233、PRO 21956、PRO 57290、PRO 38465、PRO 38683、もしくはPRO 85161ポリペプチドをコードする内因性の遺伝子と、動物の胚性幹細胞の中に導入されたPRO 226、PRO 257、PRO 268、PRO 290、PRO 36006、PRO 363、PRO 365、PRO 382、PRO 444、PRO 705、PRO 1071、PRO 1125、PRO 1134、PRO 1155、PRO 1281、PRO 1343、PRO 1379、PRO 1380、PRO 1387、PRO 1419、PRO 1433、PRO 1474、PRO 1550、PRO 1571、PRO 1572、PRO 1759、PRO 1904、PRO 35193、PRO 4341、PRO 4348、PRO 4369、PRO 4381、PRO 4407、PRO 4425、PRO 4985、PRO 4989、PRO 5737、

PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする変更されたゲノムDNAの間での相同組み換えの結果としての、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161タンパク質をコードする欠損遺伝子または変化した遺伝子を有している。好ましくは、前記ロックアウト動物は、哺乳動物である。より好ましくは、前記哺乳動物は、げっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）である。例えば、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするcDNAを、確立されている技術にしたがってPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするゲノムDNAをクローン化するために使用することができる。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196

、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部は、欠失させることができ、また、別の遺伝子（例えば、組み込みをモニターするために使用することができる選択マーカーをコードする遺伝子）で置き換えることもできる。代表的には、非改変フランキングDNA（5'および3'末端の両方）の数キロ塩基をベクター内に含める[相同組換えベクターの説明については、例えば、Thomas and Capecchi, Cell, 51:503(1987)を参照のこと]。そのベクターは、胚性幹細胞系統内に導入し（例えば、エレクトロポレーションによって）、そして導入されたDNAが内在性DNAと相同組換えを起こしている細胞を選択する[例えば、Li et al., Cell, 69:915(1992)を参照のこと]。次に選択された細胞を動物（例えば、マウスまたはラット）の胚盤胞内に注入し、凝集キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987) pp. 113-152参照]。次にキメラ胚を適当な擬似妊娠の雌里親動物内に移植し、胚を妊娠期間満了させることにより、「ノックアウト」動物を作製することができる。相同組換えされたDNAをその生殖細胞に保有する子孫を標準的な手法で同定し、その動物の全細胞が相同組換えDNAを含む動物を育てるために使用することができる。ノックアウト動物は、例えば、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子が存在しないことが原因である、特定の病状に対して、あるいはそのような病状をそれらが発症することに対して防御するそれらの能力について、特性決定することができる。

#### 【0439】

さらに、ノックアウトマウスは、遺伝子の機能および薬剤標的に関する薬学的有用性の発見において、ならびに所与の標的に関連する潜在的な標的上の副作用の測定において、高度な情報源であり得る。遺伝子の機能および生理学的特徴は、マウスとヒトとの間で十分保存されているが、その理由は、それらが共に哺乳動物であり、同様の数の遺伝子を含んでおり、それらの遺伝子が種間で高度に保存されているためである。例えば、マウス16番染色体上の遺伝子の98%がヒトオルソログを有することが最近十分に裏付けられた(Mural et al., Science 296:1661-71(2002))。

#### 【0440】

胚性幹(ES)細胞における遺伝子ターゲティングは、ヒト疾患に関連する多くの遺伝子における無発現変異を有するマウスの構築を可能にしているが、必ずしも遺伝子疾患のすべてが無発現変異に起因するわけではない。マウスの遺伝子座を破壊し、変異を有するヒト対応物を導入する遺伝子の置き換え(ノックイン)のための方法を確立することによってヒト疾患の価値あるマウスモデルを設計できる。その後、ヒトタンパク質をターゲティングするインビボの薬剤アッセイを実施できる(Kitamoto et al., Biochemical and Biophysical Res. Commun., 222:742-47(1996))。

10

20

30

40

50



## 【0441】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする核酸もまた、遺伝子治療において使用することができる。遺伝子療法の用途においては、例えば、欠損遺伝子の置き換えのための治療上有効な遺伝子産物のインビボ合成を達成するために細胞内に遺伝子を導入する。「遺伝子療法」とは、単回処置により持続した作用が達成される従来の遺伝子療法および治療上有効なDNAまたはmRNAの単回投与または反復投与を行う遺伝子治療薬の投与の両方を含む。アンチセンスのRNAおよびDNAは、インビボで特定の遺伝子の発現を阻止するための治療薬として使用され得る。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞内に移入され、そこで細胞膜による限定された取り込みにより生じるその低い細胞内濃度にも関わらずインヒビターとして作用することができることが既に明らかになっている(Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146[1986])。そのオリゴヌクレオチドは、例えば、その負に帯電したホスホジエステル基を非電荷の基で置換することにより、その取り込みが増強されるように改変できる。

## 【0442】

生存細胞に核酸を導入するために使用できる種々の手法が存在する。その手法は、インビトロで核酸を培養細胞中に、または意図する宿主の細胞内にインビボで移入させるか応じて変動する。インビトロの哺乳動物細胞への核酸の移入に適する手法としては、リボソームの使用、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈降法などが挙げられる。現時点で好ましいインビボの遺伝子導入の手法としては、ウイルス(代表的には、レトロウイルス)ベクターによるトランスフェクションおよびウイルスコートタンパク質-リボソーム媒介トランスフェクションが挙げられる(Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205-210[1993])。一部の状況においては、核酸起源に対し、標的細胞をターゲティングする薬剤(例えば、細胞表面膜タンパク質または標的細胞に対して特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンドなど)を提供することが望ましい。リボソームを使用する場合は、エンドサイトーシスに関連する細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質をターゲティングのためおよび/または取り込みを促進するために使用され得、そのようなものとしては、例えば、特定の細胞型に対して向性のキャプシドタンパク質またはそのフラグメント、サイクリングにおいて内在化を起こすタンパク質に対する抗体、細胞内局在化をターゲティングして細胞内半減期を増大させるタンパク質が挙げられる。レセプター媒介エンドサイトーシスの手法は、例えば、Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432(1987); および Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414(1990)に記載されている。遺伝子の作製および遺伝子療法のプロトコルについての概説は、Anderson et al., Science 256, 808-813(1992)を参照のこと。

## 【0443】

本明細書中に記載されるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO

705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドはまた、タンパク質の電気泳動の目的のための分子量マーカーとして使用することもでき、そして単離された核酸配列は、そのようなマーカーを組み換えによって発現させるために使用することができる

10

本明細書中に記載されるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする核酸分子、またはそれらの断片は、染色体の同定に有用である。この点に関し、実際の配列データに基づいた染色体マーカー試薬で現在使用できるものは、比較的少ないため、新しい染色体マーカーを同定する必要性がなお存在している。本発明のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161核酸分子のそれぞれは、染色体マーカーとして使用することができる。

20

30

#### 【0444】

本発明のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド、

40

50

および核酸分子はまた、組織型分類のために診断的に使用することもできる。この場合、本発明のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドは、別のものと比較して場合に1つの組織において（好ましくは、同じ組織型の正常な組織と比較した罹患している組織において）異なって発現され得る。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161核酸分子については、PCR、ノーザンブロット分析、サザンブロット分析、およびウェスタンブロット分析のためのプローブを作成するための用途が見出されるであろう。

10

20

30

40

50

#### 【0445】

本明細書中に記載されるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドは、治療薬としても使用することができる。本発明のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO

38683、もしくはPRO85161ポリペプチドは、薬学的に有用な組成物を調製するための公知の方法にしたがって処方することができる。これによつては、そのPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161産物が、薬学的に許容される担体である媒体と共に混合される。治療用処方物は、凍結乾燥処方物または水溶液の形態で、任意の生理学的に許容可能な担体、賦形剤または安定化剤(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))と、所望の純度を有する活性成分とを混合することにより保存用に調製される。許容可能な担体、賦形剤または安定化剤は、使用される用量および濃度においてレシipientにとって非毒性であり、そしてそれらとしては、緩衝物質(例えば、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸); 抗酸化剤(アスコルビン酸を含む); 低分子量(約10残基未満)のポリペプチド; タンパク質(例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン); 親水性ポリマー(例えば、ポリビニルピロリドン、アミノ酸(例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシン)); 単糖類、二糖類および他の炭水化物(グルコース、マンノースまたはデキストロースを含む); キレート剤(例えば、EDTA); 糖アルコール(例えば、マンニトールまたはソルビトール); 塩形成対イオン(例えば、ナトリウム); および/または非イオン性界面活性剤(例えば、TWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>またはPEG)が挙げられる。

#### 【0446】

インビボ投与のために使用される処方物は、滅菌されていなければならない。これは、凍結乾燥および再構成の前後に滅菌濾過膜に通して濾過することにより容易に達成される。

#### 【0447】

本明細書中の治療用組成物は、一般に、滅菌された取出し口を有する容器、例えば、皮下注射用の針で穿刺可能である蓋を有する静脈用溶液バッグまたはバイアル内に入っている。

#### 【0448】

投与経路は、公知の方法によるものであり、例えば、静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内または病巣内の経路により注射または注入を行うか、局所投与を行うか、または徐放系による。

#### 【0449】

本発明の薬学的組成物の用量および所望の薬剤濃度は、意図される特定の用途に応じて変動し得る。適切な用量または投与経路の決定は、十分に当業者の範囲内である。動物実験は、ヒトの治療有効量の決定のための信頼できる指針を与える。有効用量の種間のスケールリングは、Mordenti, J. and Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics", Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42 - 96に記載されている原則に従って実施できる。

#### 【0450】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PR



5、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドのマイクロカプセル化が想定される。徐放性放出のための組換えタンパク質のマイクロカプセル化は、ヒト成長ホルモン(rhGH)、インターフェロン(rhIFN)、インターロイキン-2およびMNRGP120を用いて良好に行われている。Johnson et al., Nat. Med., 2:795-799(1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27:1221-1223(1993); Horae et al., Bio/Technology, 8:755-758(1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems", Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO97/03692, WO96/40072, WO96/07399; および米国特許第5,654,010号。

10

## 【0452】

これらのタンパク質の徐放性処方物は、生体適合性および広範な生体分解性を有することからポリ乳酸グリコール酸(PLGA)共重合体を用いて開発された。PLGAの分解生成物である乳酸およびグリコール酸は、ヒト身体内で迅速に除去される。さらに、このポリマーの分解性は、その分子量および組成に応じて数ヶ月～数年に調節できる。Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", M. Chasin and R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41。

20

## 【0453】

本発明には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを模倣する化合物(アゴニスト)、あるいは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もし

30

40

50

くはPRO85161ポリペプチドの作用を妨げる化合物（アンタゴニスト）を同定するための化合物のスクリーニング方法が含まれる。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを模倣するアゴニストは、ネガティブな表現形が、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子の破壊がそのゲノムに含まれている非ヒトトランスジェニック動物を用いた知見に基づいて観察される場合に、特に治療的に有用である。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの作用を妨げるアンタゴニストは、ポジティブな表現形が非ヒトトランスジェニックノックアウト動物を用いた観察に基づいて観察される場合に、特に治療的に有用である。アンタゴニスト薬物の候補についてのスクリーニングアッセイは、本明細書中で同定された遺伝子によってコードされるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO

38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに結合するかまたはそれらと複合体を形成するか、あるいは、別の方法で他の細胞性タンパク質とのコードポリペプチドの相互作用を妨害する化合物を同定するように設計される。そのようなスクリーニングアッセイは、化学物質ライブラリーのハイスループットスクリーニングに適したアッセイを含み、それは、低分子薬剤候補の同定に特に適したものとなっている。

【0454】

そのアッセイは、例えば、タンパク質 - タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイおよび細胞ベースのアッセイを含む種々の形式において実施でき、これらは、当該分野で十分に特徴付けられている。

【0455】

アンタゴニストについての全てのアッセイは、これらには、薬物の候補を、本明細書中で同定された核酸によってコードされるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドと、これらの2つの成分が相互作用できるために十分な条件下で、十分な時間の間、接触させることが必要である点で共通している。

【0456】

結合アッセイにおいては、相互作用は、結合であり、そして形成される複合体は、単離され得るか、または反応混合物中で検出され得る。本明細書中で同定された遺伝子によってコードされるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド、あるいは、薬物の候補は、固相（例えば、マイクロタイタープレート）上に、共有結合または非共有結合によって固定される。非共有結合は、一般的には、固体表面を、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO3

10

20

30

40

50



8465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの溶液でコーティングし、そして乾燥させることによって行われる。あるいは、固定されるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに特異的な固定された抗体（例えば、モノクローナル抗体）を、固体表面にそれを結合させるために使用することができる。このアッセイは、検出可能な標識で標識されていてよい固定化されていない成分を固定化された成分、例えば、固定された成分を有するコーティングされた表面に添加することにより行う。反応終了後、非反応成分を、例えば洗浄により除去し、そして固体表面に固定された複合体を検出する。元々、固定されていない成分が検出可能な標識を有する場合は、表面に固定化された標識の検出は、複合体形成が起こったことを示す。元々、固定されていない成分が標識を有していない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識された抗体を使用することにより検出できる。

#### 【0457】

候補の化合物が、本明細書中で同定された遺伝子によってコードされる特定のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドと相互作用するが、それらに結合はしない場合には、そのポリペプチドとのその相互作用は、タンパク質 - タンパク質相互作用を検出するための周知の方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイとしては、従来の方法（例えば、架橋結合、同時免疫沈降および勾配またはクロマトグラフィーカラムを介した同時精製）が挙げられる。さらに、タンパク質 - タンパク質相互作用は、Chevray and Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789 - 5793 (1991) により開示されているように、Fieldsおよび共同研究者らにより報告された酵母ベースの遺伝子系 (Fields and Song, Nature (London), 340: 245 - 246 (1989); Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9578 - 9582 (1991)) を用いてモニタリングできる。多くの転写活性化物質（例えば、酵母GAL4）は、2つの物理的に個別のモジュラードメイン、一方は、DNA結合ドメインとして作用するもの、他方は、転写活性化ドメインとして機能するものからなる。上記文献に記載された酵母発現系（一般に「ツーハイブリッド系」と呼ばれる）は、この性質を利用しており、そして、2つのハイブリッドタンパク質を使用し、一方においては、標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合しており、他方においては、候補の活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL4

活性化プロモーターの制御下のGAL1-lacZレポーター遺伝子の発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存している。相互作用ポリペプチドを含むコロニーは、-ガラクトシダーゼに対する発色基質を用いて検出される。ツーハイブリッド手法を用いて2つの特定のタンパク質の間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット(MATCHMAKER<sup>TM</sup>)は、Clontechから市販されている。この系はまた、特定のタンパク質相互作用に關与するタンパク質ドメインをマッピングするため、ならびにこれらの相互作用に必須であるアミノ酸残基を限定するためにも応用できる。

#### 【0458】

本明細書中で同定されたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子と、他の細胞内成分または細胞外成分との相互作用を妨害する化合物は、以下のように試験することができる：通常、遺伝子産物および細胞内または細胞外の成分を含む反応混合物を、2つの生成物の相互作用および結合を可能にする条件下および時間に渡り調製する。候補化合物が結合を抑制する能力を試験するために、反応を試験化合物の非存在下および存在下において実施する。さらに、プラセボを第3の反応混合物に添加し、ポジティブコントロールとして使用し得る。試験化合物と混合物中に存在する細胞内または細胞外の成分との間の結合(複合体形成)は、上記した通りモニタリングされる。コントロール反応においては、複合体が形成されるが試験化合物を含む反応混合物では、形成しないことは、被験化合物が被験化合物とその反応相手との相互作用を妨害することを示す。

#### 【0459】

アンタゴニストについてアッセイするためには、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドが、特定の活性についてスクリーニングされる化合物と共に細胞に添加され得、そして、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO442

5、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの存在下で目的の活性を阻害する化合物の能力が、その化合物がPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対するアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドと、膜結合型のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド受容体あるいは組み換え体受容体を有している可能性のあるアンタゴニストを、競合阻害アッセイに適している条件下で混合することによって検出することができる。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PR

PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドは、例えば、放射性によって標識することができ、その結果、受容体に結合させられたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチド分子の数を、可能性のあるアンタゴニストの有効性を決定するために使用することができる。そのレセプターをコードする遺伝子は、当業者に公知の多くの方法、例えば、リガンドパニングおよびFACSソーティングにより同定できる。Coligan et al., Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991)。好ましくは、発現クローニングが使用される。この場合、ポリアデニル化RNAは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに反応する細胞から調製され、そして、このRNAから作成されたcDNAライブラリーはプールに分けられて、COS細胞、あるいは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドには反応しない他の細胞をトランスフェクトするために使用される。ガラススライド上で増殖させられたトランスフェクトされた細胞は、標識されたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4

985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに曝される。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO157

10

2、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドは、部位特異的プロテインキナーゼについての認識部位のヨウ素化、またはそれを含めることが含まれる様々な手段によって標識することができる。固定化およびインキュベーションの後、スライドをオートラジオグラフ分析に供する。陽性のプールを同定し、サブプールを調製し、相互作用的なサブプール化および再スクリーニングの過程を用いて再トランスフェクトし、最終的に推定レセプターをコードする単一のクローンを得る。

20

#### 【0460】

受容体の同定のための別のアプローチとしては、標識されたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドが、レセプター分子を発現する細胞膜または抽出調製物と光親和性結合させられる。架橋結合された物質をPAGEで分離し、X線フィルムに曝露する。レセプターを含む標識された複合体を切り出し、ペプチドフラグメントに分離し、そしてタンパク質マイクロ配列決定に供することができる。マイクロ配列決定から得られたアミノ酸配列を用いて、cDNAライブラリーをスクリーニングするための変性オリゴヌクレオチドプローブのセットを設計することにより、推定レセプターをコードする遺伝子を同定する。

30

40

#### 【0461】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433

50

、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対するアンタゴニストの効果を評価する別のアプローチは、公知のロックアウト表現形を模倣するために、野生型マウスに対して、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161アンタゴニストを投与することである。したがって、当業者は、最初に、目的のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161遺伝子がロックアウトし、そしてPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161遺伝子のロックアウトまたは破壊の結果としての得られた表現形を観察する。続いて、当業者は次に、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO

5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対するアンタゴニストを野生型マウスに投与することにより、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対するアンタゴニストの有効性を評価することができる。有効なアンタゴニストは、ノックアウト動物において最初に観察された表現型の作用を模倣すると予測される。

#### 【0462】

同様に、当業者は、公知のネガティブなノックアウトの表現形を緩和するために、非ヒトトランスジェニックマウスに対して、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161アゴニストを投与することにより、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対するアゴニストの効果を評価することができる。したがって、当業者は、最初に、目的のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対するアゴニストの有効性を評価することができる。

したがって、当業者は、最初に、目的のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対するアゴニストの有効性を評価することができる。

25、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161遺伝子をノックアウトし、そしてPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161遺伝子のノックアウトまたは破壊の結果としての得られる形を観察する。続いて、当業者は次に、非ヒトトランスジェニックマウスに対してPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対するアゴニストを投与することにより、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対するアゴニストの有効性を評価することができる。有効なアゴニストは、ノックアウト動物において最初に観察された負の表現型の作用を寛解すると予測される。

#### 【0463】

アンタゴニストについての別のアッセイにおいては、受容体を発現している哺乳動物細胞または膜調製物が、標識されたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、



PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドとともに、候補の化合物の存在下でインキュベートされる。次に、この相互作用を増強または阻止する化合物の能力を測定することができる

可能性のあるアンタゴニストのさらに特異的な例としては、免疫グロブリンのPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、そして具体的には、抗体（これには、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ならびにそれらの断片）、単鎖抗体、抗イディオタイプ抗体、ならびにそのような抗体または断片のキメラバージョンもしくはヒト化バージョン、さらには、ヒト抗体および抗体断片が含まれるが、これらに限定はされない）が挙げられる。あるいは、可能性のあるアンタゴニストは、密接に関連しているタンパク質、例えば、受容体を認識するが、影響は及ぼさず、それによってPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの作用を競合的に阻害する、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの成熟形態であり得る。

#### 【0464】

別の可能性のあるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281

10

20

30

40

50

、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を使用して調製されたアンチセンスRNAまたはDNA構築物である。この場合、例えば、アンチセンスRNAまたはDNA分子は、標的化されたmRNAにハイブリダイズして、タンパク質の翻訳を妨げることによって、mRNAの翻訳を直接ブロックするように作用する。アンチセンス技術を用いて、三重らせん形成またはアンチセンスDNAもしくはアンチセンスRNAを介して遺伝子発現を制御することができ、これらの方法は、両方ともDNAまたはRNAへのポリヌクレオチドの結合に基づいている。例えば、本明細書中の成熟PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード部分は、約10から40塩基対の長さのアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計するために使用される。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に關与する遺伝子の領域に相補であるように設計(三重らせん - Lee et al., Nucl. Acids Res., 6:3073(1979); Cooney et al., Science, 241:456(1988); Dervan et al., Science, 251:1360(1991))することにより、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの転写および産生を妨害する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、インビボでmRNAにハイブリダイズして、mRNA分子のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、P

RO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドへの翻訳をブロックする(アンチセンス - Okano, Neurochem., 56:560(1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988))。上記に記載されるオリゴヌクレオチドはまた、アンチセンスRNAまたはDNAをインビボで発現させて、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの生産を阻害することができるように、細胞に送達することもできる。アンチセンスDNAを使用する場合は、例えば、標的遺伝子ヌクレオチド配列の約-10~+10位の間の翻訳開始部位から得られるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

10

20

30

40

50

#### 【0465】

可能性のあるアンタゴニストとしては、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの活性部位、受容体結合部位、または成長因子、あるいは、他の関連する結合部位に結合し、それによって、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの正常な生物学的活性をブロックする低分子が挙げられる。低分子の例としては、小型のペプチドまたはペプチド様分子、好ましくは、可溶性

ペプチドおよび合成の非ペプチジル有機化合物または非ペプチジル無機化合物が挙げられるがこれらに限定されない。

【0466】

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒することができる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的な標的RNAへの配列特異的ハイブリダイゼーション、およびその後のエンドヌクレアーゼ的切断により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、公知の手法により同定できる。さらに詳細な説明については、例えば、Rossi, Current Biology, 4: 469 - 471 (1994) およびPCT公開WO97/33551 (1997年9月18日公開)を参照のこと。

【0467】

転写を抑制するために使用される三重らせん形成における核酸分子は、一本鎖でありデオキシヌクレオチドから構成されるものでなければならない。これらのオリゴヌクレオチドの塩基の組成は、Hoogsteenの塩基対形成の規則によって三重らせん形成を促進するように設計され、その規則には、一般に二重鎖の一方の鎖の上にかんりの長さのプリンまたはピリミジンが必要となる。さらに詳細な説明は、前出のPCT公開WO97/33551を参照のこと。

【0468】

これらの低分子は、上記したスクリーニングアッセイの任意の1つ以上により、そして/または当業者に周知の他のスクリーニング手法により、同定することができる。

【0469】

本明細書に開示した分子の診断上および治療上の使用はまた、後に開示および説明する正の機能のアッセイのヒットに基づき得る。

F. 抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体

本発明により、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体が提供される。これらは、治療薬および/または診断薬として、本明細書中での用途が見出され得る。例示される抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体およびヘテロ結合体化抗体を含む。

10

20

30

40

50

## 【0470】

## 1. ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原およびアジュバントの複数回の皮下 (s c) 注射または腹腔内 (i p) 注射により動物中で産生させる。その関連する抗原は、(特に合成ペプチドを使用する場合) 免疫される種において免疫原となるタンパク質に結合体することが有用であり得る。例えば、抗原は、二官能性薬剤または誘導体形成性の物質、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介した結合体化)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リシン残基を介する)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、 $\text{SOCl}_2$  または  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$  (式中、R および  $\text{R}^1$  は、異なるアルキル基である) を用いて、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H)、血清アルブミン、ウシチログロブリンまたはダイズトリブシンインヒビターに結合体化され得る。

10

## 【0471】

例えば、 $100\mu\text{g}$  または  $5\mu\text{g}$  のタンパク質または結合体(それぞれウサギまたはマウスの場合)を3容量のフロイント完全アジュバントと混合し、その溶液を複数部位に皮内注射することにより、抗原、免疫原性結合体または誘導体に対して動物を免疫する。1ヵ月後、複数部位への皮下注射によりフロイント完全アジュバント中のペプチドまたは結合体の元の量の  $1/5 \sim 1/10$  を用いて動物を追加免疫する。7~14日後、動物から採血し、血清の抗体力価をアッセイする。力価が平衡に達するまで動物を追加免疫する。結合体はまた、タンパク質融合物として組換え細胞培養物中において作製することもできる。また、ミョウバンなどの凝集剤を適宜使用して、免疫応答を増強する。

20

## 【0472】

## 2. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) により、初めて報告されたハイブリドーマ法を用いて作製され得るか、または組換えDNA法(米国特許第4,816,567号)によりされ得る。

## 【0473】

ハイブリドーマ法においては、マウスまたは他の適切な宿主動物(例えば、ハムスター)を上記したように免疫することにより、免疫に使用するタンパク質に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生可能であるリンパ球を誘発させる。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫され得る。免疫の後、リンパ球を単離し、次に適当な融合剤(例えば、ポリエチレングリコール)を用いてミエローマ細胞株と融合することにより、ハイブリドーマ細胞が形成される(Goding, Monoclonal Antibodies, Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。

30

## 【0474】

このように調製されたハイブリドーマ細胞を適当な培養培地中に播種して生育させるが、その培地は、好ましくは、融合していない親ミエローマ細胞(融合相手とも呼ばれる)の生育または生存を抑制する1つ以上の物質を含むものである。例えば、親ミエローマ細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPR T)を欠失している場合は、ハイブリドーマに対する選択培養培地は、代表的には、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含み(HAT培地)、これらの物質は、HGPRT欠損細胞の生育を妨害する。

40

## 【0475】

好ましい融合相手であるミエローマ細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定した高レベルの産生を支援し、そして融合していない親細胞に対して選択する選択培地に対して感受性であるものである。好ましいミエローマ細胞株は、マウスミエローマ株(例えば、Sal k Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USAより入手可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍から得られるものおよびAmeric

50

an Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USAより入手可能なSP-2および誘導体、例えば、X63-Ag8-653細胞)である。ヒトミエローマおよびマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生に関して記載されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984);およびBrodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63(Marcel Dekker, Inc. New York, 1987))。

#### 【0476】

ハイブリドーマ細胞を生育させる培養培地は、抗原に対して指向されたモノクローナル抗体の産生に関してアッセイされる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降またはインビトロの結合アッセイ(例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)または酵素結合免疫吸着測定法(ELISA))により測定する。

#### 【0477】

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson et al., Anal. Biochem., 107:220(1980)に記載のスカッチャード分析により測定できる。

#### 【0478】

所望の特異性、親和性および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が一旦同定されると、限界希釈法によりクローンをサブクローニングし、標準的な方法により生育させ得る(Goding, Monoclonal Antibodies, Principles and Practice, pp.59-103(Academic Press, 1986))。この目的のための適当な培地としては、例えば、D-MEMまたはRPMI-1640培地が挙げられる。さらに、ハイブリドーマ細胞は、例えば、マウスへの細胞のi.p.注射により、動物における腹水腫瘍としてインビボで生育させてよい。

#### 【0479】

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、従来の抗体精製手順(例えば、アフィニティークロマトグラフィ(例えば、プロテインAまたはプロテインG-セファロースを使用)またはイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析など)により、培養培地、腹水または血清から適宜分離する。

#### 【0480】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)容易に単離および配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい起源となる。一旦、単離されると、そのDNAは、発現ベクター内に入れられ、次いで宿主細胞(例えば、E.coli細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞または他の方法で抗体タンパク質を産生しないミエローマ細胞)にトランスフェクトされることにより、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成を行う。抗体をコードするDNAの細菌における組換え発現に関する概説としては、Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262(1993)およびPlueckthun, Immunol. Revs., 130:151-188(1992)が挙げられる。

#### 【0481】

モノクローナル抗体または抗体フラグメントは、McCafferty et al., Nature, 348:552-554(1990)に記載の手法を用いて作製した抗体ファージライブラリーから単離できる。Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)は、ファージライブラリーを用いた

10

20

30

40

50

それぞれマウスおよびヒトの抗体の単離を報告している。その後の出版物は、チェーンシャフリングによる高親和性（ $nM$ 範囲）のヒト抗体の産生（Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)）ならびに極めて大型のファージライブラリーを構築するためのストラテジとしてのコンビナトリアル感染およびインビボ組換え（Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)）を報告している。すなわち、これらの手法は、モノクローナル抗体の単離のための従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ手法の実行可能な代替法である。

#### 【0482】

抗体をコードするDNAは、例えば、相同なマウス配列に対してヒトの重鎖および軽鎖の定常ドメイン（ $C_H$ および $C_L$ ）配列を置換することにより（米国特許第4,816,567号；およびMorrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)）、または非免疫グロブリンポリペプチド（異種ポリペプチド）に対するコード配列の全部または一部に免疫グロブリンコード配列を融合することにより、キメラ抗体または融合抗体のポリペプチドが産生されるように改変され得る。非免疫グロブリンポリペプチド配列は、抗体の定常ドメインに対して置換することができるか、または抗体の1つの抗原複合化部位の変域ドメインに対して置換されることにより、抗原に対する特異性を有する1つの抗原複合化部位および異なる抗原に対する特異性を有する別の抗原複合化部位を含むキメラ2価抗体が生成される。

#### 【0483】

##### 3. ヒト抗体およびヒト化抗体

本発明の抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体にはさらに、ヒト化抗体またはヒト抗体が含まれ得る。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化型は、非ヒト免疫グロブリンから得られる最小配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント（例えば、 $F_v$ 、 $Fab$ 、 $Fab'$ 、 $F(ab')_2$ または抗体の他の抗原結合サブ配列）である。ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシビエント抗体）を包含し、これにおいては、レシビエントの相補性決定領域（ $CDR$ ）に由来する残基が所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種（例えば、マウス、ラットまたはウサギ）（ドナー抗体）の $CDR$ に由来する残基で置き換えられている。一部の場においては、ヒト免疫グロブリンの $F_v$ フレームワーク残基は、対応する非ヒト残基により置き換えられている。ヒト化抗体はまた、レシビエント抗体および移入された $CDR$ 配列またはフレームワーク配列のいずれにも存在しない残基を含んでよい。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、代表的には2つの変域ドメインの実質的にすべてを含み、これにおいては、 $CDR$ 領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのそれに相当し、そして $FR$ 領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のそれである。ヒト化抗体はまた、必要に応じてさらに免疫グロブリン定常領域（ $Fc$ ）の少なくとも一部分、代表的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部分を含む [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986) ; Riechmann et al., Nature, 332

10

20

30

40

50

: 323 - 329 (1988); および Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593 - 596 (1992) ]。

【0484】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである起源からそれに導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「移入」残基と呼ばれ、これらは、代表的には、「移入」可変ドメインに由来する。ヒト化は、本質的には、げっ歯類のCDRまたはCDR配列とヒト抗体の対応する配列を置換することにより、Winterおよび共同研究者らの方法に従って実施することができる (Jones et al. Nature, 321: 522 - 525 (1986); Riechmann et al. Nature, 332: 323 - 327 (1988); Verhoeyen et al. Science, 239: 1534 - 1536 (1988)) に従って実施することができる。したがって、そのような「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ない部分が非ヒト種由来の対応する配列により置換されているキメラ抗体 (米国特許第4, 816, 567号) である。実際、ヒト化抗体は、代表的には、一部のCDR残基および恐らくは、一部のFR残基が、げっ歯類抗体における類似の部位に由来する残基により置換されているヒト抗体である。

10

【0485】

ヒト化抗体の作製において使用される軽鎖および重鎖の両方のヒト可変ドメインの選択は、抗体がヒトの治療上の使用を意図している場合は、抗原性およびHAMAs (ヒト抗マウス抗体) 応答を低減するために極めて重要である。いわゆる「ベストフィット」法にしたがって、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングする。げっ歯類のものに最も近似しているヒトVドメイン配列を同定し、そして、その内部にあるヒトフレームワーク領域 (FR) をヒト化抗体として許容する (Sims et al. J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia et al. J. Mol. Biol., 196: 901 (1987))。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列から得られる特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークがいくつかの異なるヒト化抗体に対して使用され得る (Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta et al. J. Immunol., 151: 2623 (1993))。

20

30

【0486】

抗原に対する高い結合親和性および他の望ましい生物学的特性を保持しながら抗体をヒト化させることがさらに重要である。この目標を達成するために、好ましい方法にしたがって、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを用いて、親配列および様々な概念的ヒト化産物の分析のプロセスにより、ヒト化抗体が調製される。三次元の免疫グロブリンモデルは、一般に入手可能であり、当業者によく知られているものである。選択された候補免疫グロブリン配列の推定三次元コンホメーション構造を図画し、表示するコンピュータプログラムが利用できる。これらの表示を精査することにより、候補免疫グロブリン配列が機能する際の残基の推定される役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響する残基の分析が可能になる。このようにして、FR残基を、レシピエントおよび移入配列から、選択して組み合わせることができ、その結果、所望の抗体特性 (例えば、標的抗原に対して増大した親和性) が達成される。一般に、超可変領域残基が、抗原結合への影響において、直接、そして最も実質的に関与する。

40

【0487】

ヒト化抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO15

50



50、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体の様々な形態が想定される。例えば、ヒト化抗体は、抗体フラグメント（例えば、Fab）であり得、これは、必要に応じて、免疫複合体を形成するために1個以上の細胞傷害性薬剤と結合体化される。あるいは、ヒト化抗体は、インタクトな抗体（例えば、インタクトなIgG1抗体）であり得る。

10

## 【0488】

ヒト化の代替として、ヒト抗体が作製され得る。例えば、内因性免疫グロブリン産生のない状況下においてヒト抗体の完全なレパートリーを免疫により産生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を作製することが現在可能である。例えば、キメラマウスおよび生殖細胞系変異マウスにおける抗体重鎖連結領域（J<sub>H</sub>）遺伝子のホモ接合性の欠失が、内因性の抗体産生の完全な抑制をもたらすことが報告されている。ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイをそのような生殖細胞系変異マウスへの移入することは、抗原チャレンジ時のヒト抗体の産生をもたらすことになる。例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993); 米国特許第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,591,669号（すべてGenPharm）；同第5,545,807号；およびWO97/17852を参照のこと。

20

## 【0489】

あるいは、ファージディスプレイ技術（McCafferty et al., Nature 348: 552-553 [1990]）を用いることにより、免疫されていないドナー由来の免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリーからヒト抗体およびヒト抗体フラグメントをインビトロで作製することができる。この手法によれば、抗体Vドメイン遺伝子を糸状バクテリオファージ（例えば、M13またはfd）の主要なまたは副次的なコートタンパク質遺伝子のいずれかにインフレームでクローニングし、ファージ粒子の表面上の機能的抗体フラグメントとしてディスプレイさせる。糸状粒子は、ファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むため、抗体の機能的特性に基づいた選択もまた、これらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択をもたらす。すなわち、ファージは、B細胞の特性の一部を模倣する。ファージディスプレイは、例えば、Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology, 3: 564-571 (1993)において概説されている種々の形式で実施できる。V遺伝子セグメントのいくつかの起源をファージディスプレイのために使用できる。Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)では、免疫したマウスの脾臓から得られたV遺伝子の小型のランダムなコンビナトリアルライブラリーから抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。免疫されていないヒトドナー由来のV遺伝子のレパートリーを構築することができ、そして抗原の多様なアレイ（自己抗原を含む）に対する抗体を、Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)またはGriffith et al., EMBO J. 12: 725-734 (1993)により記載された手法に本質的に従って単離することができる。米国特許第5,565,332号および同第5,573,905号も参照のこと。

30

40

## 【0490】

上記したように、ヒト抗体はまた、インビトロでの活性化されたB細胞により作製され

50

得る（米国特許第 5, 567, 610 号および同第 5, 229, 275 号を参照のこと）。

#### 4. 抗体フラグメント

特定の状況において、抗体全体ではなく、抗体フラグメントを使用するほうが有利である。より小さいサイズのフラグメントは、迅速なクリアランスを可能にし、そして固形腫瘍への向上した到達をもたらし得る。

##### 【0491】

抗体フラグメントの作製のための様々な手法が開発されている。伝統的には、これらのフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解的消化を介して得ていた（例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); および Brennan et al., Science, 229:81 (1985) を参照のこと）。しかしながら、これらのフラグメントは、現在、組換え宿主細胞により直接作製することができる。Fab、Fv および ScFv 抗体フラグメントはすべて、E. coli において発現させ、これより分泌させることができ、これにより、大量のこれらのフラグメントを効率的に産生できる。抗体フラグメントは、上記した抗体ファージライブラリーから単離できる。あるいは、Fab'-SH フラグメントを直接、E. coli から回収し、化学的に結合して F(ab')<sub>2</sub> フラグメントを形成することができる（Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)）。別の方法によれば、F(ab')<sub>2</sub> フラグメントは、組換え宿主細胞培養物から直接単離できる。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含むインビボ半減期が延長した Fab および F(ab')<sub>2</sub> フラグメントは、米国特許第 5, 869, 046 号に記載されている。抗体フラグメントの産生のための他の手法は、当業者に明らかである。選択された抗体は、一本鎖 Fv フラグメント (scFv) である。WO93/16185; 米国特許第 5, 571, 894 号; および米国特許第 5, 587, 458 号を参照のこと。Fv および scFv は、定常領域を欠いたインタクトな複合化部位を有する唯一の種であり; すなわち、それらは、インビボにおいて使用する間の低い非特異的結合に適している。scFv 融合タンパク質を構築することにより、scFv のアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかにエフェクタータンパク質を融合させてよい。Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 前出を参照のこと。抗体フラグメントはまた、例えば、米国特許第 5, 641, 870 号に記載の「線状抗体」であってもよい。そのような線状抗体フラグメントは、単一特異性または二重特異性であり得る。

##### 【0492】

#### 5. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも 2 つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異的抗体は、本明細書中に記載される PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくは PRO85161 タンパク質の 2 つの異なるエピトープに結合することができる。他のそのような抗体は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155

、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161結合部位を、別のタンパク質についての結合部位と組み合わせることができる。あるいは、PRO226-、PRO257-、PRO268-、PRO290-、PRO36006-、PRO363-、PRO365-、PRO382-、PRO444-、PRO705-、PRO1071-、PRO1125-、PRO1134-、PRO1155-、PRO1281-、PRO1343-、PRO1379-、PRO1380-、PRO1387-、PRO1419-、PRO1433-、PRO1474-、PRO1550-、PRO1571-、PRO1572-、PRO1759-、PRO1904-、PRO35193-、PRO4341-、PRO4348-、PRO4369-、PRO4381-、PRO4407-、PRO4425-、PRO4985-、PRO4989-、PRO5737-、PRO5800-、PRO5993-、PRO6017-、PRO7174-、PRO9744-、PRO9821-、PRO9852-、PRO9873-、PRO10196-、PRO34778-、PRO20233-、PRO21956-、PRO57290-、PRO38465-、PRO38683-、もしくはPRO85161-を発現している細胞に対して細胞性の防御機構を集中させ、そして局在化させるために、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161アームを、T細胞受容体分子のような白血球上の誘引分子(trigging molecule)(例えば、CD3)、またはIgGについてのFc受容体(FcR)(例えば、FcRI(CD64)、FcRII(CD32)、およびFcRIII(CD16))に結合するアームと組み合わせることができる。二重特異的抗体はまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを発現する細胞に対して、細胞毒性薬を局在化させるためにも使用することができる。

これらの抗体は、PRO226 -、PRO257 -、PRO268 -、PRO290 -、PRO36006 -、PRO363 -、PRO365 -、PRO382 -、PRO444 -、PRO705 -、PRO1071 -、PRO1125 -、PRO1134 -、PRO1155 -、PRO1281 -、PRO1343 -、PRO1379 -、PRO1380 -、PRO1387 -、PRO1419 -、PRO1433 -、PRO1474 -、PRO1550 -、PRO1571 -、PRO1572 -、PRO1759 -、PRO1904 -、PRO35193 -、PRO4341 -、PRO4348 -、PRO4369 -、PRO4381 -、PRO4407 -、PRO4425 -、PRO4985 -、PRO4989 -、PRO5737 -、PRO5800 -、PRO5993 -、PRO6017 -、PRO7174 -、PRO9744 -、PRO9821 -、PRO9852 -、PRO9873 -、PRO10196 -、PRO34778 -、PRO20233 -、PRO21956 -、PRO57290 -、PRO38465 -、PRO38683 -、もしくはPRO85161 - 結合アームと、細胞毒性薬（例えば、サボリン、抗インターフェロン -、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセート、または放射性同位体ハプテン）に結合するアームを有している。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体フラグメント（例えば、F(ab')<sub>2</sub> 二重特異性抗体）として調製できる。

#### 【0493】

WO96/16673は、二重特異性抗Erbb2 / 抗FcRIII抗体を記載しており、そして米国特許第5,837,234号は、二重特異性抗Erbb2 / 抗FcRI抗体を開示している。二重特異性抗Erbb2 / Fc抗体は、WO98/02463に示されている。米国特許第5,821,377号は、二重特異性抗Erbb2 / 抗CD3抗体を教示している。

#### 【0494】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当該分野で公知である。完全長二重特異性抗体の従来の調製は、2つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の同時発現に基づいており、その場合、2つの鎖は、異なる特異性を有する(Millstein et al., Nature 305:537-539 (1983))。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな取合せに起因して、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、そのうちわずか1種のみが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティクロマトグラフィ工程により行われる正しい分子の精製は、かなり面倒であり、そして生成物収率は、低い。同様の手順がWO93/08829およびTraunecker et al., EMBO J, 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

#### 【0495】

異なる方法によれば、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗体 - 抗原複合化部位)を、免疫グロブリンの定常ドメイン配列に融合させる。好ましくは、融合は、少なくとも一部のヒンジ、C<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3領域を含むIg重鎖定常ドメインと行う。融合物の少なくとも1つにおいて存在する、軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域(C<sub>H</sub>1)を有することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合物、および所望であれば、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクターに挿入し安定な宿主細胞に同時トランスフェクトする。これにより、構築において使用した3種のポリペプチド鎖の等しくない比率が、所望の二重特異性抗体の最適な収率をもたらす場合、その3種のポリペプチドフラグメントの相互の割合を調節する際に多大な柔軟性をもたらされる。しかしながら、等しい比率における少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高収率をもたらす場合、または比率が所望の鎖の組み合わせの収率に有意に影響しない場合は、単一の発現ベクター内に2つまたは3つすべてのポリペプチド鎖に関するコード配列を挿入することが可能である。

#### 【0496】

本発明は、一方のアームにおける第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖および他方のアームにおけるハイブリッド免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対(第2の結

10

20

30

40

50

合特異性をもたらす)から構成される二重特異性抗体を提供する。この非対称の構造は、二重特異性分子の片方にのみ免疫グロブリン鎖が存在することにより、分離の効率的な方法が提供されるため、望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせから所望の二重特異性化合物を分離することを容易にすることがわかっている。この方法は、WO 94/04690に開示されている。二重特異性抗体の作製のさらに詳細な説明は、例えば、Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)を参照のこと。

#### 【0497】

米国特許第5,731,168号に記載の別の方法によれば、抗体分子対の間の界面を操作することにより、組換え細胞培養から回収されるヘテロ2量体の割合を最大限にすることができる。好ましい界面は、C<sub>H</sub>3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法において、第1の抗体分子の界面に由来する1つ以上の小型アミノ酸側鎖をより大きい鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)で置き換える。大型の側鎖と同一または同様のサイズの代償的な「空洞」が、大型のアミノ酸側鎖をより小さいもの(例えば、アラニンまたはスレオニン)と置き換えることによって第2の抗体分子の界面上に形成される。これは、ホモ2量体などの他の望ましくない最終生成物よりもヘテロ2量体の収率を増大させるための機序を提供する。

#### 【0498】

二重特異性抗体は、架橋結合された抗体または「ヘテロ結合体」抗体を含む。例えば、ヘテロ結合体における抗体の一方をアビジンに、そして他方をビオチンに結合することができる。このような抗体は、例えば、望ましくない細胞に免疫系細胞をターゲティングするため(米国特許第4,676,980号)およびHIV感染の処置のため(WO 91/00360、WO 92/200373およびEP 03089)に提案されている。ヘテロ結合体抗体は、任意の好都合な架橋結合法を用いて作製され得る。適当な架橋結合剤は、当該分野で周知であり、そして多くの架橋結合の手法と共に米国特許第4,676,980号に開示されている。

#### 【0499】

抗体フラグメントから二重特異性抗体を作製するための手法もまた、文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、キメラ連結を用いて調製できる。Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)は、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを作製するためにインタクトな抗体をタンパク質分解的に切断する手順を記載している。これらのフラグメントをジチオール複合体形成剤、亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元することにより、隣接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィドの形成を妨害する。次に、形成されたF(ab')<sub>2</sub>フラグメントをチオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換する。次に、F(ab')<sub>2</sub>-TNB誘導体の1つを、メルカプトエチルアミンで還元することによりF(ab')<sub>2</sub>-チオールに再変換し、等モル量の他のF(ab')<sub>2</sub>-TNB誘導体と混合することにより、二重特異性抗体が形成される。生成した二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための試薬として使用できる。

#### 【0500】

最近の進歩により、化学的に結合することにより二重特異性抗体を形成することができる。EcoliからのF(ab')<sub>2</sub>-SHフラグメントの直接の回収が容易になった。Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992)は、完全にヒト化された二重特異性抗体F(ab')<sub>2</sub>分子の作製を記載している。各F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを別個にEcoliから分泌させ、インビトロの指向性化学カップリングに供することにより、二重特異性抗体が作製される。このようにして形成された二重特異性抗体は、Erbb2レセプターを過剰発現する細胞および正常ヒトT細胞に結合することができ、同時にヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性をトリガーすることができた。組換え細胞培養物から直接、二重特異性抗体フラグメントを作製して単離する様々な手法も報告されている。例えば、二重特異性抗体を、ロイシンジッパーを用いて調製する。Kostelny et al., *J. Immunol.* 14

10

20

30

40

50

8 ( 5 ) : 1 5 4 7 - 1 5 5 3 ( 1 9 9 2 ) 。 F o s および J u n タンパク質由来のロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合により 2 種の異なる抗体の F a b ' 部分に連結した。その抗体のホモ 2 量体を、ヒンジ領域で還元することによりモノマーを形成し、次に、再び酸化して抗体ヘテロ 2 量体を形成させた。この方法はまた、抗体ホモ 2 量体の調製にも利用できる。H o l l i n g e r e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 0 : 6 4 4 4 - 6 4 4 8 ( 1 9 9 3 ) に記載の「ダイアボディ」手法は、二重特異性抗体フラグメントを作製するための代替機序を提供している。そのフラグメントは、同じ鎖の 2 ドメイン間の対形成を可能とするには、短すぎるリンカーによって V<sub>L</sub> に連結された V<sub>H</sub> を含む。したがって、1 つのフラグメントの V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインが別のフラグメントの相補的な V<sub>L</sub> ドメインおよび V<sub>H</sub> ドメインに強制的に対形成させられ、これにより 2 つの抗原結合部位が形成される。一本鎖 F v ( s F v ) 2 量体の使用による二重特異性抗体フラグメントを作製するための別のストラテジも報告されている。G r u b e r e t a l . , J . I m m u n o l . , 1 5 2 : 5 3 6 8 ( 1 9 9 4 ) を参照のこと。

#### 【 0 5 0 1 】

2 価より多価の抗体も企図される。例えば、3 重特異性抗体が作製され得る。T u t t e t a l . , J . I m m u n o l . 1 4 7 : 6 0 ( 1 9 9 1 ) 。

#### 【 0 5 0 2 】

##### 6 . ヘテロ結合体抗体

ヘテロ結合体抗体もまた、本発明の範囲内に含まれる。ヘテロ結合体抗体は、2 つの共有結合した抗体から構成される。このような抗体は、例えば、望ましくない細胞に免疫系細胞をターゲティングするため [ 米国特許第 4 , 6 7 6 , 9 8 0 号 ] および H I V 感染の処置のため [ W O 9 1 / 0 0 3 6 0 、 W O 9 2 / 2 0 0 3 7 3 および E P 0 3 0 8 9 ] に提案されている。この抗体は、架橋結合剤を用いる方法を含む合成タンパク質化学における公知の方法を用いてインビトロで調製され得ると企図される。例えば、免疫トキシンは、ジスルフィド交換反応を用いて、またはチオエーテル結合の形成によって構築され得る。この目的に適した試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル - 4 - メルカプトブチルイミデートならびに例えば、米国特許第 4 , 6 7 6 , 9 8 0 号に開示されているものが挙げられる。

#### 【 0 5 0 3 】

##### 7 . 多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞によって、2 価抗体より急速に内部移行 ( および / または異化 ) され得る。本発明の抗体は、3 つ以上の抗原結合部位を有する多価抗体 ( I g M クラス以外である ) ( 例えば、4 価抗体 ) であり得、その抗体は、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に作製できる。多価抗体は、二量体化ドメインおよび 3 つ以上の抗原結合部位を含み得る。好ましい二量体化ドメインは、F c 領域またはヒンジ領域を含む ( またはそれからなる ) 。この設定において、その抗体は、F c 領域および F c 領域に対してアミノ末端側に 3 つ以上の抗原結合部位を含む。好ましい多価抗体は、本明細書中で 3 個 ~ 約 8 個、好ましくは、4 個の抗原結合部位を含む ( またはそれからなる ) 。多価抗体は、少なくとも 1 つのポリペプチド鎖 ( および好ましくは、2 つのポリペプチド鎖 ) を含み、ここでそのポリペプチド鎖は、2 つ以上の可変ドメインを含む。例えば、そのポリペプチド鎖は、V D 1 - ( X 1 )<sub>n</sub> - V D 2 - ( X 2 )<sub>n</sub> - F c を含み得、式中、V D 1 は、第 1 の可変ドメイン、V D 2 は、第 2 の可変ドメイン、F c は、F c 領域の 1 つのポリペプチド鎖であり、X 1 および X 2 は、アミノ酸またはポリペプチドを示し、n は、0 または 1 である。例えば、そのポリペプチド鎖は、V H - C H 1 - 柔軟なリンカー - V H - C H 1 - F c 領域鎖 ; または V H - C H 1 - V H - C H 1 - F c 領域鎖を含み得る。本明細書中の多価抗体は、好ましくは、さらに少なくとも 2 つ ( 好ましくは、4 つ ) の軽鎖可変ドメインポリペプチドを含む。本明細書中の多価抗体は、例えば、約 2 個 ~ 約 8 個の軽鎖可変ドメインポリペプチドを含み得る。本明細書において企図される軽鎖可変ドメインポリペプチドは、軽鎖可変ドメインを含み、そし

10

20

30

40

50

て必要に応じて、さらにC Lドメインを含む。

#### 【0504】

##### 8. エフェクター機能の操作

例えば、抗体の抗原依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害(CDC)を増強するために、エフェクター機能に関して本発明の抗体を改変することが望ましい場合がある。これは、1つ以上アミノ酸置換を抗体のFc領域に導入することにより達成され得る。代替または追加として、システイン残基をFc領域に導入することにより、この領域における鎖間のジスルフィド結合の形成が可能とされ得る。このように作製されたホモ2量体抗体は、向上した内部移行能力ならびに/または増大した補体媒介性細胞殺滅および抗体依存性細胞傷害(ADCC)を有し得る。Caron et al., J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) および Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992) を参照のこと。増強された抗腫瘍活性を有するホモ2量体抗体はまた、Wolff et al., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993) に記載されているように、ヘテロ2官能性架橋リンカーを用いて調製され得る。あるいは、二重のFc領域を有することから、増強された補体溶解およびADCC能力を有し得る抗体を作製することもできる。Stevenson et al., 抗Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989) を参照のこと。その抗体の血清中半減期を延長するために、例えば、米国特許第5,739,277号に記載されるように抗体(特に抗体フラグメント)中にサルベージレセプター結合エピトープを取り込んでよい。本明細書中で使用されるとき、用語「サルベージレセプター結合エピトープ」とは、IgG分子(例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> および IgG<sub>4</sub>)のインビボの血清中半減期を延長する原因となるIgG分子のFc領域のエピトープのことをいう。

#### 【0505】

##### 9. 免疫複合体

本発明はまた、細胞傷害性薬剤(例えば、化学療法剤、増殖阻害剤、トキシン(例えば、細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的に活性なトキシンまたはそのフラグメント)または放射性同位体(すなわち、放射性結合体)に結合体化された抗体を含む免疫複合体に関する。

#### 【0506】

このような免疫複合体の作製に有用な化学療法剤は、上記の通りである。使用され得る酵素的に活性なトキシンおよびそのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリアトキシンの非結合活性フラグメント、外毒素A鎖(Pseudomonas aeruginosa由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、Phytolacca americanaタンパク質(PAPI、PAPIIおよびPAP-S)、momordica charantiaインヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、sapaonarria officinalisインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)およびトリコテシン(tricothecene)が挙げられる。種々の放射性核種が、放射性結合体化抗体の作製のために使用できる。例としては、<sup>212</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>131</sup>In、<sup>90</sup>Yおよび<sup>186</sup>Reが挙げられる。抗体と細胞傷害性薬剤との結合体は、種々の2官能性タンパク質カップリング剤(例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ビリジルチオ)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの2官能性誘導体(例えば、ジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド(例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビスジアゾニウム誘導体(例えば、ビス(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば

、トリエン 2, 6 - ジイソシアネート) およびビス活性フッ素化合物 (例えば、1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼン) ) を用いて作製される。例えば、リシン免疫トキシンは、V i t e t t a e t a l . , S c i e n c e , 2 3 8 : 1 0 9 8 ( 1 9 8 7 ) に記載されているように調製され得る。炭素 - 1 4 - 標識 1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸 ( M X - D T P A ) は、抗体への放射性核種の結合体化のための例示的なキレート剤である。W O 9 4 / 1 1 0 2 6 を参照のこと。

#### 【0507】

抗体および 1 つ以上の低分子トキシン (例えば、カリケアマイシン、メイタンシノイド、トリコテシンおよび C C 1 0 6 5 ) およびトキシン活性を有するこれらの毒素の誘導体の結合体もまた本明細書中で企図される。

10

#### 【0508】

メイタンシンおよびメイタンシノイド

本発明により、1 つ以上のメイタンシノイド分子に結合させられた抗 P R O 2 2 6、抗 P R O 2 5 7、抗 P R O 2 6 8、抗 P R O 2 9 0、抗 P R O 3 6 0 0 6、抗 P R O 3 6 3、抗 P R O 3 6 5、抗 P R O 3 8 2、抗 P R O 4 4 4、抗 P R O 7 0 5、抗 P R O 1 0 7 1、抗 P R O 1 1 2 5、抗 P R O 1 1 3 4、抗 P R O 1 1 5 5、抗 P R O 1 2 8 1、抗 P R O 1 3 4 3、抗 P R O 1 3 7 9、抗 P R O 1 3 8 0、抗 P R O 1 3 8 7、抗 P R O 1 4 1 9、抗 P R O 1 4 3 3、抗 P R O 1 4 7 4、抗 P R O 1 5 5 0、抗 P R O 1 5 7 1、抗 P R O 1 5 7 2、抗 P R O 1 7 5 9、抗 P R O 1 9 0 4、抗 P R O 3 5 1 9 3、抗 P R O 4 3 4 1、抗 P R O 4 3 4 8、抗 P R O 4 3 6 9、抗 P R O 4 3 8 1、抗 P R O 4 4 0 7、抗 P R O 4 4 2 5、抗 P R O 4 9 8 5、抗 P R O 4 9 8 9、抗 P R O 5 7 3 7、抗 P R O 5 8 0 0、抗 P R O 5 9 9 3、抗 P R O 6 0 1 7、抗 P R O 7 1 7 4、抗 P R O 9 7 4 4、抗 P R O 9 8 2 1、抗 P R O 9 8 5 2、抗 P R O 9 8 7 3、抗 P R O 1 0 1 9 6、抗 P R O 3 4 7 7 8、抗 P R O 2 0 2 3 3、抗 P R O 2 1 9 5 6、抗 P R O 5 7 2 9 0、抗 P R O 3 8 4 6 5、抗 P R O 3 8 6 8 3、または抗 P R O 8 5 1 6 1 抗体 (全長または断片) が提供される。

20

#### 【0509】

メイタンシノイドは、チューブリン重合を抑制することにより機能する有糸分裂インヒビターである。メイタンシンは、東アフリカの低木である *Maytenus serrata* から最初に単離された (米国特許第 3, 8 9 6, 1 1 1 号)。その後、特定の微生物もまた、メイタンシノイド (例えば、メイタンシノールおよび C - 3 メイタンシノールエステル) を産生することが発見された (米国特許第 4, 1 5 1, 0 4 2 号)。合成のメイタンシノールならびにその誘導体およびアナログは、例えば、米国特許第 4, 1 3 7, 2 3 0 号; 同第 4, 2 4 8, 8 7 0 号; 同第 4, 2 5 6, 7 4 6 号; 同第 4, 2 6 0, 6 0 8 号; 同第 4, 2 6 5, 8 1 4 号; 同第 4, 2 9 4, 7 5 7 号; 同第 4, 3 0 7, 0 1 6 号; 同第 4, 3 0 8, 2 6 8 号; 同第 4, 3 0 8, 2 6 9 号; 同第 4, 3 0 9, 4 2 8 号; 同第 4, 3 1 3, 9 4 6 号; 同第 4, 3 1 5, 9 2 9 号; 同第 4, 3 1 7, 8 2 1 号; 同第 4, 3 2 2, 3 4 8 号; 同第 4, 3 3 1, 5 9 8 号; 同第 4, 3 6 1, 6 5 0 号; 同第 4, 3 6 4, 8 6 6 号; 同第 4, 4 2 4, 2 1 9 号; 同第 4, 4 5 0, 2 5 4 号; 同第 4, 3 6 2, 6 6 3 号; および同第 4, 3 7 1, 5 3 3 号に開示されており、これらの開示は、本明細書により、参考として明示的に援用される。

30

40

#### 【0510】

メイタンシノイド - 抗体結合体

その処置指標を向上させる試みにおいて、メイタンシンおよびメイタンシノイドは、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体に結合体化された。メイタンシノイドを含む免疫複合体およびその治療的用途は、例えば、米国特許第 5, 2 0 8, 0 2 0 号、同第 5, 4 1 6, 0 6 4 号および欧州特許 E P 0 4 2 5 2 3 5 B 1 (これらの開示は、本明細書により参考として明示的に援用される) に開示されている。L i u e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 3 : 8 6 1 8 - 8 6 2 3 ( 1 9 9 6 ) は、ヒト直

50



腸結腸癌に対して指向されたモノクローナル抗体C242に連結されたDM1と命名されたメイタンシノイドを含む免疫複合体を記載している。この結合体は、培養された結腸癌細胞に対しては、高度に細胞傷害性であることが見出され、そしてインビボの腫瘍生育アッセイにおいて抗腫瘍活性を示した。Charl et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992) は、ヒト結腸癌細胞株上の抗原に結合するマウス抗体A7に、またはHER-2/neu癌遺伝子に結合する別のマウスモノクローナル抗体TA.1にジスルフィドリンカーを介してメイタンシノイドを結合体化した免疫複合体を記載している。TA.1-メイタンシノイド結合体の細胞傷害性は、細胞当たり $3 \times 10^5$ のHER-2表面抗原を発現するヒト乳癌細胞株SK-BR-3に対してインビトロで試験された。薬剤結合体は、遊離メイタンシノイド薬剤と同様の細胞傷害性の程度を達成しており、これは、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増大させることにより増大させることができた。A7-メイタンシノイド結合体は、マウスにおいて低い全身性の細胞傷害性を示した。

10

#### 【0511】

抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体-メイタンシノイド結合体(免疫結合体)

20

抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体-メイタンシノイド結合体は、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO

30

40

50

20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体を、メイタンシノイド分子に対して、抗体またはメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性も有意には低下させることなく化学的に連結させることによって調製される。抗体分子当たり平均3～4個のメイタンシノイド分子を結合体化すると、抗体の機能または溶解性に悪影響を及ぼすことなく標的細胞の細胞傷害性を増強する場合に有効であることがわかっているが、1分子の毒素/抗体であっても、裸の抗体を使用したときよりも細胞傷害性を増強すると期待される。メイタンシノイドは、当該分野で周知であり、そして公知の手法により合成され得るか、または天然起源から単離され得る。適当なメイタンシノイドは、例えば、米国特許第5,208,020号ならびに上記した他の特許および特許でない出版物に開示されている。好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノールおよび芳香環において、またはメインタンシノール分子（例えば、様々なメインタンシノールエステル）の他の位置において改変されているメインタンシノールアナログである。

10

20

30

40

50

#### 【0512】

抗体-メイタンシノイド結合体を作製するための当該分野で公知の連結基が、多数存在し、それらとしては、例えば、米国特許第5,208,020号または欧州特許0425235B1ならびにChariet al., Cancer Research 52:127-131(1992)に開示されているものが挙げられる。連結基としては、上で特定した特許に開示されているような、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチダーゼ不安定性基、またはエステラーゼ不安定性基が挙げられるが、ジスルフィド基およびチオエーテル基が好ましい。

#### 【0513】

抗体とメイタンシノイドとの結合体は、種々の2官能性タンパク質カップリング剤（例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの2官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデートHCL）、活性エステル（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン）、ビスジアゾニウム誘導体（例えば、ビス(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート）およびビス活性フッ素化合物（例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン）を用いて作製され得る。特に好ましいカップリング剤としては、ジスルフィド結合を提供するためのN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート(SPDP)(Carlsson et al., Biochem. J., 173:723-737[1978])およびN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(SPP)が挙げられる。

#### 【0514】

リンカーは、連結の型に応じて様々な位置においてメイタンシノイド分子に結合され得る。例えば、エステル結合は、従来のカップリング手法を用いてヒドロキシル基との反応により形成され得る。この反応は、ヒドロキシル基を有するC3位、ヒドロキシメチルで改変されたC14位、ヒドロキシル基で改変されたC15位およびヒドロキシル基を有するC20位において起こり得る。連結は、メイタンシノールまたはメイタンシノールアナログのC3位において形成される。

#### 【0515】

##### カリケアマイシン

目的の別の免疫結合体には、1つ以上のカリケアマイシン分子に結合させられた抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、

抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーは、ピコモル以下の濃度において2本鎖DNA切断をもたらすことができる。カリケアマイシンファミリーの結合体の調製に 10  
関しては、米国特許第5,712,374号、同第5,714,586号、同第5,739,116号、同第5,767,285号、同第5,770,701号、同第5,770,710号、同第5,773,001号、同第5,877,296号を参照のこと(すべてAmerican Cyanamid Company)。使用され得るカリケアマイシンの構造アナログとしては、 $1^I$ 、 $2^I$ 、 $3^I$ 、N-アセチル- $1^I$ 、PSAGおよび $1^I$  (Himman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993)、Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)および上記したAmerican Cyanamidに対する米国特許)が挙げられるが、これらに限定されない。抗体を結合 20  
体化できる別の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシンおよびQFAは、両方とも細胞内の作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。したがって、抗体媒介性の内部移行を介したこれらの薬剤の細胞内取り込みは、その細胞傷害性作用を大きく増大させる。

#### 【0516】

##### 他の細胞傷害性薬剤

本発明の抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体に対して結合させることができる他の抗腫瘍薬としては、BCNU、ストレプトゾisin、ビンクリスチン、および5-フルオロウラシル、米国特許第5,053,394号、同第5,770,710号に記載されているまとめてLL-E33288 30  
複合体として知られている薬剤のファミリー、ならびに、エスペラマイシン(米国特許第5,877,296号)が挙げられる。

#### 【0517】

使用され得る酵素的に活性なトキシンおよびそのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖(Pseudomonas aeruginosa由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、アルファ-サルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンチンタンパク質、Phytolacca americanaタンパク質(PAPI、PAPIIおよびPAP-S)、momordica charantiaインヒビター、クルシン、クロチン、sapaonarria officinalisインヒビター、ゲロニン、マイトゲリン、 50

レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシンおよびトリコテシンが挙げられる。例えば、1993年10月28日に公開されたWO93/21232を参照のこと。

#### 【0518】

本発明はさらに、抗体と核溶解活性を有する化合物（例えば、リボヌクレアーゼまたはDNAエンドヌクレアーゼ（例えば、デオキシリボヌクレアーゼ；DNAse））との間に形成される免疫複合体を企図している。

#### 【0519】

腫瘍の選択的破壊のためには、抗体は、高度に放射性の原子を含んでよい。様々な放射性同位体を、放射性物質が結合させられた抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体の生産に利用することができる。例としては、 $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 、 $Pb^{212}$  および  $Lu$  の放射性同位体が挙げられる。診断のために結合体を使用する場合、その結合体は、シンチグラフィ試験用の放射性原子、例えば、 $tc^{99m}$  もしくは  $I^{123}$ 、または核磁気共鳴（NMR）イメージング（磁気共鳴イメージングMRIとしても公知の）要のスピン標識（例えば、ヨウ素-123、さらにヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガンまたは鉄）を含み得る。

#### 【0520】

放射標識または他の標識を、公知の方法で結合体に取り込ませてよい。例えば、水素の代わりにフッ素-19を含む適当なアミノ酸前駆体を用いて、ペプチドを生合成し得るか、またはアミノ酸化学合成法により合成し得る。標識（例えば、 $tc^{99m}$  または  $I^{123}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$  および  $In^{111}$ ）をペプチド内のシステイン残基を介して結合することができる。イットリウム-90は、リシン残基を介して結合できる。IOD OGEN法（Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57）を用いてヨウ素-123を取り込むことができる。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”（Chatall, CRC Press 1989）は、他の方法を詳細に説明している。

#### 【0521】

抗体と細胞傷害性薬剤との結合体は、種々の2官能性のタンパク質カップリング剤（例えば、N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルチオ）プロピオネート（SPDP）、スクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの2官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピデートHCL）、活性エステル（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えば、ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサジアミン）、ビスジアゾニウム誘導体（例えば、ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリエン2,6-ジイソシアネート）およびビス活性フッ素化合物（例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン）を用いて作製され得る。例えば、リシン免疫トキシンは、Vite

t t a e t a l . , S c i e n c e , 2 3 8 : 1 0 9 8 ( 1 9 8 7 ) に記載されているように調製され得る。炭素 - 1 4 - 標識 1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸 ( M X - D T P A ) は、抗体への放射性核種の結合体化のための例示的なキレート剤である。W O 9 4 / 1 1 0 2 6 を参照のこと。リンカーは、細胞内での細胞傷害性薬剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー ( C h a r i e t a l . , C a n c e r R e s e a r c h 5 2 : 1 2 7 - 1 3 1 ( 1 9 9 2 ) ; 米国特許第 5 , 2 0 8 , 0 2 0 号 ) が使用され得る。

#### 【 0 5 2 2 】

あるいは、抗 P R O 2 2 6、抗 P R O 2 5 7、抗 P R O 2 6 8、抗 P R O 2 9 0、抗 P R O 3 6 0 0 6、抗 P R O 3 6 3、抗 P R O 3 6 5、抗 P R O 3 8 2、抗 P R O 4 4 4、抗 P R O 7 0 5、抗 P R O 1 0 7 1、抗 P R O 1 1 2 5、抗 P R O 1 1 3 4、抗 P R O 1 1 5 5、抗 P R O 1 2 8 1、抗 P R O 1 3 4 3、抗 P R O 1 3 7 9、抗 P R O 1 3 8 0、抗 P R O 1 3 8 7、抗 P R O 1 4 1 9、抗 P R O 1 4 3 3、抗 P R O 1 4 7 4、抗 P R O 1 5 5 0、抗 P R O 1 5 7 1、抗 P R O 1 5 7 2、抗 P R O 1 7 5 9、抗 P R O 1 9 0 4、抗 P R O 3 5 1 9 3、抗 P R O 4 3 4 1、抗 P R O 4 3 4 8、抗 P R O 4 3 6 9、抗 P R O 4 3 8 1、抗 P R O 4 4 0 7、抗 P R O 4 4 2 5、抗 P R O 4 9 8 5、抗 P R O 4 9 8 9、抗 P R O 5 7 3 7、抗 P R O 5 8 0 0、抗 P R O 5 9 9 3、抗 P R O 6 0 1 7、抗 P R O 7 1 7 4、抗 P R O 9 7 4 4、抗 P R O 9 8 2 1、抗 P R O 9 8 5 2、抗 P R O 9 8 7 3、抗 P R O 1 0 1 9 6、抗 P R O 3 4 7 7 8、抗 P R O 2 0 2 3 3、抗 P R O 2 1 9 5 6、抗 P R O 5 7 2 9 0、抗 P R O 3 8 4 6 5、抗 P R O 3 8 6 8 3、または抗 P R O 8 5 1 6 1 抗体と、細胞毒性薬が含まれている融合タンパク質を、例えば、組み換え技術またはペプチド合成によって作成することができる。DNA の長さは、相互に隣接するか、または結合体の所望の特性を損なわないリンカーペプチドをコードする領域によって分離されている結合体の 2 つの部分にコードするそれぞれの領域を含み得る。

#### 【 0 5 2 3 】

本発明によれば、抗体 - レセプター結合体を患者に投与し、その後浄化剤を用いて循環系から未結合の結合体を除去し、次に細胞傷害性薬剤 (例えば、放射性ヌクレオチド) に結合体化された「リガンド」 (例えば、アビジン) を投与する、腫瘍の予備ターゲティングにおいて利用するための「レセプター」 (例えば、ストレプトアビジン) に抗体は結合体化され得る。

#### 【 0 5 2 4 】

##### 1 0 . 免疫リボソーム ( I m m u n o l i p o s o m e )

本明細書中に開示される抗 P R O 2 2 6、抗 P R O 2 5 7、抗 P R O 2 6 8、抗 P R O 2 9 0、抗 P R O 3 6 0 0 6、抗 P R O 3 6 3、抗 P R O 3 6 5、抗 P R O 3 8 2、抗 P R O 4 4 4、抗 P R O 7 0 5、抗 P R O 1 0 7 1、抗 P R O 1 1 2 5、抗 P R O 1 1 3 4、抗 P R O 1 1 5 5、抗 P R O 1 2 8 1、抗 P R O 1 3 4 3、抗 P R O 1 3 7 9、抗 P R O 1 3 8 0、抗 P R O 1 3 8 7、抗 P R O 1 4 1 9、抗 P R O 1 4 3 3、抗 P R O 1 4 7 4、抗 P R O 1 5 5 0、抗 P R O 1 5 7 1、抗 P R O 1 5 7 2、抗 P R O 1 7 5 9、抗 P R O 1 9 0 4、抗 P R O 3 5 1 9 3、抗 P R O 4 3 4 1、抗 P R O 4 3 4 8、抗 P R O 4 3 6 9、抗 P R O 4 3 8 1、抗 P R O 4 4 0 7、抗 P R O 4 4 2 5、抗 P R O 4 9 8 5、抗 P R O 4 9 8 9、抗 P R O 5 7 3 7、抗 P R O 5 8 0 0、抗 P R O 5 9 9 3、抗 P R O 6 0 1 7、抗 P R O 7 1 7 4、抗 P R O 9 7 4 4、抗 P R O 9 8 2 1、抗 P R O 9 8 5 2、抗 P R O 9 8 7 3、抗 P R O 1 0 1 9 6、抗 P R O 3 4 7 7 8、抗 P R O 2 0 2 3 3、抗 P R O 2 1 9 5 6、抗 P R O 5 7 2 9 0、抗 P R O 3 8 4 6 5、抗 P R O 3 8 6 8 3、もしくは抗 P R O 8 5 1 6 1 抗体はまた、免疫リボソームとして所望することもできる。

「リボソーム」は、哺乳動物における薬剤の送達のために有用な様々な型の脂質、リン脂質および / または界面活性剤から構成される小型のビヒクルである。リボソームの成分は、一般に、生物学的膜の脂質の配置と類似の二層形態で配置している。抗体を含むリボソ

10

20

30

40

50

ームは、例えば、Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); 米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号; および1997年10月23日に公開されたWO97/38731に記載されているような当該分野で公知の方法により調製される。長期の循環時間を有するリボソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

#### 【0525】

特に有用なリボソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を用いて逆相蒸発法により作製することができる。リボソームを、所定の孔径のフィルターに通して押し出すことにより、所望の直径を有するリボソームが得られる。本発明の抗体のFab'フラグメントは、ジスルフィド相互交換反応によりMartin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)に記載されているようにリボソームに結合体化され得る。化学療法剤は、必要に応じてリボソーム内に含まれる。Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)を参照のこと。

#### 【0526】

##### 11. 抗体の薬学的組成物

本明細書中で同定されたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに特異的に結合する抗体、ならびに、本明細書中で先に開示されたスクリーニングアッセイによって同定された他の分子は、薬学的組成物の形態で様々な障害の処置のために投与することができる。

#### 【0527】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドが細胞内にあり、そして完全な抗体が阻害剤として使用される場合には、インターナライズ抗体(internalizing antibodies)が好ましい。しかしながら、リボフェクションまたはリボソームはまた、抗体または抗体フラグメントを細胞に送達するためにも使用できる。抗体フラグメントを用いる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最も小さい阻害性フラグメントが好ましい。例えば、抗体の可変領域の配列

に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持しているペプチド分子を設計できる。そのようなペプチドは、化学合成および/または組換えDNA技術による調製が可能である。例えば、Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893 (1993)を参照のこと。本明細書中の処方物はまた、処置すべき特定の適応症に必要な2つ以上の活性化化合物、好ましくは、相互に悪影響を及ぼさない補足的な活性を有するものを含み得る。あるいは、またはさらに、その組成物は、その機能を増強する薬剤（例えば、細胞傷害性薬剤、サイトカイン、化学療法剤または増殖阻害剤）を含み得る。このような分子は、意図する目的のために有効である量における組み合わせにおいて適宜存在する。

#### 【0528】

活性成分はまた、例えば、コアセルベーション法または界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミン微小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）中、またはマクロエマルジョン中に封入してもよい。このような手法は、前出のRemington's Pharmaceutical Sciencesに開示されている。

#### 【0529】

インビボ投与のために使用される処方物は、滅菌されていなければならない。これは、滅菌された濾過膜に通す濾過により容易に達成される。

#### 【0530】

徐放性処方物が調製され得る。徐放性処方物の適当な例としては、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスが挙げられ、そのようなマトリックスは、成形された物、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー（例えば、LUPRON DEPOT<sup>TM</sup>（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注射可能な微小球））およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは、100日間にわたる分子の放出を可能にするが、特定のヒドロゲルは、より短い時間にタンパク質を放出する。カプセル化抗体が身体内に長時間残存する場合、それらは、37の水分への曝露の結果として、変性するか凝集し、生物学的活性を消失するか、または免疫原性が変化する可能性がある。合理的な戦略は、関与する機序に応じて安定化のために工夫することができる。例えば、凝集の機序がチオ-ジスルフィド交換を介した分子間S-S結合の形成であることが発見されれば、スルフィドリル残基の改変、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加物の使用および特定のポリマーマトリックス組成物の開発によって安定化が達成され得る。

#### 【0531】

G. 抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873

、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体の使用

本発明の抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体は、神経障害；心臓血管、内皮もしくは血管形成の障害；免疫障害；腫瘍学的障害；骨代謝の異常もしくは障害；胚発達障害もしくは胚性致死、または代謝障害について、様々な治療的用途および／または診断的用途を有している。例えば、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161についての診断アッセイにおいて（例えば、特異的な細胞、組織、または血清の中でのその発現（およびいくつかの場合には、ディファレンシャルな発現）を検出することにおいて）使用することができる。当該分野で公知の様々な診断アッセイの手法、例えば、競合的結合アッセイ、直接または間接のサンドイッチアッセイおよび不均質または均質な相のいずれかにおいて行う免疫沈降アッセイが使用され得る[Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147 - 158]。診断アッセイにおいて使用される抗体は、検出可能な部分で標識できる。その検出可能な部分は、直接的または間接的に検出可能なシグナルを生成することができるものでなければならない。例えば、その検出可能な部分は、放射

10

20

30

40

50



性同位体（例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^{125}\text{I}$ ）、蛍光または化学発光化合物（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミンまたはルシフェリン）または酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ）であり得る。その検出可能な部分に抗体を結合体化するための当該分野で公知の任意の方法（Hunter et al., Nature, 144: 945 (1962); David et al., Biochemistry, 13: 1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40: 219 (1981); および Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30: 407 (1982) に記載されているものを含む）を使用し得る。

【0532】

抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683、もしくは抗PRO85161抗体はまた、組み換え細胞培養物、または自然界に存在している供給源からのPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドの親和性による精製にも有用である。この過程においては、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドに対する抗体が、当該分野で周知の方法を使用して適切な支持体（例えば、Sephadex樹脂または濾紙）上に固定される。その後、固定された抗体は、精製されるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、

10

20

30

40

50

PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドが含まれている試料と接触させられ、その後、支持体が、固定された抗体に結合させられたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを除く、試料中の実質的に全ての材料を除去するであろう適切な溶媒で洗浄される。最後に、支持体は、抗体からPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683、もしくはPRO85161ポリペプチドを放出するであろう別の適切な溶媒で洗浄される。

#### 【0533】

以下の実施例は、説明のみを目的としており、本発明の範囲をいかなる面でも限定する意図はない。

#### 【0534】

本明細書中で引用したすべての特許および文献の参考資料は、その全体が本明細書により参考として援用される。

#### 【実施例】

#### 【0535】

実施例において言及される市販の試薬は、他に指示がない限り、製造者の指示書に従って使用した。以下の実施例において、また本明細書を通して、ATCCアクセッション番号によって同定される細胞の起源は、American Type Culture Collection, Manassas, VAである。

#### 【0536】

実施例1：新規のポリペプチドおよびそれらをコードするcDNAを同定するための細胞外ドメインホモロジースクリーニング

Swiss-Prot公的データベースからの約950個の既知の分泌タンパク質の細胞外ドメイン(ECD)配列(もしあれば、分泌シグナル配列を含む)を使用して、ES

10

20

30

40

50

Tデータベースを検索した。そのESTデータベースは、公的データベース（例えば、Dayhoff、GenBank）および企業のデータベース（例えば、LIFESEQ<sup>TM</sup>、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA）を含んでいた。検索は、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST-2（Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)）を使用して、ECDタンパク質配列の、EST配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70（またはいくつかの場合においては90）またはそれ以上の比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, WA）を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。

10

#### 【0537】

この細胞外ドメインホモロジースクリーニングを使用して、コンセンサスDNA配列を、phrapを使用して他の同定されているEST配列に対して構築した。さらに、得られたコンセンサスDNA配列を、しばしば（必ずしもそうではないが）BLASTまたはBLAST-2およびphrapの繰り返しサイクルを使用して、伸長することにより、上に記載したEST配列の起源を使用してできる限りコンセンサス配列を伸長した。

#### 【0538】

上に記載したように得られたコンセンサス配列に基づいて、次いでオリゴヌクレオチドを、目的の配列を含むcDNAライブラリーをPCRによって同定するためおよびPROポリペプチドについての完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するために合成し、使用した。順方向および逆方向PCRプライマーは、一般に20～30ヌクレオチドの範囲であり、約100～1000bp長のPCR産物が得られるように設計されることが多い。プローブ配列は、代表的には40～55bp長である。いくつかの場合において、コンセンサス配列が約1～1.5kbpより大きいとき、さらなるオリゴヌクレオチドを合成する。完全長クローンについていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のDNAを、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biologyのように、PCRプライマー対を用いてPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用して、プローブオリゴヌクレオチドおよびプライマー対の一方を用いて目的の遺伝子をコードするクローンを単離した。

20

30

#### 【0539】

cDNAクローンを単離するために使用したcDNAライブラリーを、Invitrogen, San Diego, CAの試薬などの市販の試薬を使用して標準的な方法によって構築した。cDNAを、NotI部位を含むオリゴdTをプライマーとして増幅し、SalI半リン酸化（hemikinased）アダプターに平滑末端で連結し、NotIで切断し、ゲル電気泳動によって適切にサイズ分離し、適当なクローニングベクター（例えば、pRKBまたはpRKD；pRK5Bは、SfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である；Holmes et al., Science, 253:1278-1280 (1991)）を参照のこと）に所定の方角で独特のXhoI部位およびNotI部位においてクローニングした。

40

#### 【0540】

実施例2：アミラーゼスクリーニングによるcDNAクローンの単離

##### 1. オリゴdTをプライマーとするcDNAライブラリーの調製

mRNAを、Invitrogen, San Diego, CA（Fast Track 2）の試薬およびプロトコルを使用して目的のヒト組織から単離した。このRNAを使用し、Life Technologies, Gaithersburg, MDの試薬（Super Script Plasmid System）およびプロトコルを使用して、ベクターpRK5Dに、オリゴdTをプライマーとするcDNAライブラリーを生成した。この手順において、二本鎖cDNAのうち、1000bpより大きいものを分離し

50

、S a l I / N o t I リンカー付加された c D N A を、X h o I / N o t I 切断されたベクターにクローニングした。p R K 5 D は、X h o I / N o t I c D N A クローニング部位の前に、s p 6 転写開始部位、S f i I 制限酵素部位の順でそれらを有するクローニングベクターである。

#### 【0541】

##### 2. ランダムプライマーをプライマーとする c D N A ライブラリーの調製

1 次 c D N A クローンの 5' 末端を優先的に表すために、2 次 c D N A ライブラリーを構築した。S p 6 R N A を 1 次ライブラリー（上記）から生成し、この R N A を使用し、L i f e T e c h n o l o g i e s の試薬（S u p e r S c r i p t P l a s m i d S y s t e m , 上を参照のこと）およびプロトコルを使用して、ランダムプライマーをプライマーとする c D N A ライブラリーをベクター p S S T - A M Y . 0 に構築した。この手順において、二本鎖 c D N A を、500 ~ 1000 b p に分離し、N o t I アダプターに平滑末端でリンカー付加し、S f i I で切断し、そして S f i I / N o t I で切断されたベクターにクローニングした。p S S T - A M Y . 0 は、c D N A クローニング部位およびマウスアミラーゼ配列の前に酵母アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター（分泌シグナルなしの成熟配列）、続いて、クローニング部位の後に酵母アルコールデヒドロゲナーゼターミネーターを有するクローニングベクターである。このようにして、アミラーゼ配列とインフレームで融合されたこのベクターにクローニングされた c D N A は、適切にトランスフェクトされた酵母コロニーからアミラーゼを分泌するようになる。

10

20

#### 【0542】

##### 3. 形質転換および検出

上の段落 2 に記載したライブラリー由来の D N A を氷上で冷やし、エレクトロコンピテント D H 10 B 細菌（L i f e T e c h n o l o g i e s , 20 mL）に加えた。次いで細菌およびベクター混合物を、製造者によって推奨されているように電気穿孔処理した。続いて、S O C 培地（L i f e T e c h n o l o g i e s , 1 mL）を加えて、混合物を 37 °C で 30 分間インキュベートした。次いで、形質転換体をアンピシリンを含む標準的な 150 mm L B プレート 20 枚に播き、16 時間インキュベートした（37 °C）。陽性のコロニーをプレートから拾い、その D N A を標準的なプロトコル、例えば、C s C l 勾配を使用して細菌のペレットから単離した。次いで、精製された D N A を以下の酵母プロトコルに用いた。

30

#### 【0543】

酵母法は、3 つのカテゴリーに分けられる：（1）プラスミド / c D N A 結合ベクターによる酵母の形質転換；（2）アミラーゼを分泌する酵母クローンの検出および単離；ならびに（3）酵母コロニーからの直接の挿入断片の P C R 増幅ならびに配列決定およびさらなる解析のためのその D N A の精製。

#### 【0544】

使用した酵母株は、H D 56 - 5 A（A T C C - 90785）であった。この株は、以下の遺伝子型：M A T アルファ、u r a 3 - 52、l e u 2 - 3、l e u 2 - 112、h i s 3 - 11、h i s 3 - 15、M A L<sup>+</sup>、S U C<sup>+</sup>、G A L<sup>+</sup>を有する。好ましくは、翻訳後経路を欠く酵母変異体が、使用され得る。このような変異体は、s e c 71、s e c 72、s e c 62 において転座不全（t r a n s l o c a t i o n d e f i c i e n t）対立遺伝子を有し得、切断された s e c 71 が最も好ましい。あるいは、これらの遺伝子の正常な作用を干渉するアンタゴニスト（アンチセンスヌクレオチドおよび / またはリガンドを含む）、この翻訳後経路に関連する他のタンパク質（例えば、S E C 61 p、S E C 72 p、S E C 62 p、S E C 63 p、T D J 1 p または S S A 1 p - 4 p）またはこれらのタンパク質の複合体形成物もまた、好ましくは、アミラーゼを発現する酵母と組み合わせて使用され得る。

40

#### 【0545】

形質転換は、G i e t z e t a l . , N u c l . A c i d . R e s . , 20 : 1425 (1992) によって概説されているプロトコルに基づいて行われた。次いで、形質

50

転換された細胞を寒天からYEPD複合培地ブロス(100mL)に接種し、30で一晚生育した。YEPDブロスを、Kaiser et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 207 (1994)に記載されているように調製した。次いで、一晚培養したものを、新鮮YEPDブロス(500mL)に約 $2 \times 10^6$ 細胞/mL(およそOD<sub>600</sub> = 0.1)に希釈し、 $1 \times 10^7$ 細胞/mL(およそOD<sub>600</sub> = 0.4 ~ 0.5)まで再び生育した。

#### 【0546】

次いで、細胞を回収し、形質転換に向けて調製し、GS3ローター瓶に移し、Sorval GS3ローターにて5,000rpmで5分間、遠心分離し、上清を廃棄し、次いで、滅菌水に再懸濁し、Beckman GS-6KR遠心機において、50mLファルコンチューブにて3,500rpmで再度遠心分離した。その上清を廃棄し、続いて細胞をLiAc/TE(10mL, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 7.5, 100mM Li<sub>2</sub>OOCCH<sub>3</sub>)で洗浄し、LiAc/TE(2.5mL)に再懸濁した。

10

#### 【0547】

微量遠心チューブ内で、調製した細胞(100μL)と、新たに変性された一本鎖サケ精巢DNA(Lofstrand Labs, Gaithersburg, MD)と形質転換DNA(1μg、10μL未満の体積)とを混合することによって形質転換を起こした。混合物をボルテックスにより手短に混合し、次いで、40%PEG/TE(600μL, 40%ポリエチレングリコール-4000, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 100mM Li<sub>2</sub>OOCCH<sub>3</sub>, pH 7.5)を加えた。この混合物を穏やかに混合し、30分間、撹拌しながら30でインキュベートした。次いで、細胞を15分間、42の熱ショックにかけ、反応容器を12,000rpmで5~10秒間微量遠心し、デカントし、そしてTE(500μL, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 7.5)に再懸濁した後、再度遠心分離した。次いで、細胞をTE(1mL)に希釈し、アリコート(200μL)を、150mm増殖プレート(VWR)に予め調製された選択培地に播いた。

20

#### 【0548】

あるいは、多数の少量反応の代わりに、形質転換を、単一の大規模反応を使用して実施し、ここで試薬の量は、それに合うようにスケールアップした。

30

#### 【0549】

使用した選択培地は、Kaiser et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 208-210 (1994)に記載されているように調製されたウラシルを欠く合成完全デキストロース寒天(SCD-Ura)であった。形質転換体を、30にて2~3日間生育した。

#### 【0550】

アミラーゼを分泌するコロニーの検出を、選択増殖培地中に赤デンブun(red starch)を含ませることによって行った。Biely et al., Anal. Biochem., 172:176-179 (1988)によって報告されている手順により、デンブunを赤色素(Reactive Red-120, Sigma)に結合させた。結合したデンブunを、最終濃度0.15%(w/v)でSCD-Ura寒天プレートに取り込ませ、リン酸カリウムを用いてpH 7.0(50~100mMの最終濃度)まで緩衝した。

40

#### 【0551】

十分に分離し、同定可能な単一のコロニーを得るために、陽性のコロニーを拾い、新鮮選択培地(150mmプレート上)に画線した。アミラーゼ分泌が陽性の十分に分離した単一のコロニーを、緩衝SCD-Ura寒天に赤デンブunを直接取り込むことによって検出した。陽性のコロニーを、デンブunを分解して、陽性のコロニーの周辺に直接可視化さ

50

れるクリアなハローを生じる能力によって判定した。

#### 【0552】

##### 4. PCR増幅によるDNAの単離

陽性のコロニーを単離したら、その一部をつま楊枝で拾い、96ウェルプレート内の滅菌水(30 $\mu$ L)に希釈した。このとき、陽性のコロニーを、凍結して次の解析のために保存するか、またはすぐに増幅した。細胞のアリコート(5 $\mu$ L)を、25 $\mu$ L容量中、以下：0.5 $\mu$ LのKlentaq(Clontech, Palo Alto, CA)；4.0 $\mu$ Lの10mM dNTP's(Perkin Elmer-Cetus)；2.5 $\mu$ LのKlentaq緩衝液(Clontech)；0.25 $\mu$ Lの順方向オリゴ1；0.25 $\mu$ Lの逆方向オリゴ2；12.5 $\mu$ Lの蒸留水を含むPCR反応用の鋳型として使用した。順方向オリゴヌクレオチド1の配列は：

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

逆方向オリゴヌクレオチド2の配列は：

5' - CAGGAACAGCTATGACCACTGCAACACCTGCAAAATCCATT - 3' (配列番号：108)

であった。

次いで、PCRを以下のとおりに行った：

- a. 変性 92、5分
- b. 変性 92、30秒  
アニーリング 59、30秒  
伸長 72、60秒を3サイクル
- c. 変性 92、30秒  
アニーリング 57、30秒  
伸長 72、60秒を3サイクル
- d. 変性 92、30秒  
アニーリング 55、30秒  
伸長 72、60秒を25サイクル
- e. 4 保持

オリゴヌクレオチドの下線を引いた領域を、それぞれ、ADHプロモーター領域およびアミラーゼ領域にアニーリングさせ、挿入断片が存在しないとき、ベクターpSST-AMY.0から307bpの領域を増幅した。代表的には、これらのオリゴヌクレオチドの5'末端の最初の18ヌクレオチドは、配列決定プライマー用のアニーリング部位を含んでいた。したがって、空のベクターからのPCR反応の総産物は、343bpであった。しかしながら、シグナル配列融合cDNAは、かなり長いヌクレオチド配列を生じた。

#### 【0553】

PCRの後、反応物(5 $\mu$ L)のアリコートを、Sambrook et al., 前出に記載されているようなTris-ホウ酸塩-EDTA(TBE)緩衝液系を使用した1%アガロースゲルのアガロースゲル電気泳動にかけた。400bpより長い単一の強力なPCR産物を生じたクローンを、96Qiaquick PCR精製カラム(Qiagen Inc., Chatsworth, CA)で精製後、DNA配列決定によってさらに解析した。

#### 【0554】

##### 実施例3：シグナルアルゴリズム解析を使用したcDNAクローンの単離

様々なポリペプチドをコードする核酸配列を、Genentech, Inc. (South San Francisco, CA)によって開発された、ESTに基づく企業のシグナル配列探索アルゴリズムを適用することによって同定するだけでなく、クラスター化し、公的データベース(例えば、GenBank)および/または企業データベース(LIFESeq(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA)からESTフラグメントを構築した。シグナル配列アル

10

20

30

40

50

ゴリズムは、問題の配列または配列フラグメントの 5' - 末端の第 1 および必要に応じて第 2 のメチオニンコドン (A T G) の周辺の DNA ヌクレオチドの特徴に基づいて分泌シグナルスコアを計算する。1 番目の A T G の後に続くヌクレオチドは、いかなる終止コドンも含まない、少なくとも 35 個の明白なアミノ酸をコードしなければならない。1 番目の A T G が、必要なアミノ酸を有する場合、2 番目の A T G は、試験されない。どちらもが必要条件を満たさない場合、候補配列は、スコア付けされない。E S T 配列が確実なシグナル配列を含むか否かを判定するために、A T G コドンの周辺の DNA および対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られている 7 つのセンサー (評価パラメータ) のセットを使用してスコア付けする。アルゴリズムの使用により、数多くのポリペプチドをコードする核酸配列が同定された。

10

**【0555】**

上記の実施例 1 ~ 3 に記載の技術を用い、数多くの完全長 cDNA クローンが、本明細書中に開示した PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683 または PRO85161 ポリペプチドをコードすると同定された。次いで、これらの cDNA を、以下の表 7 に示すように、ブダペスト条約に従って American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC) に寄託した。さらに、PRO36006 ポリペプチドをコードする DNA 225543 の配列を GenBank アクセッション番号 AF170484 から同定し; PRO1904 ポリペプチドをコードする DNA 82372 の配列を GenBank アクセッション番号 AB007454 から同定し; PRO35193 ポリペプチドをコードする DNA 225681 の配列を GenBank アクセッション番号 D14012 から同定し、PRO34778 ポリペプチドをコードする DNA 220432 の配列を GenBank アクセッション番号 AF369708 から同定し; PRO20233 ポリペプチドをコードする DNA 165608 の配列を GenBank アクセッション番号 AF286095 から同定し; PRO57290 ポリペプチドをコードする DNA 269238 の配列を GenBank アクセッション番号 AF326591 から同定し; PRO38465 ポリペプチドをコードする DNA 228002 の配列を GenBank アクセッション番号 AF412409 から同定し; PRO38683 ポリペプチドをコードする DNA 228199 の配列を GenBank アクセッション番号 AK024365 から同定し; そして PRO85161 ポリペプチドをコードする DNA 329632 の配列を GenBank アクセッション番号 AF479260 から同定した。

20

30

40

**【0556】**

【化 2 1】

表7

材料	ATCC寄託番号	寄託日	
DNA33460-1166	209376	1997年10月16日	
DNA35841-1173	209403	1997年10月17日	
DNA39427-1179	209395	1997年10月17日	
DNA35680-1212	209790	1998年4月21日	
DNA45419-1252	209616	1998年2月5日	
DNA46777-1253	209619	1998年2月5日	10
DNA45234-1277	209654	1998年3月5日	
DNA26846-1397	203406	1998年10月27日	
DNA50914-1289	209722	1998年3月31日	
DNA58847-1383	209879	1998年5月20日	
DNA60619-1482	209993	1998年6月16日	
DNA56865-1491	203022	1998年6月23日	
DNA59849-1504	209986	1998年6月16日	
DNA59820-1549	203129	1998年8月18日	
DNA66675-1587	203282	1998年9月22日	20
DNA59828-1608	203158	1998年8月25日	
DNA60740-1615	203456	1998年11月3日	
DNA68872-1620	203160	1998年8月25日	
DNA71290-1630	203275	1998年9月22日	
DNA71184-1634	203266	1998年9月22日	
DNA73739-1645	203270	1998年9月22日	
DNA76393-1664	203323	1998年10月6日	
DNA73730-1679	203320	1998年10月6日	
DNA73734-1680	203363	1998年10月20日	30
DNA76531-1701	203465	1998年11月17日	
DNA81761-2583	203862	1999年3月23日	

【 0 5 5 7 】



## 【化 2 2】

DNA92232-2589	203895	1999年3月30日	
DNA92289-2598	PTA-131	1999年5月25日	
DNA92225-2603	203950	1999年4月20日	
DNA92264-2616	203969	1999年4月27日	
DNA93011-2637	PTA-20	1999年5月4日	
DNA59770-2652	PTA-427	1999年7月27日	
DNA80135-2655	PTA-234	1999年6月15日	
DNA92929-2534-1	203586	1999年1月12日	10
DNA108912-2680	PTA-124	1999年5月25日	
DNA100276-2684	PTA-380	1999年7月20日	
DNA96860-2700	PTA-478	1999年8月3日	
DNA96883-2745	PTA-544	1999年8月17日	
DNA136110-2763	PTA-652	1999年9月14日	
DNA108725-2766	PTA-863	1999年10月19日	
DNA129332-2775	PTA-944	1999年11月9日	
DNA143076-2787	PTA-1028	1999年12月7日	
DNA144841-2816	PTA-1188	2000年1月11日	20
DNA178511-2986	PTA-2452	2000年9月12日	

特許手続上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約（ブダペスト条約）の規定に基づいてこれらの寄託を行った。これは、寄託日から30年間、寄託物の生存可能な培養物の維持を保証するものである。寄託物は、ブダペスト条約の規定に基づいてGene Tech, Inc. とATCCとの合意に従い、ATCCから入手可能であり、これは、どれが最初であろうとも、関連の米国特許の発行時または任意の米国または外国の特許出願の公開時に、寄託培養物の子孫が永久かつ無制限に入手可能であることを保証し、米国特許法第122条およびそれに従う特許庁長官規則（特に参照番号886OG638の37CFR第1.14条を含む）に従って権利を有すると米国商標特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

## 【0558】

本出願の譲受人は、適当な条件下で培養されていたときに、寄託された材料の培養物が、死滅または損失または破壊された場合、通知時に、その材料が迅速に同一の別のものに置き換えられることに同意する。寄託された材料の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

## 【0559】

実施例4：ヒトPRO226ポリペプチド[UNQ200]をコードするcDNAクローンの単離

コンセンサスDNA配列を、上の実施例1に記載したように他のEST配列に関してphrapを使用して構築した。

EGF様ホモログをコードするこの構築されたコンセンサス配列を本明細書中でDNA28744と特定する。

そのDNA28744コンセンサス配列に基づいて、1) 目的の配列を含むcDNAライブラリーをPCRによって同定するため、および2) PRO226についての完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。

## 【0560】

PCRプライマー（順方向および逆方向）を合成した：

10

20

30

40

50

順方向PCRプライマー(28744.f)(OLI556):

5'-ATTCTGCGTGAAACA CTGAGGGC-3'

(配列番号:109)

逆方向PCRプライマー(28744.r)(OLI557):

5'-ATCTGCTTGTAGCCCTCGGCAC-3'

(配列番号:110)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサスDNA28744配列から構築した:

ハイブリダイゼーションプローブ(28744.p)(OLI555):

5'-CCTGGCTATCAGCAGGTGGGCTCCAAGTGTCTCGATGTGGATGAGTGTGA-3' (配列番号:111)

完全長クローンの起源についていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のDNAを、下で同定されるPCRプライマーを用いたPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよびPCRプライマーの一方を使用して、PRO226遺伝子をコードするクローンを単離した。cDNAライブラリーを構築するためのRNAをヒト胎児肺組織から単離した。

#### 【0561】

上記のようにして単離された単離されたクローンのDNA配列決定により、DNA33460-1166の完全長DNA配列[図1、配列番号:1];およびPRO226の誘導タンパク質配列が得られた。

#### 【0562】

DNA33460-1166の全コード配列を、図1(配列番号:1)に示す。クローンDNA33460-1166は、ヌクレオチド62-64位の明らかな翻訳開始部位およびヌクレオチド1391-1393位の明らかな終止コドンを含む。予測されるポリペプチド前駆体は443アミノ酸長である。図2(配列番号2)に示す完全長PRO226配列の解析により、さまざまな重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、その重要なポリペプチドドメインについて与えられる位置は、上記のようによその位置である。図2に示す完全長PRO226ポリペプチドの解析により、以下:ほぼアミノ酸1~ほぼアミノ酸25にシグナルペプチド;ほぼアミノ酸198~ほぼアミノ酸202およびほぼアミノ酸394~ほぼアミノ酸398にN-グリコシル化部位;ほぼアミノ酸76~ほぼアミノ酸82、ほぼアミノ酸145~ほぼアミノ酸151、ほぼアミノ酸182~ほぼアミノ酸188、ほぼアミノ酸222~ほぼアミノ酸228、ほぼアミノ酸290~ほぼアミノ酸296、ほぼアミノ酸305~ほぼアミノ酸311、ほぼアミノ酸371~ほぼアミノ酸377およびほぼアミノ酸381~ほぼアミノ酸387にN-ミリスチル化部位;ならびにほぼアミノ酸140~ほぼアミノ酸152、ほぼアミノ酸177~ほぼアミノ酸189、ほぼアミノ酸217~ほぼアミノ酸229,およびほぼアミノ酸258~ほぼアミノ酸270にアスパラギン酸およびアスパラギンヒドロキシル化部位の存在が証明された。クローンDNA33460-1166は、1997年10月16日にATTCに寄託され、ATCC寄託番号209376が割り当てられている。

#### 【0563】

図2(配列番号:2)に示す完全長PRO226配列のBLASTおよびFastA配列アラインメント解析に基づき、EGF様ホモログDNA33460-1166は、HTタンパク質および/またはフィブリンとアミノ酸配列同一性を示す(それぞれ、49%および38%)。

#### 【0564】

実施例5:ヒトPRO257ポリペプチド[UNQ224]をコードするcDNAクローンの単離

コンセンサスDNA配列を、上の実施例1に記載したようにphrapを使用して他の

E S T 配列に関して構築した。このコンセンサス配列を本明細書中で D N A 2 8 7 3 1 と命名する。D N A 2 8 7 3 1 コンセンサス配列に基づいて、1) 目的の配列を含む c D N A ライブラリーを P C R によって同定するため、および 2) P R O 2 5 7 についての完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。

【0565】

P C R プライマーの対 ( 順方向および逆方向 ) を合成した :

順方向 P C R プライマー :

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

逆方向 P C R プライマー :

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

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサス配列から構築した :

ハイブリダイゼーションプローブ

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

完全長クローンの起源についていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来の D N A を、上で同定された P C R プライマーを用いた P C R 増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよび P C R プライマーの一方を使用して、P R O 2 5 7 遺伝子をコードするクローンを単離した。

【0566】

c D N A ライブラリーを構築するための R N A をヒト胎児腎臓組織から単離した。

【0567】

上で記載したように単離したクローンの D N A 配列決定により、P R O 2 5 7 [ 本明細書中で D N A 3 5 8 4 1 - 1 1 7 3 と命名する ( 図 3 ; 配列番号 3 ) ] に対する完全長 D N A 配列および P R O 2 5 7 に対して誘導タンパク質配列が得られた。

【0568】

D N A 3 5 8 4 1 - 1 1 7 3 のヌクレオチド配列全体を図 3 ( 配列番号 3 ) に示す。クローン D N A 3 5 8 4 1 - 1 1 7 3 は、ヌクレオチド 9 6 4 - 9 6 6 位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド 2 7 8 5 - 2 7 8 7 位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる ( 図 3 ) 。予測されるポリペプチド前駆体は、6 0 7 アミノ酸長である ( 図 4 ; 配列番号 4 ) 。クローン D N A 3 5 8 4 1 - 1 1 7 3 は、1 9 9 7 年 1 0 月 1 7 日に A T T C に寄託され、A T C C 寄託番号 A T C C 2 0 9 4 0 3 が割り当てられている。

【0569】

完全長 P R O 2 5 7 ポリペプチドのアミノ酸配列の解析から、その一部分がエブネリンタンパク質に対して有意な相同性を有することが示唆され、それにより、P R O 2 5 7 は、エブネリンタンパク質と関連する新規なタンパク質構成員であり得ることが示される。

【0570】

実施例 6 : ヒト P R O 2 6 8 ポリペプチド [ U N Q 2 3 5 ] をコードする c D N A クローンの単離

コンセンサス D N A 配列を、上の実施例 1 に記載したように他の E S T 配列に関して p h r a p を使用して構築した。このコンセンサス配列を本明細書中で D N A 3 5 6 9 8 と命名する。その D N A 3 5 6 9 8 コンセンサス配列に基づいて、1) 目的の配列を含む c D N A ライブラリーを P C R によって同定するため、および 2) P R O 2 6 8 についての完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。

【0571】

順方向および逆方向 P C R プライマーを合成した :

10

20

30

40

50

順方向 P C R プライマー 1 :

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

順方向 P C R プライマー 2 :

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

順方向 P C R プライマー 3 :

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

逆方向 P C R プライマー :

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

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサス DNA 3 5 6 9 8 配列から構築した：ハイブリダイゼーションプローブ

ハイブリダイゼーションプローブ

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

完全長クローンの起源についていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来の DNA を、上で同定された P C R プライマーを用いた P C R 増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよび P C R プライマーの一方を使用して、P R O 2 6 8 遺伝子をコードするクローンを単離した。

【 0 5 7 2 】

c D N A ライブラリーを構築するための R N A をヒト胎児肺組織から単離した。

【 0 5 7 3 】

上で記載したように単離したクローンの DNA 配列決定により、P R O 2 6 8 [ 本明細書中で DNA 3 0 4 2 7 - 1 1 7 9 と命名する ] (配列番号 5 ) に対する完全長 DNA 配列および P R O 2 6 8 に対して誘導タンパク質配列が得られた。

【 0 5 7 4 】

D N A 3 9 4 2 7 - 1 1 7 9 のヌクレオチド配列全体を図 5 (配列番号 5 ) に示す。クローン DNA 3 9 4 2 7 - 1 1 7 9 は、ヌクレオチド 1 3 - 1 5 位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド 8 5 3 - 8 5 5 位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる (図 5 )。予測されるポリペプチド前駆体は、2 8 0 アミノ酸長である (図 6 ; 配列番号 6 )。クローン DNA 3 9 4 2 7 - 1 1 7 9 ) は、1 9 9 7 年 1 0 月 1 7 日に A T T C に寄託され、A T C C 寄託番号 A T C C 2 0 9 3 9 5 が割り当てられている。

【 0 5 7 5 】

完全長 P R O 2 6 8 ポリペプチドのアミノ酸配列の解析から、これがタンパク質ジスルフィドイソメラーゼと有意な相同性を有することが示唆され、それにより、P R O 2 6 8 が新規なタンパク質ジスルフィドイソメラーゼであり得ることが示される。

【 0 5 7 6 】

実施例 7 : ヒト P R O 2 9 0 ポリペプチド [ U N Q 2 5 3 ] をコードする c D N A クローンの単離

発現配列タグ ( E S T ) DNA データベース ( L I F E S E Q (登録商標) , I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s , P a l o A l t o , C A ) を検索し、ページ 5 および F A N との相同性を示した E S T を同定した ( 1 3 7 0 1 4 1 , D N A 6 6 5 0 5 )。

次いで、同定された E S T 配列に基づくオリゴヌクレオチドプローブ合成し、完全長 c D N A クローンを同定する試みにおいてヒト胎児腎臓 c D N A ライブラリーをスクリーニングするために使用した。オリゴヌクレオチドプローブは、以下の配列 :

5' T G A C T G C A C T A C C C C G T G G C A A G C T G T T G A G C C A G C T C A G C T G 3' (配列番号 : 1 2 0 )

を有した。

【0577】

cDNAライブラリーを構築するためのRNAをヒト胎児副腎組織から単離した。ヒトPRO290をコードするcDNAクローンを単離するために使用したcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAの試薬などの市販の試薬を使用して標準的な方法によって構築した。cDNAを、NotI部位を含むオリゴdTをプライマーとして増幅し、SalI半リン酸化(hemikinased)アダプターに平滑末端で連結し、NotIで切断し、ゲル電気泳動によって適切にサイズ分離し、適当なクローニングベクター(例えば、pRKBまたはpRKD; pRK5Bは、SfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である; Holmes et al., Science, 253: 1278-1280 (1991))を参照のこと)に所定の方法で独特のXhoIおよびNotIにおいてクローニングした。

10

【0578】

C DNAクローンを同定し、全体を配列決定した。DNA35680-1212のヌクレオチド配列全体を図7(配列番号7)に示す。クローンDNA35680-1212は、ヌクレオチド293-295位の明らかな翻訳開始部位およびヌクレオチド3302-3304位の終止コドンを含む(図7; 配列番号: 7)。予測されるポリペプチド前駆体は、1003アミノ酸長である(図8; 配列番号8)。

20

【0579】

現在、PRO290ポリペプチドはFANおよび/またはベージュと関連していると考えられている。クローンDNA35680-1212は、1998年4月21日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209790が割り当てられている。寄託されたクローンは、本明細書に示した説明的なものではなく、実際には正確な配列を有することを理解されたい。図8に示される完全長PRO290タンパク質は、推定分子量が約112,013ダルトン、pIが約6.4である。

【0580】

実施例8: ヒトPRO363ポリペプチド[UNQ318]をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例1に記載のさまざまなEST配列に対するコンセンサス配列を得た。ここで、得られたコンセンサス配列を本明細書中でDNA42828と命名する。そのDNA42828コンセンサス配列に基づいて、1) 目的の配列を含むcDNAライブラリーをPCRによって同定するため、および2) PRO363に対する完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。

30

【0581】

PCRプライマー対(順方向および逆方向)を合成した:

順方向PCRプライマー(42828.f1): 5' - CCA GTG CAC AGC AGG CAA C GA AGC - 3' (配列番号: 121)

逆方向PCRプライマー(42828.r1):

5' - ACT AGG CTG TAT G C C T G G G T G G G C - 3' (配列番号: 121)

40

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサスDNA42828配列から構築した

ハイブリダイゼーションプローブ

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

完全長クローンの起源についていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のDNAを、上で同定されたPCRプライマー対を用いたPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよびPCRプライマーの一方を使用して、PRO363遺伝子をコードするクローンを単離した。cDNAライブラリーを構築するためのRNAをヒト胎児腎臓組

50

織から単離した ( L I B 2 2 7 ) 。

#### 【 0 5 8 2 】

上で記載したように単離したクローンの DNA 配列決定により、 P R O 3 6 3 [ 本明細書中で U N Q 3 1 8 ( D N A 4 5 4 1 9 - 1 2 5 2 ) と命名する ] ( 配列番号 1 1 ) に対する完全長 DNA 配列および P R O 3 6 3 に対して誘導タンパク質配列が得られた。

#### 【 0 5 8 3 】

U N Q 3 1 8 ( D N A 4 5 4 1 9 - 1 2 5 2 ) のヌクレオチド配列全体を図 1 1 ( 配列番号 1 1 ) に示す。クローン U N Q 3 1 8 ( D N A 4 5 4 1 9 - 1 2 5 2 ) は、ヌクレオチド 1 9 0 - 1 9 2 位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド 1 3 0 9 - 1 3 1 1 位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる ( 図 1 1 ) 。予測されるポリペプチド前駆体は、373 アミノ酸長である ( 図 1 2 ) 。図 1 2 に示される完全長 P R O 3 6 3 タンパク質は、推定分子量が約 4 1 , 2 8 1 ダルトン、p I が約 8 . 3 3 である。膜貫通ドメインが、図 1 2 ( 配列番号 : 1 2 ) に示すアミノ酸配列のアミノ酸 2 2 1 ~ 2 5 4 に存在する。P R O 3 6 3 ポリペプチドはまた、ほぼアミノ酸 1 5 ~ 5 6 およびほぼアミノ酸 8 7 ~ 1 1 6 の少なくとも 2 つのミエリン P 0 タンパク質ドメインを有する。クローン U N Q 3 1 8 ( D N A 4 5 4 1 9 - 1 2 5 2 ) は、1998 年 2 月 5 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 6 1 6 が割り当てられている。

#### 【 0 5 8 4 】

完全長 P R O 3 6 3 ポリペプチドのアミノ酸配列の解析から、これが細胞表面タンパク質 H C A R と有意な配列類似性を有することが示唆され、それにより、P R O 3 6 3 が新規な H C A R ホモログであり得ることが示される。より詳しくは、Dayhoff データベース ( バージョン 3 5 . 4 5 S w i s s P r o t 3 5 ) の解析により、P R O 3 6 3 アミノ酸配列と以下の Dayhoff 配列 H S 4 6 K D A \_ 1 、 H S U 9 0 7 1 6 \_ 1 、 M M C A R H \_ 1 、 M C A R H O M \_ 1 、 M M U 9 0 7 1 5 \_ 1 、 A 3 3 \_ H U M A N 、 P \_ W 1 4 1 4 6 、 P \_ W 1 4 1 5 8 、 A 4 2 6 3 2 および B 4 2 6 3 2 との間の有意な相同性が証明された。

#### 【 0 5 8 5 】

実施例 9 : ヒト P R O 3 6 5 ポリペプチド [ U N Q 3 2 0 ] をコードする c D N A クローンの単離

コンセンサス DNA 配列を、上の実施例 1 に記載したように他の E S T 配列に関して p h r a p を使用して構築した。このコンセンサス配列を本明細書中で D N A 3 5 6 1 3 と命名する。その D N A 3 5 6 1 3 コンセンサス配列に基づいて、1) 目的の配列を含む c D N A ライブラリーを P C R によって同定するため、および 2) P R O 3 6 5 に対する完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。

#### 【 0 5 8 6 】

順方向および逆方向 P C R プライマーを以下のように合成した :

順方向 P C R プライマー :

5 ' - A A T G T G A C C A C T G G A C T C C C - 3 ' ,

( 配列番号 : 1 2 4 )

順方向 P C R プライマー :

5 ' - A G G C T T G G A A C T C C C T T C - 3 ' ,

( 配列番号 : 1 2 5 )

逆方向 P C R プライマー :

5 ' - A A G A T T C T T G A G C G A T T C C A G C T G - 3 ' ,

( 配列番号 : 1 2 6 )

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサス DNA 3 5 6 1 3 配列から構築した : ハイブリダイゼーションプローブ

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

C A C A A G A C T G - 3 ' ,

( 配列番号 : 1 2 7 )

完全長クローンの起源についていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来の DNA を、上で同定された PCR プライマー対の一方を用いた PCR 増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよび PCR プライマーの一方を使用して、PRO365 遺伝子をコードするクローンを単離した。cDNA ライブラリーを構築するための RNA をヒト胎児腎臓組織から単離した。

【 0 5 8 7 】

上で記載したように単離したクローンの DNA 配列決定により、PRO365 [ 本明細書中で DNA 4 6 7 7 7 - 1 2 5 3 と命名する ] ( 配列番号 1 3 ) に対する完全長 DNA 配列および PRO365 に対して誘導タンパク質配列が得られた。

【 0 5 8 8 】

DNA 4 6 7 7 7 - 1 2 5 3 ) のヌクレオチド配列全体を図 1 3 ( 配列番号 1 3 ) に示す。クローン DNA 4 6 7 7 7 - 1 2 5 3 ) は、ヌクレオチド 1 5 - 1 7 位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド 7 2 0 - 7 2 2 位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる ( 図 1 3 ) 。予測されるポリペプチド前駆体は、2 3 5 アミノ酸長である ( 図 1 4 ; 配列番号 1 4 ) 。クローン DNA 4 6 7 7 7 - 1 2 5 3 にコードされるポリペプチド配列の重要な領域が同定され、これは、図 1 4 に示すように、以下 : アミノ酸 1 - 2 0 に相当するシグナルペプチド、アミノ酸 2 1 に相当する成熟タンパク質の開始点および多能性 N - グリコシル化部位を含む。クローン DNA 4 6 7 7 7 - 1 2 5 3 は、1 9 9 8 年 2 月 5 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 ATCC 2 0 9 6 1 9 が割り当てられている。

【 0 5 8 9 】

完全長 PRO365 ポリペプチドのアミノ酸配列の解析から、その一部分がヒト 2 - 1 9 タンパク質に対して有意な相同性を有することが示唆され、それにより、PRO365 は、新規なヒト 2 - 1 9 タンパク質ホモログであり得ることが示される。

【 0 5 9 0 】

実施例 1 0 : ヒト PRO382 ポリペプチド [ UNQ323 ] をコードする cDNA クローンの単離

上記の実施例 1 に記載のさまざまな EST 配列に対するコンセンサス配列を得た。ここで、得られたコンセンサス配列を本明細書中で DNA 3 0 8 9 2 と命名する。その DNA 3 0 8 9 2 コンセンサス配列に基づいて、1) 目的の配列を含む cDNA ライブラリーを PCR によって同定するため、および 2) PRO382 に対する完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。

【 0 5 9 1 】

PCR プライマー対 ( 順方向および逆方向 ) を合成した :

順方向 PCR プライマー :

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

逆方向 PCR プライマー :

5 ' - T A C A C G T C C C T G T G G T T G C A G A T C - 3 ' ( 配列番号 : 1 2 9 )

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサス DNA 3 0 8 9 2 配列から構築した

ハイブリダイゼーションプローブ

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

完全長クローンの起源についていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来の DNA を、上で同定された PCR プライマー対を用いた PCR 増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよび PCR プライマーの一方を使用して、PRO382 遺伝子をコードす

10

20

30

40

50

るクローンを単離した。cDNAライブラリーを構築するためのRNAをヒト胎児腎臓組織から単離した(LIB227)。

#### 【0592】

上で記載したように単離したクローンのDNA配列決定により、PRO382[本明細書中でUNQ323(DNA45234-1277)と命名する](配列番号15)に対する完全長DNA配列およびPRO382に対して誘導タンパク質配列が得られた。

#### 【0593】

UNQ323(DNA45234-1277)のヌクレオチド配列全体を図15(配列番号15)に示す。クローンUNQ323(DNA45234-1277)は、ヌクレオチド126-128位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド1485-1487位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる(図15)。予測されるポリペプチド前駆体は、453アミノ酸長である(図16;配列番号16)。図16に示される完全長PRO382タンパク質は、推定分子量が約49,334ダルトン、pIが約6.32である。図16(配列番号:16)に示す天然PRO382のアミノ酸配列の解析により、ほぼアミノ酸240~ほぼアミノ酸284に推定膜貫通ドメイン、ほぼアミノ酸1~ほぼアミノ酸20に推定シグナルペプチド、ほぼアミノ酸386~ほぼアミノ酸419に推定アップル(apple)ドメイン、ほぼアミノ酸394~ほぼアミノ酸406に推定Kringledメインおよびほぼアミノ酸253~ほぼアミノ酸258にヒスチジン含有プロテアーゼ活性部位の存在が示される。クローンUNQ323(DNA45234-1277)は、1998年3月5日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209654が割り当てられている。

10

20

#### 【0594】

完全長PRO382ポリペプチドのアミノ酸配列の解析から、これがセリンプロテアーゼタンパク質と有意な相同性を有することが示唆され、それにより、PRO382は、新規なセリンプロテアーゼであり得ることが示される。具体的には、Dayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の解析により、PRO382アミノ酸配列と以下のDayhoff配列、HSU75329\_\_1、ENTK\_\_MOUSE、HEPS\_\_HUMAN、AF030065\_\_1、HEPS\_\_RAT、PLMN\_\_PIG、P\_\_R89430、P\_\_R89435、PLMN\_\_HORSE、PLMN\_\_BOVINおよびP\_\_R83959との間の有意な相同性が証明された。

30

#### 【0595】

実施例11:ヒトPRO444ポリペプチド[UNQ328]をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例2に記載のアミラーゼスクリーニングで単離されたcDNA配列をDNA13121と命名した。この配列に対するオリゴヌクレオチドプローブを作製し、上記の実施例2のパラグラフ1に記載のようにして作製したヒト胎児肺ライブラリー(LIB25)をスクリーニングするために使用した。クローニングベクターはpRK5B(pRK5Bは、SfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である;Holmes et al., Science, 253:1278-1280(1991)を参照のこと)であり、cDNAサイズ排除は2800 bp未満であった。

40

#### 【0596】

同定された完全長クローンは、ヌクレオチド608-610位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド959-961位に見られる終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた(図17;配列番号17)。予測されるポリペプチド前駆体は、117アミノ酸長であり、その算出分子量は、約12,692ダルトン、推定pIは、約7.50である。図18(配列番号:18)に示す完全長PRO444配列の解析により、アミノ酸1~ほぼアミノ酸16にシグナルペプチドの存在が証明された。Dayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の解析により、PRO444アミノ酸配列と以下のDayhoff配列:

CEF44D12\_\_8、P\_\_R88452、YNE1\_\_CAEEL、A47312、AF

50



0 0 9 9 5 7 \_ 1 および A 0 6 1 3 3 \_ 1 との間の相同性が証明された。

【 0 5 9 7 】

クローン DNA 2 6 8 4 6 - 1 3 9 7 は、1 9 9 8 年 1 0 月 2 7 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 3 4 0 6 が割り当てられた。

【 0 5 9 8 】

実施例 1 2 : ヒト P R O 7 0 5 ポリペプチド [ U N Q 3 6 9 ] をコードする c D N A クローンの単離

上記の実施例 1 に記載のさまざまな E S T 配列に対するコンセンサス配列を得た。ここで、得られたコンセンサス配列を本明細書中で DNA 4 3 4 3 7 と命名する。その DNA 4 3 4 3 7 コンセンサス配列に基づいて、1) 目的の配列を含む c D N A ライブラリーを P C R によって同定するため、および 2) P R O 7 0 5 に対する完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。

【 0 5 9 9 】

P C R プライマー対 ( 順方向および逆方向 ) を合成した :

順方向 P C R プライマー : 5 ' - A A G C G T G A C A G C G G G C A C G T C - 3 ' ( 配列番号 : 1 3 1 )

逆方向 P C R プライマー : 5 ' - T G C A C A G T C T C T G C A G T G C C C A G G - 3 ' ( 配列番号 : 1 3 2 )

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサス DNA 4 3 4 3 7 配列から構築した :

ハイブリダイゼーションプローブ ( 4 3 4 3 7 . p 1 )

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

完全長クローンの起源についていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来の DNA を、上で同定された P C R プライマー対を用いた P C R 増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよび P C R プライマーの一方を使用して、P R O 7 0 5 遺伝子をコードするクローンを単離した。c D N A ライブラリーを構築するための RNA をヒト胎児腎臓組織から単離した ( L I B 2 2 7 ) 。

【 0 6 0 0 】

上で記載したように単離したクローンの DNA 配列決定により、P R O 7 0 5 [ 本明細書中で U N Q 3 6 9 ( DNA 5 0 9 1 4 - 1 2 8 9 と命名する ) ( 配列番号 1 9 ) に対する完全長 DNA 配列および P R O 7 0 5 に対して誘導タンパク質配列が得られた。

【 0 6 0 1 】

U N Q 3 6 9 ( DNA 5 0 9 1 4 - 1 2 8 9 ) のヌクレオチド配列全体を図 1 9 ( 配列番号 1 9 ) に示す。クローン U N Q 3 6 9 ( DNA 5 0 9 1 4 - 1 2 8 9 ) は、ヌクレオチド 5 6 6 - 5 6 8 位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド 2 2 3 1 - 2 2 3 3 位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる ( 図 1 9 ) 。予測されるポリペプチド前駆体は、5 5 5 アミノ酸長である ( 図 2 0 ; 配列番号 2 0 ) 。図 2 0 に示される完全長 P R O 7 0 5 タンパク質は、推定分子量が約 6 2 , 7 3 6 ダルトン、p I が約 5 . 3 6 である。図 2 0 に示す完全長 P R O 7 0 5 配列の解析により、以下 :

ほぼアミノ酸 1 ~ ほぼアミノ酸 2 3 にシグナルペプチド、ほぼアミノ酸 4 1 8 ~ ほぼアミノ酸 4 3 6 に真核生物 DNA トポイソメラーゼ I 活性部位、ならびにほぼアミノ酸 2 3 7 ~ ほぼアミノ酸 2 7 9、ほぼアミノ酸 4 2 1 ~ ほぼアミノ酸 4 5 8、ほぼアミノ酸 5 3 ~ ほぼアミノ酸 7 4、ほぼアミノ酸 4 6 6 ~ ほぼアミノ酸 5 0 4、ほぼアミノ酸 3 0 8 ~ ほぼアミノ酸 3 5 5、ほぼアミノ酸 1 0 4 ~ ほぼアミノ酸 1 5 6 およびほぼアミノ酸 3 7 9 ~ ほぼアミノ酸 4 1 0 に種々のグリピカンタンパク質に対して相同性を示す種々の領域の存在が証明された。クローン U N Q 3 6 9 ( DNA 5 0 9 1 4 - 1 2 8 9 ) は、1 9 9 8 年 3 月 3 1 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 7 2 2 が割り当てられてい

10

20

30

40

50

る。

#### 【0602】

完全長PRO705ポリペプチドのアミノ酸配列の解析から、これがK-グリピカンタンパク質と有意な配列類似性を有することが示唆され、それにより、PRO705は、新規なグリピカンタンパク質ファミリー構成員であり得ることが示される。より詳しくは、Dayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の解析により、PRO705アミノ酸配列and以下のDayhoff配列、GPCK\_\_MOUSE、GLYP\_\_CHICK、GLYP\_\_RAT、GLYP\_\_HUMAN、GPC2\_\_RAT、GPC5\_\_HUMAN、GPC3\_\_HUMAN、GPC3\_\_RAT、P\_\_R30168およびCEC03H12\_\_2との間の有意な相同性が証明された。

10

#### 【0603】

実施例13: ヒトPRO1071ポリペプチド[UNQ528]をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例1に記載のさまざまなEST配列に対するコンセンサス配列を得た。ここで、得られたコンセンサス配列を本明細書中でDNA53035と命名する。DNA53035コンセンサス配列に基づき、該コンセンサス配列が、概説すると完全長タンパク質をコードするようであったクローンであるIncYTE ESTクローン番号2872569と有意な配列同一性を共有することが測定された。そのため、IncYTE ESTクローン番号2872569を購入し、適正な配列が確認されるように、その挿入物を得て配列決定した。この配列を本明細書中でUNQ528またはDNA58847-1383と命名する。

20

#### 【0604】

上で記載したように単離したクローンのDNA配列決定により、PRO1071[本明細書中でUNQ528(DNA58847-1383)と命名する](配列番号21)に対する完全長DNA配列およびPRO1071に対して誘導タンパク質配列が得られた。

#### 【0605】

UNQ528(DNA58847-1383)のヌクレオチド配列全体を図21(配列番号21)に示す。クローンUNQ528(DNA58848-1383)は、ヌクレオチド133-135位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド1708-1710位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる(図21)。予測されるポリペプチド前駆体は、525アミノ酸長である(図22;配列番号22)。図22に示される完全長PRO1071タンパク質は、推定分子量が約58,416ダルトン、pIが約6.62である。図22(配列番号22)に示す完全長PRO1071配列の解析により、以下:

30

ほぼアミノ酸1~ほぼアミノ酸25のシグナルペプチド、ほぼアミノ酸251~ほぼアミノ酸254の潜在的N-グリコシル化部位、ほぼアミノ酸385~ほぼアミノ酸399のトロンボスポンジン-1相同性ブロックならびにほぼアミノ酸385~ほぼアミノ酸399、ほぼアミノ酸445~ほぼアミノ酸459およびほぼアミノ酸42~ほぼアミノ酸56のフォンビルブランド因子C型相同性ブロックの存在が証明された。クローンUNQ528(DNA58847-1383)は、1998年5月20日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209879が割り当てられている。

40

#### 【0606】

完全長PRO1071ポリペプチドのアミノ酸配列の解析から、これが、トロンボスポンジタンパク質と有意な配列類似性を有することが示唆され、それにより、PRO1071は新規なトロンボスポンジンホモログであり得ることが示される。より詳しくは、Dayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の解析により、PRO1071アミノ酸配列と以下のDayhoff配列、AB002364\_\_1、D67076\_\_1、BTPCINPGN\_\_1、CET13H10\_\_1、CEF25H8\_\_5、CEF53B6\_\_2、CEC26C6\_\_6、HSSEMG\_\_1、CET21B6\_\_4およびBTY08561\_\_1との間の有意な相同性が証明された。

50

## 【 0 6 0 7 】

実施例 14：ヒト PRO 1 1 2 5 ポリペプチド [ UNQ 5 6 3 ] をコードする c D N A クローン の単離

上の実施例 3 に記載したシグナル配列アルゴリズムを使用することにより、Incyte データベースから単一の E S T クラスター配列が同定できた。次いで、その E S T クラスター配列を、公的 E S T データベース（例えば、GenBank）および企業の E S T D N A データベース（L I F E S E Q（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（E S T）データベースと比較することにより、存在する相同性を同定した。相同性検索を、コンピュータプログラム B L A S T または B L A S T 2（Altschul et al., Methods in Enzymology 266: 460 - 480 (1996)）を使用して行った。既知のタンパク質をコードしなかった、B L A S T スコアが 70（またはいくつの場合においては 90）またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）を用いてコンセンサス D N A 配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、本明細書中で D N A 5 6 5 4 0 と命名する。

## 【 0 6 0 8 】

D N A 5 6 5 4 0 コンセンサス配列と Incyte E S T クローン番号 1 4 8 6 1 1 4 内に包含される E S T 配列との間で観察された配列相同性に鑑みて、その Incyte E S T クローン 1 4 8 6 1 1 4 を購入し、その c D N A 挿入断片を得て、配列決定した。この挿入断片が、完全長タンパク質をコードしていることが見出された。この c D N A 挿入断片の配列を図 2 3 に示し、本明細書中で D N A 6 0 6 1 5 - 1 4 8 2 と命名する。

## 【 0 6 0 9 】

図 2 3 に示す完全長クローンは、ヌクレオチド 4 7 - 4 9 位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド 1 3 8 8 - 1 3 9 0 位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた（図 2 3；配列番号 2 3）。予測されるポリペプチド前駆体（図 2 4，配列番号 2 4）は、4 4 7 アミノ酸長である。PRO 1 1 2 5 は、算出分子量が約 4 9, 7 9 8 ダルトン、推定 p I が約 9.78 である。クローン D N A 6 0 6 1 9 - 1 4 8 2 は、1 9 9 8 年 6 月 1 6 日に A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 9 9 3 が割り当てられている。該クローンは実際の配列を有するものであること、および該配列は、本明細書では、軽微なエラーを生じる傾向にあり得る現在の技術に基づく説明的なものであることを理解されたい。

## 【 0 6 1 0 】

完全長配列の W U - B L A S T 2 配列アラインメント解析（A L I G N コンピュータプログラム）に基づき、PRO 1 1 2 5 は、以下の Dayhoff 命名配列：

R C O 1 \_ \_ N E U C R ; S 5 8 3 0 6 ; P K W A \_ \_ T H E C U ; S 7 6 0 8 6 ; P \_ \_ R 8 5 8 8 1 ; H E T 1 \_ \_ P O D A N ; S P U 9 2 7 9 2 \_ \_ 1 ; A P A F \_ \_ H U M A N ; S 7 6 4 1 4 および S 5 9 3 1 7

といくらかの配列同一性を示す。

## 【 0 6 1 1 】

実施例 15：ヒト PRO 1 1 3 4 ポリペプチド [ UNQ 5 7 2 ] をコードする c D N A クローン の単離

上の実施例 3 に記載したシグナル配列アルゴリズムを使用することにより、Incyte データベースから E S T クラスター配列（7 5 1 1 と命名）が同定できた。次いで、その E S T クラスター配列を、公的 E S T データベース（例えば、GenBank）および企業の E S T D N A データベース（L I F E S E Q（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（E S T）データベースと比較することにより、存在する相同性を同定した。相同性検索を、コンピュータプログラム B L A S T または B L A S T 2（Altschul et a

1. , Methods in Enzymology 266:460-480 (1996))を使用して行った。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70 (またはいくつかの場合においては90) またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、本明細書中でDNA55725と命名する。2つの企業Genentech EST配列を構築に使用した。

#### 【0612】

DNA55725コンセンサス配列とMerck ESTクローン番号H94897内に包含されるEST配列との間で観察された配列相同性に鑑みて、そのMerck ESTクローンH94897を購入し、そのcDNA挿入断片を得て、配列決定した。この挿入断片が、完全長タンパク質をコードしていることが見出された。このcDNA挿入断片の配列を図25に示し、本明細書中でDNA56865-1491と命名する。

#### 【0613】

クローンDNA56865-1491)は、ヌクレオチド153-155位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド1266-1268位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる(図25; 配列番号25)。予測されるポリペプチド前駆体は、371アミノ酸長である(図26; 配列番号26)。図26に示される完全長PRO1134タンパク質は、推定分子量が約41,935ダルトン、pIが約9.58である。図26(配列番号26)に示す完全長PRO1134配列の解析により、以下:

ほぼアミノ酸1~ほぼアミノ酸23にシグナルペプチド、ほぼアミノ酸103~ほぼアミノ酸106、ほぼアミノ酸249~ほぼアミノ酸252およびほぼアミノ酸257~ほぼアミノ酸260に潜在的N-グリコシル化部位ならびにほぼアミノ酸280~ほぼアミノ酸306にチロシナーゼCuA-結合領域タンパク質に対して相同性を有するアミノ酸ブロックの存在が証明された。クローンDNA56865-1491は、1998年6月23日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203022が割り当てられている。

#### 【0614】

図26(配列番号26)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO1134アミノ酸配列と以下のDayhoff配列:F20P5\_\_18、AC002396\_\_10、S47847、C64146、GSPA\_\_BACSU、P\_\_W10564、RFAI\_\_ECOLI、Y258\_\_HAEIN、RFAJ\_\_SALTYおよびP\_\_R32985との間の有意な相同性が明らかになった。

#### 【0615】

実施例16: ヒトPRO1155ポリペプチド[UNQ585]をコードするcDNAクローンの単離

上の実施例3に記載したシグナル配列アルゴリズムを使用することにより、Incyteデータベースから単一のESTクラスター配列が同定できた。次いで、そのESTクラスター配列を、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)および企業のEST DNAデータベース(LIFESSEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(EST)データベースと比較することにより、存在する相同性を同定した。相同性検索を、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2(Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480(1996))を使用して行った。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70 (またはいくつかの場合においては90) またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)を用いてコンセンサス

10

20

30

40

50

DNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、本明細書中でDNA56102と命名する。

#### 【0616】

DNA56102コンセンサス配列とIncycyte ESTクローン番号2858870内に包含されるEST配列との間で観察された配列相同性に鑑みて、そのIncycyte ESTクローン2858870を購入し、そのcDNA挿入断片を得て、配列決定した。この挿入断片が、完全長タンパク質をコードしていることが見出された。このcDNA挿入断片の配列を図27に示し、本明細書中でDNA59849-1504と命名する。

#### 【0617】

図27に示す完全長クローンは、ヌクレオチド158-160位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド563-565位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた(図27;配列番号27)。予測されるポリペプチド前駆体(図28,配列番号28)は、135アミノ酸長である。PRO1155は、算出分子量が約14,833ダルトン、推定pIが約9.78である。クローンDNA59849-1504は、1998年6月16日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209986が割り当てられている。実際のクローンは正確な配列を有するものであるが、本明細書では、軽微な配列決定エラーを生じる傾向にある説明的なものにすぎないことを理解されたい。

#### 【0618】

完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析(ALIGNコンピュータプログラムを使用)に基づき、PRO1155は、以下のDayhoff命名配列:

TKNK\_\_BOVIN;PVB19X587\_\_1;AF019049\_\_1;P\_\_W00948;S72864;P\_\_W00949;I62742;AF038501\_\_1;TKNG\_\_HUMAN;およびYAT1\_\_RHOB

Lといくらかのアミノ酸配列同一性を示す。本明細書に示した情報に基づく、PRO1155は神経保護および認知増進の提供においてある役割を果たしている可能性がある。

#### 【0619】

実施例17:ヒトPRO1281ポリペプチド[UNQ651]をコードするcDNAクローンの単離

コンセンサスDNA配列を、上の実施例1に記載したように他のEST配列に関してphrapを使用して構築した。このコンセンサス配列を本明細書中でDNA35720と命名する。そのDNA35720コンセンサス配列に基づいて、1)目的の配列を含むcDNAライブラリーをPCRによって同定するため、および2)PRO1281に対する完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。

#### 【0620】

PCRプライマー(順方向および逆方向)を合成した:

順方向PCRプライマー:

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

;

5'-CTGATGTGGCCGATGTTCTG-3'(配列番号:135);および

5'-ATGGCTCAGTGTGCAGACAG-3'(配列番号:136)。

逆方向PCRプライマー:

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

;および

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

。

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサスDNA35720配列から構築した:

ハイブリダイゼーションプローブ:

10

20

30

40

50

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

#### 【0621】

完全長クローンの起源についていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のDNAを、上で同定されたPCRプライマー対を用いたPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよびPCRプライマーの一方を使用して、PRO1281遺伝子をコードするクローンを単離した。

cDNAライブラリーの構築のためのRNAは、単離されたヒト胎児肝臓であった。

#### 【0622】

上で記載したように単離したクローンのDNA配列決定により、PRO1281 [本明細書中でDNA59820-1549と命名する] (図29、配列番号29) に対する完全長DNA配列およびPRO1281に対して誘導タンパク質配列が得られた。

#### 【0623】

PRO1281のコード配列全体を図29に示す(配列番号29)。クローンDNA59820-1549は、ヌクレオチド228-230位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド2553-2555位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる。予測されるポリペプチド前駆体は、775アミノ酸長である。図30に示される完全長PRO1281タンパク質は、推定分子量が約85,481ダルトン、pIが約6.92である。

さらなる特徴としては、ほぼアミノ酸1-15のシグナルペプチド；ならびにほぼアミノ酸138-141および361-364の潜在的N-グリコシル化部位が挙げられる。

#### 【0624】

図30(配列番号30)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO1281アミノ酸配列と以下のDayhoff配列: S44860、CET24D1\_\_1、CEC38H2\_\_3、CAC2\_\_HAEEO、B3A2\_\_HUMAN、S22373、CEF38A3\_\_2、CEC34F6\_\_2、CEC34F6\_\_3, およびCELT22B11\_\_3との間のいくつかの相同性が明らかになった。

#### 【0625】

クローンDNA59820-1549は、1998年8月18日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203129が割り当てられている。

実施例18: ヒトPRO1343ポリペプチド[UNQ698]をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例2に記載のアミラーゼスクリーニングで単離されたcDNA配列は、WU-BLAST2配列アラインメントコンピュータプログラムによって、いずれの既知のヒトコード核酸に対しても有意な配列同一性を有しないことがわかった。このcDNA配列を本明細書中でDNA48921と命名する。プローブをDNA48921分子の配列から作製し、上記パラグラフ1に記載のようにして作製したヒト平滑筋細胞組織ライブラリーをスクリーニングするために使用した。クローニングベクターは、pRK5B(pRK5Bは、SfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である; Holmes et al., Science, 253: 1278-1280 (1991)を参照のこと)であり、cDNAサイズ排除は2800 bp未満であった。

#### 【0626】

使用したオリゴヌクレオチドプローブは、次のとおりであった:

順方向PCRプライマー: (48921.f1)

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

逆方向PCRプライマー: (48921.r1)

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

ハイブリダイゼーションプローブ(48921.p1)

10

20

30

40

50

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

同定された完全長クローンは、ヌクレオチド71 - 73位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド812 - 814位に見られる終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた(図31; 配列番号31)。予測されるポリペプチド前駆体は、247アミノ酸長であり、その算出分子量は、約25,335ダルトン、推定pIは、約7.0である。図32(配列番号32)に示す完全長PRO1343配列の解析により、以下:

ほぼアミノ酸1 ~ ほぼアミノ酸25のシグナルペプチドおよびほぼアミノ酸35 ~ ほぼアミノ酸225のスポロゾイト周囲反復配列に相同な領域の存在が証明された。クローンDNA66675 - 1587は、1998年9月22日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203282が割り当てられている。

#### 【0627】

図32(配列番号32)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO1343アミノ酸配列と以下のDayhoff配列: CSP\_\_PLACC、CEF25H8\_\_2、U88974\_\_40、BNAMRNA\_\_1、BOBOPC3\_\_1、S58135、AF061832\_\_1、BHU52040\_\_1、HUMPROFIE\_\_1およびMTV023\_\_14との間の有意な相同性が明らかになった。

#### 【0628】

さらに、DNA48921配列に対して相同性を有するIncye ESTクローン(Incye ESTクローン番号4701148)を得、挿入物を配列決定し、それにより、図31に示すDNA66675 - 1587配列が得られた。

#### 【0629】

実施例19: ヒトPRO1379ポリペプチド[UNQ716]をコードするcDNAクローンの単離

コンセンサスDNA配列を、上の実施例1に記載したように他のEST配列に関してphrapを使用して構築した。このコンセンサス配列を本明細書中でDNA45232と命名する。そのDNA45232コンセンサス配列に基づいて、1) 目的の配列を含むcDNAライブラリーをPCRによって同定するため、および2) PRO1379に対する完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。

#### 【0630】

PCRプライマー(順方向および逆方向)を合成した:

順方向PCRプライマー: 5' - T G G A C A C C G T A C C C T G G T A T C T G C -  
3' (配列番号: 143)

逆方向PCRプライマー: 5' - C C A A C T C T G A G G A G A G C A A G T G G C -  
3' (配列番号: 144)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサスDNA45232配列から構築した:

ハイブリダイゼーションプローブ

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

#### 【0631】

完全長クローンの起源についていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のDNAを、上で同定されたPCRプライマー対を用いたPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよびPCRプライマーの一方を使用して、PRO1379遺伝子をコードするクローンを単離した。cDNAライブラリーを構築するためのRNAをヒト胎児腎臓

10

20

30

40

50

組織から単離した。

#### 【0632】

上記のようにして単離されたクローンのDNA配列決定により、PRO1379の完全長DNA配列が得られ、これを本明細書中でDNA59828-1608と命名し、図33(配列番号:33)に示し、PRO1379の誘導タンパク質配列(配列番号:34)を示す。

#### 【0633】

PRO1379のコード配列全体を図33に示す(配列番号33)。クローンDNA59828-1608は、ヌクレオチド10-12位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド1732-1734位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる。予測されるポリペプチド前駆体は、574アミノ酸長である。図34に示される完全長PRO1379タンパク質は、推定分子量が約65,355ダルトン、pIが約8.73である。さらなる特徴としては、ほぼアミノ酸1-17のシグナルペプチドならびにほぼアミノ酸160-163、287-290および323-326の潜在的N-グリコシル化部位が挙げられる。

10

#### 【0634】

図34(配列番号34)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO1379アミノ酸配列と以下のDayhoff配列:YHY8\_\_YEAST、AF040625\_\_1、HP714394\_\_1,およびHIV18U45630\_\_1との間のいくつかの相同性が明らかになった。

20

#### 【0635】

クローンDNA59828-1608は、1998年8月25日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203158が割り当てられている。

#### 【0636】

実施例20:ヒトPRO1380ポリペプチド[UNQ717]をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例2に記載のアミラーゼスクリーニングで単離されたcDNA配列を本明細書中でDNA45776と命名する。DNA45776配列に基づき、オリゴヌクレオチドプローブを作製し、上記の実施例2のパラグラフ1に記載のようにして作製したヒト網膜ライブラリーをスクリーニングするために使用した。クローニングベクターはpRK5B(pRK5Bは、SfiI部位を含まないpRK5D前駆体である;Holmes et al., Science, 253:1278-1280(1991)を参照のこと)であり、and the cDNAサイズ排除は2800 bp未満であった。

30

#### 【0637】

PCRプライマー(順方向および逆方向)を合成した:

順方向PCRプライマー(45776.f1):5'-TTTGTGCGGTCAACCATGTGCTGTC-3'(配列番号:146)および

逆方向PCRプライマー(45776.r1):5'-CGTAGGTGACACAGAAAGCCCAAGG-3'(配列番号:147)。

40

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するDNA45776配列から構築した:

ハイブリダイゼーションプローブ(45776.p1)

5'-TACGGCATGACCGGCTCCTTTCTCTATGAGGAACCTCCCAAGGCACCTGATAT-3'(配列番号:148)。

#### 【0638】

完全長クローンの起源についていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のDNAを、上で同定されたPCRプライマー対を用いたPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよびPCRプライマーの一方を使用して、PRO1380遺伝子をコード

50



するクローンを単離した。

【0639】

同定された完全長クローンは、ヌクレオチド36 - 38位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド1462 - 1463位の終止シグナルを有する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた(図35; 配列番号35)。予測されるポリペプチド前駆体は、470アミノ酸長であり、その算出分子量は、約51,715ダルトン、推定pIは、約7.86である。

さらなる特徴としては、ほぼアミノ酸50 - 74、105 - 127、135 - 153、163 - 183、228 - 252、305 - 330および448 - 472の膜貫通ドメイン; ほぼアミノ酸14 - 17および84 - 87の潜在的N - グリコシル化部位; ならびにほぼアミノ酸60 - 68にジヒドロ葉酸レダクターゼシグニチャー (signature) が挙げられる。

【0640】

図36(配列番号36)に示される完全長配列のWU - BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO1380アミノ酸配列と以下のDayhoff配列: HSU81375\_\_1、CEZK809\_\_6、CEK02E11\_\_1、AF034102\_\_1、JC4196、CEF36H2\_\_2、P\_\_R92315、YAC2\_\_YEAST、F1707\_\_13, およびCEF44D12\_\_3との間の相同性が明らかになった。

【0641】

クローンDNA60740 - 1615は、1998年11月3日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203456が割り当てられた。

【0642】

実施例21: ヒトPRO1387ポリペプチド[UNQ722]をコードするcDNAクローンの単離

上の実施例3に記載したシグナル配列アルゴリズムを使用することにより、Incyteデータベースから単一のESTクラスター配列が同定できた。次いで、そのESTクラスター配列を、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)および企業のEST DNAデータベース(LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(EST)データベースと比較することにより、存在する相同性を同定した。相同性検索を、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2(Altschulet al., Methods in Enzymology 266: 460 - 480 (1996))を使用して行った。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70(またはいくつかの場合においては90)またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、本明細書中でDNA56259と命名する。

【0643】

DNA56259コンセンサス配列とIncyte ESTクローン番号3507924内に包含されるEST配列との間で観察された配列相同性に鑑みて、そのIncyte ESTクローン3507924を購入し、そのcDNA挿入断片を得て、配列決定した。この挿入断片が、完全長タンパク質をコードしていることが見出された。このcDNA挿入断片の配列を図37に示し、本明細書中でDNA68872 - 1620と命名する。

【0644】

クローンDNA68872 - 1620は、ヌクレオチド85 - 87位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド1267 - 1269位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる(図37; 配列番号37)。予測されるポリペプチド前駆体は、394アミノ酸長である(図38)。図38に示される完全長PRO138

10

20

30

40

50

7タンパク質は、推定分子量が約44,339ダルトン、pIが約7.10である。図38(配列番号38)に示す完全長PRO1387配列の解析により、以下：

ほばアミノ酸1～ほばアミノ酸19にシグナルペプチド、ほばアミノ酸275～ほばアミノ酸296に膜貫通ドメイン、ほばアミノ酸76～ほばアミノ酸79、ほばアミノ酸231～ほばアミノ酸234、ほばアミノ酸302～ほばアミノ酸305、ほばアミノ酸307～ほばアミノ酸310およびほばアミノ酸376～ほばアミノ酸379に潜在的N-グリコシル化部位、ならびにほばアミノ酸210～ほばアミノ酸239およびほばアミノ酸92～ほばアミノ酸121にミエリンp0タンパク質に対して相同性を有するアミノ酸配列ブロックの存在が証明された。クローンDNA68872-1620は、1998年8月25日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203160が割り当てられている。

10

#### 【0645】

図38(配列番号38)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO1387アミノ酸配列と以下のDayhoff配列：P\_\_W36955、MYP0\_\_HETFR、HS46KDA\_\_1、AF049498\_\_1、MYO0\_\_HUMAN、AF030454\_\_1、A53268、SHPTCRA\_\_1、P\_\_W14146およびGEN12838との間の有意な相同性が明らかになった。

#### 【0646】

実施例22：ヒトPRO1419ポリペプチド[UNQ733]をコードするcDNAクローンの単離

20

上の実施例3に記載したシグナル配列アルゴリズムを使用することにより、IncyteデータベースからESTクラスター配列が同定できた。次いで、そのESTクラスター配列を、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)および企業のEST DNAデータベース(LIFESEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(EST)データベースと比較することにより、存在する相同性を同定した。ESTの1つ以上は、罹患扁桃腺組織ライブラリー由来のものであった。相同性検索を、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2(Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480(1996))を使用して行った。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70(またはいくつかの場合においては90)またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、本明細書中でDNA59761と命名する。

30

#### 【0647】

DNA59761コンセンサス配列とIncyte EST3815008内に含まれるEST配列との間で観察された配列相同性に鑑みて、そのESTを含むクローンを購入し、そのcDNA挿入断片を得て、配列決定した。このcDNA挿入断片の配列を図39に示し、本明細書中でDNA71290-1630と命名する。

#### 【0648】

40

図39に示す完全長クローンは、ヌクレオチド86-88位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド341-343位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた(図39;配列番号39)。予測されるポリペプチド前駆体(図40,配列番号40)は、配列番号40のアミノ酸約1-17のシグナルペプチドを有する85アミノ酸長である。PRO1419は、算出分子量が約9,700ダルトン、推定pIが約9.55である。クローンDNA71290-1630は、1998年9月22日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203275が割り当てられた。

#### 【0649】

図40(配列番号40)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt

50

o t 3 5 ) の解析により、P R O 1 4 1 9 アミノ酸配列と以下の D a y h o f f 配列 ( データは本明細書中で援用される ) : S 0 7 9 7 5 ( B 3 - h o r d e i n ) 、 C 4 8 2 3 2 、 H O R 7 \_ H O R V U 、 G E N 1 1 7 6 4 、 S 1 4 9 7 0 、 A F 0 2 0 3 1 2 \_ 1 、 S T A J 3 2 2 0 \_ 1 、 C E R 0 7 E 3 \_ 1 、 C E Y 3 7 A 1 B \_ 4 , および A T A C 0 0 4 2 3 8 1 0 との間の相同性が明らかになった。

#### 【 0 6 5 0 】

実施例 2 3 : ヒト P R O 1 4 3 3 ポリペプチド [ U N Q 7 3 8 ] をコードする c D N A クローンの単離

コンセンサス D N A 配列を、上の実施例 1 に記載したように他の E S T 配列に関して p h r a p を使用して構築した。このコンセンサス配列を本明細書中で D N A 4 5 2 3 0 と命名する。その D N A 4 5 2 3 0 コンセンサス配列に基づいて、1) 目的の配列を含む c D N A ライブラリーを P C R によって同定するため、および 2) P R O 1 4 3 3 に対する完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。

#### 【 0 6 5 1 】

P C R プライマー ( 順方向および逆方向 ) を合成した :

順方向 P C R プライマー ( 4 5 2 3 0 . f 1 ) :

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

逆方向 P C R プライマー ( 4 5 2 3 0 . r 1 ) :

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

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサス D N A 4 5 2 3 0 配列から構築した :

ハイブリダイゼーションプローブ ( 4 5 2 3 0 . p 1 )

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

完全長クローンの起源についていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来の D N A を、上で同定された P C R プライマー対を用いた P C R 増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよび P C R プライマーの一方を使用して、P R O 1 4 3 3 遺伝子をコードするクローンを単離した。c D N A ライブラリーを構築するための R N A をヒト胎児腎臓組織から単離した。

#### 【 0 6 5 2 】

上で記載したように単離したクローンの D N A 配列決定により、P R O 1 4 3 3 [ 本明細書中で D N A 7 1 1 8 4 - 1 6 3 4 と命名する ] ( 図 4 1 、配列番号 4 1 ) に対する完全長 D N A 配列および P R O 1 4 3 3 に対して誘導タンパク質配列が得られた。

#### 【 0 6 5 3 】

D N A 7 1 1 8 4 - 1 6 3 4 ) のヌクレオチド配列全体を図 4 1 ( 配列番号 4 1 ) に示す。クローン D N A 7 1 1 8 4 - 1 6 3 4 は、ヌクレオチド 1 8 5 - 1 8 7 位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド 1 3 4 9 - 1 3 5 1 位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる ( 図 4 1 ) 。予測されるポリペプチド前駆体は、3 8 8 アミノ酸長である ( 図 4 2 ) 。図 4 2 に示される完全長 P R O 1 4 3 3 タンパク質は、推定分子量が約 4 3 , 8 3 1 ダルトン、p I が約 9 . 6 4 である。図 4 2 ( 配列番号 4 2 ) に示す完全長 P R O 1 4 3 3 配列の解析により、以下 :

ほぼアミノ酸 7 6 ~ ほぼアミノ酸 9 7 に膜貫通ドメイン、ほぼアミノ酸 6 0 ~ ほぼアミノ酸 6 3 、ほぼアミノ酸 1 7 3 ~ ほぼアミノ酸 1 7 6 およびほぼアミノ酸 2 2 8 ~ ほぼアミノ酸 2 3 1 に潜在的 N - グリコシル化部位ならびにほぼアミノ酸 1 0 ~ ほぼアミノ酸 1 5 、ほぼアミノ酸 4 1 ~ ほぼアミノ酸 4 6 、ほぼアミノ酸 8 4 ~ ほぼアミノ酸 8 9 、ほぼアミノ酸 1 2 0 ~ ほぼアミノ酸 1 2 5 、ほぼアミノ酸 1 6 9 ~ ほぼアミノ酸 1 7 4 、ほぼアミノ酸 2 2 9 ~ ほぼアミノ酸 2 3 4 、ほぼアミノ酸 2 4 0 ~ ほぼアミノ酸 2 4 5 、ほぼアミノ酸 3 1 8 ~ ほぼアミノ酸 3 2 3 およびほぼアミノ酸 3 7 8 ~ ほぼアミノ酸 3 8 3 に潜

10

20

30

40

50

在的 N - ミリストイル化 (myristoylation) 部位の存在が証明された。クローン DNA 71184 - 1634 は、1998 年 9 月 22 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 203266 が割り当てられている。

#### 【0654】

図 42 (配列番号 42) に示される完全長配列の WU - BLAST2 配列アラインメント解析を使用した Dayhoff データベース (バージョン 35.45 SwissProt 35) の解析により、PRO1433 アミノ酸配列と以下の Dayhoff 配列: CELW01A11\_\_4、CEF59A1\_\_4、S67138、MTV050\_\_3、S75135 および S12411 との間の有意な相同性が明らかになった。

#### 【0655】

実施例 24: ヒト PRO1474 ポリペプチド [UNQ745] をコードする cDNA クローンの単離

発現配列タグ (EST) DNA データベース (LIFESEQ (登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) を検索し、EST を同定した。

この EST により、膵臓分泌トリプシンインヒビターに対する相同性が示された。

#### 【0656】

この EST を含むクローンを Incyte (これは子宮頸部組織ライブラリー由来) から購入し、全体を配列決定すると、PRO1474 をコードする配列番号: 43 の核酸が示された。

#### 【0657】

PRO1474 のヌクレオチド配列全体を図 43 (配列番号 43) に示す。クローン DNA 73739 - 1645 は、ヌクレオチド 45 - 47 位に明らかな翻訳開始部位およびヌクレオチド 300 - 302 位の終止コドンを含む (図 43; 配列番号: 43)。予測されるポリペプチド前駆体は 85 アミノ酸長である。図 44 に示されるように、Kazal セリンプロテアーゼインヒビターファミリーシグニチャーは、配列番号: 44 のほぼアミノ酸 45 から始まる。また、図 44 に、インテグリン 鎖の保存された領域を示す (配列番号: 44 のほぼアミノ酸 32 から始まる)。クローン DNA 73739 - 1645 は、1998 年 9 月 22 日に ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 203270 が割り当てられている。図 44 に示された完全長 PRO1474 タンパク質は、約 9,232 ダルトンの推定分子量および約 7.94 の pI を有する。

#### 【0658】

図 44 (配列番号 44) に示される完全長配列の WU - BLAST2 配列アラインメント解析を使用した Dayhoff データベース (バージョン 35.45 SwissProt 35) の解析により、PRO1134 アミノ酸配列と以下の Dayhoff 配列: IOVO\_\_FRAER、IOVO\_\_FRAAF、IOVO\_\_FRACO、IOVO\_\_CYRMO、IOVO\_\_STRCA、H61492、C61589、IOVO\_\_POLPL、D61589、および IOVO\_\_TURME との間の配列同一性が明らかになった。

#### 【0659】

実施例 25: ヒト PRO1550 ポリペプチド [UNQ762] をコードする cDNA クローンの単離

上記の実施例 3 に記載のシグナル配列アルゴリズムの使用により、CELT15B7\_\_12 と命名され、本明細書では「DNA10022」とも称する Merck データベースからの EST 配列の同定が可能となった。次いで、この EST 配列を、公的およびプロプライエタリ EST データベース (例えば、GenBank and LIFESEQ (登録商標)) を含むさまざまな発現配列タグ (EST) データベースと比較し、既存の相同性を同定した。相同性検索を、コンピュータプログラム BLAST または BLAST2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266: 460 - 480 (1996)) を使用して行った。既知のタンパク質をコードしな

10

20

30

40

50

った、BLASTスコアが70（またはいくつかの場合においては90）またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、本明細書中でDNA55708と命名する。

#### 【0660】

DNA55708配列とIncyte EST番号3411659内に包含される配列との間の配列相同性に鑑みて、そのESTクローン3411659を購入し、そのcDNA挿入断片を得て、その全体に亘って配列決定した。このcDNA挿入断片の配列を図45に示し、本明細書中でDNA76393-1664と命名する。

10

#### 【0661】

図45に示す完全長クローンは、ヌクレオチド138-140位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド867-869位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた（図45；配列番号45）。予測されるポリペプチド前駆体（図46、配列番号：46）は243アミノ酸長である。PRO1550タンパク質他の特徴としては：ほぼアミノ酸1-30のシグナル配列；ほぼアミノ酸195-217の疎水性ドメイン；およびほぼアミノ酸186-189の潜在的N-グリコシル化部位が挙げられる。PRO1550は、およそ26,266ダルトンの計算分子量およびおよそ8.43の推定pIを有する。クローンDNA76393-1664は、1998年10月6日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203323が割り当てられた。

20

#### 【0662】

図46（配列番号46）に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt35）の解析により、PRO1550アミノ酸配列と以下のDayhoff配列：ELF59E12\_\_11；CA24\_\_ASCSSU；AF018082\_\_1；CA13\_\_BOVIN；CA54\_\_HUMAN；CA34\_\_HUMAN；HUMCOL7A1X\_\_1；P\_\_W09643；AF053538\_\_1；およびHSEMCXIV2\_\_1との間のいくつかの相同性が明らかになった。

#### 【0663】

実施例26：ヒトPRO1571ポリペプチド[UNQ777]をコードするcDNAクローンの単離

30

コンセンサスDNA配列を、上の実施例1に記載したように他のEST配列に関してphrapを使用して構築した。このコンセンサス配列を本明細書中でDNA69559と命名する。

DNA69559コンセンサス配列とIncyte ESTクローン番号3140760内に含まれるEST配列間で観察された相同性に基づき、Incyte ESTクローン番号3140760を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。このcDNA挿入断片の配列を図47に示し、本明細書中でDNA73730-1679と命名する。

#### 【0664】

クローンDNA73730-1679は、ヌクレオチド90-92位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド807-809位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる（図47；配列番号47）。予測されるポリペプチド前駆体は、239アミノ酸長である（図48）。図48に示される完全長PRO1571タンパク質は、推定分子量が約25,699ダルトン、pIが約8.99である。図48（配列番号48）に示す完全長PRO1571配列の解析により、以下：

40

ほぼアミノ酸1～ほぼアミノ酸21のシグナルペプチドならびにほぼアミノ酸82～ほぼアミノ酸103、ほぼアミノ酸115～ほぼアミノ酸141およびほぼアミノ酸160～ほぼアミノ酸182の膜貫通ドメインの存在が証明された。クローンDNA73730-1679は、1998年10月6日にATTCに寄託され、ATCC寄託番号ATCC203320が割り当てられている。

50

## 【0665】

図48(配列番号48)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO1571アミノ酸配列と以下のDayhoff配列: AF072128\_\_1、AB000712\_\_1、AB000714\_\_1、AF007189\_\_1、AF000959\_\_1、AF068863\_\_1、P\_\_W15288、PM22\_\_HUMAN、P\_\_R30056およびLSU46824\_\_1との間の有意な相同性が明らかになった。

## 【0666】

実施例27: ヒトPRO1572ポリペプチド[UNQ778]をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例1に記載の方法を用い、コンセンサス配列を得た。このコンセンサス配列を本明細書中で「DNA69560」と命名する。

## 【0667】

DNA69560コンセンサス配列および本明細書に示した他の情報に基づき、該構築物由来の別のEST(Incyte DNA3051424)を含むクローンを購入し、配列決定した。

## 【0668】

PRO1573のコード配列全体を図49に示す(配列番号49)。クローンDNA73734-1680は、ヌクレオチド90-92位に明らかな翻訳開始部位およびヌクレオチド873-875位に明らかな終止コドンを含む。予測されるポリペプチド前駆体は261アミノ酸長である。シグナルペプチドは配列番号: 50のほぼアミノ酸1-23であり、膜貫通ドメインはほぼアミノ酸81-100、121-141および173-194である。膜貫通ドメインの1つ以上が欠失または不活化されたものであり得る。

## 【0669】

N-グリコシル化部位、N-ミリスチル化部位、チロシンキナーゼリン酸化部位および原核生物膜リポタンパク質脂質結合部位の位置を図50に示す。クローンDNA73734-1680は、1998年10月20日にATTCに寄託され、ATCC寄託番号203363が割り当てられている。図50に示す完全長PRO1572タンパク質は、約27,856ダルトンの推定分子量 および約8.5のpIを有する。

## 【0670】

図50(配列番号50)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO1572アミノ酸配列と以下のDayhoff配列(本明細書中で援用される): AF072127\_\_1、HSU89916\_\_1、AB000713\_\_1、AB000714\_\_1、AB000712\_\_1、AF000959\_\_1、AF072128\_\_1、AF068863\_\_1、P\_\_W29881, およびP\_\_W58869との間の配列同一性が明らかになった。

## 【0671】

実施例28: ヒトPRO1759ポリペプチド[UNQ832]をコードするcDNAクローンの単離

上の実施例3に記載したシグナル配列アルゴリズムを使用することにより、IncyteデータベースからESTクラスター配列(10571と命名)が同定できた。次いで、そのESTクラスター配列を、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)および企業のEST DNAデータベース(LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(EST)データベースと比較することにより、存在する相同性を同定した。

## 【0672】

ESTの1つ以上は、アレルギー性喘息患者のプールされた好酸球に由来するものであ

10

20

30

40

50

った。

相同性検索を、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996))を使用して行った。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70 (またはいくつかの場合においては90) またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、本明細書中でDNA57313と命名する。

#### 【0673】

DNA57313配列とIncyte EST 2434255間の配列相同性に鑑み、このESTを含むクローンを購入し、cDNA挿入物を得て、配列決定した。

#### 【0674】

このcDNA挿入断片の配列を図51に示し、本明細書中でDNA76531-1701と命名する。

#### 【0675】

図51に示す完全長クローンは、ヌクレオチド125-127位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド1475-1477位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた(図51; 配列番号51)。

#### 【0676】

シグナルペプチドおよび膜貫通ドメインのおよその位置を図52に示し、一方、N-ミリスチル化部位、脂質結合部位、アミド化部位部位およびキナーゼリン酸化部位のおよその位置を図52に示す。予測されるポリペプチド前駆体(図52、配列番号: 52)は450アミノ酸長である。PRO1759は、およそ49,765ダルトンの計算分子量およびおよそ8.14の推定pIを有する。

クローンDNA76531-1701は、1998年11月17日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203465が割り当てられた。

#### 【0677】

図52(配列番号52)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO1759アミノ酸配列と以下のDayhoff配列: OPDE\_\_PSEAE、TH11\_\_TRYBB、S67684、RGT2\_\_YEAST、S68362、ATSUGTRPR\_\_1、P\_\_W17836(Patent application WO9715668-A2)、F69587、A48076、およびA45611との間の配列同一性が明らかになった。

#### 【0678】

実施例29: ヒトPRO4341ポリペプチド[UNQ1895]をコードするcDNAクローンの単離

Swiss-Prot公的データベースからの約950個の既知の分泌タンパク質の細胞外ドメイン(ECD)配列(もしあれば、分泌シグナル配列を含む)を使用して、ESTデータベースを検索した。そのESTデータベースは、公的データベース(例えば、GenBank)および企業のESTデータベース(LIFESSEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含んでいた。検索は、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2[Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480(1996)]を使用して、ECDタンパク質配列とEST配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70 (またはいくつかの場合においては90) またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)を用いてコンセン

10

20

30

40

50

サスDNA配列を構築した。

【0679】

PRO4341をコードするコンセンサスDNA配列を、他のEST配列に関してphrapを使用して構築した。このコンセンサス配列を本明細書中でDNA45433と命名する。

【0680】

そのDNA45433コンセンサス配列に基づいて、1)目的の配列を含むcDNAライブラリーをPCRによって同定するため、および2)PRO4341に対する完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。順方向および逆方向PCRプライマーは、一般に20~30ヌクレオチドの範囲であり、約100~1000bp長のPCR産物が得られるように設計されることが多い。プローブ配列は、代表的には40~55bp長である。いくつかの場合において、コンセンサス配列が約1~1.5kbpより大きいとき、さらなるオリゴヌクレオチドを合成する。完全長クローンについていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のDNAを、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, 前出のように、PCRプライマー対を用いてPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよびプライマー対の一方を使用して、目的の遺伝子をコードするクローンを単離した。

【0681】

PCRプライマー(順方向および逆方向)を合成した:

順方向PCRプライマー: 5' TTCTCTCTGGCCGACGCTGTGAGG3' (配列番号: 152); および

逆方向PCRプライマー: 5' GCCATAAGGGCATTTGCACACAAGG3' (配列番号: 153)。

【0682】

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサス45433配列から構築した:

ハイブリダイゼーションプローブ 5' AGTCCCTGCTTCAACAGGGCCACCCTGCTACCCGACCTCTCCAC3' (配列番号: 154)。

【0683】

完全長クローンの起源についていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のDNAを、上で同定されたPCRプライマー対を用いたPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよびPCRプライマーの一方を使用して、PRO4341遺伝子をコードするクローンを単離した。

【0684】

cDNAライブラリーを構築するためのRNAをヒト胎児肺から単離した。cDNAクローンを単離するために使用したcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAの試薬などの市販の試薬を使用して標準的な方法によって構築した。cDNAを、NotI部位を含むオリゴdTをプライマーとして増幅し、SalI半リン酸化アダプターに平滑末端で連結し、NotIで切断し、ゲル電気泳動によって適切にサイズ分離し、適当なクローニングベクター(例えば、pRKBまたはpRKD; pRK5Bは、SfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である; Holmes et al., Science, 253: 1278-1280 (1991)を参照のこと)に所定の方向で独特のXhoI部位およびNotI部位においてクローニングした。

【0685】

上で記載したように単離したクローンのDNA配列決定により、PRO4341[本明細書中でDNA81761-2583と命名する](図57、配列番号57)に対する完全長DNA配列およびPRO4341に対して誘導タンパク質配列が得られた。



## 【0686】

PRO4341のコード配列全体を図57に示す(配列番号57)。クローンDNA 81761-2583は、ヌクレオチド36-38位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド2091-2093位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる。予測されるポリペプチド前駆体は、685アミノ酸長である。DNA 81761-2583と命名されるクローンDNA 81761-2583(UNQ1895)は、1999年3月23日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203862が割り当てられた。図58に示される完全長PRO4341タンパク質は、推定分子量が約74605ダルトン、pIが約6.89である。

## 【0687】

図58(配列番号58)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO4341アミノ酸配列と以下のDayhoff配列(本明細書中に組み込まれた配列および関連テキスト): P\_W11719、I50719、P\_W00876、DLL1\_HUMAN、P\_W18348、AF030031\_1、AF020201\_1、AF028593\_1、P\_W05833およびCRB\_DROMEとの間の相同性が明らかになった。

## 【0688】

したがって、PRO4341はDeltaに関連し、癌、創傷修復、分化障害の処置またはかかる処置に有用な化合物を開発する(発達)ためのアッセイに有用であると考えられる。

## 【0689】

実施例30: ヒトPRO4348ポリペプチド[UNQ1902]をコードするcDNAクローンの単離

Swiss-Prot公的データベースからの約950個の既知の分泌タンパク質の細胞外ドメイン(ECD)配列(もしあれば、分泌シグナル配列を含む)を使用して、ESTデータベースを検索した。そのESTデータベースは、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)および企業のESTデータベース(LIFESSEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含んでいた。検索は、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2[Altschul et al., Methods in Enzymology, 266: 460-480(1996)]を使用して、ECDタンパク質配列とEST配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70(またはいくつかの場合においては90)またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。

## 【0690】

PRO4348をコードするコンセンサスDNA配列を、他のEST配列に関してphrapを使用して構築した。このコンセンサス配列を本明細書中でDNA77500と命名する。

## 【0691】

DNA77500コンセンサス配列に基づき、DNA92232-2589が同定された。

## 【0692】

DNA配列決定により、PRO4348(本明細書中でDNA92232-2589と命名する[図59、配列番号: 59])の完全長DNA配列; およびPRO4348の誘導タンパク質配列が得られた。

## 【0693】

PRO4348のコード配列全体を図59に示す(配列番号59)。

10

20

30

40

50

## 【0694】

クローンDNA92232-2589は、配列番号：59のヌクレオチド57-59位に明らかな翻訳開始部位、およびヌクレオチド789-791に明らかな終止コドンを含む。予測されるポリペプチド前駆体は244アミノ酸長である。DNA92232-2589と命名されたクローンDNA92232-2589(UNQ1902)は、1999年3月30日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203895が割り当てられている。図60に示す完全長PRO4348タンパク質は、約28319ダルトンの推定分子量および約8.78のpIを有する。

## 【0695】

図60(配列番号60)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO4348アミノ酸配列と以下のDayhoff配列：D70554、D69267、YH09\_\_YEAST、D71620、AB019196\_\_1、F71102、COQ5\_\_YEAST、BIOC\_\_SERMA、S61202、およびPMTA\_\_RHOSHとの間の相性が明らかになった。

## 【0696】

実施例31：ヒトPRO4369ポリペプチド[UNQ1911]をコードするcDNAクローンの単離

Genentech, Inc. (South San Francisco, CA)によって開発された、企業のシグナル配列探索アルゴリズムをESTに適用することによってDNA92289-2598を同定するだけでなく、クラスター化し、公的データベース(例えば、GenBank)および/または企業データベース(LIFESeq(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA)からESTフラグメントを構築した。そのシグナル配列アルゴリズムは、目的の配列または配列フラグメントの5'-末端の1番目および必要に応じて2番目のメチオニンコドン(ATG)周辺のDNAヌクレオチドの特徴に基づいて分泌シグナルスコアを計算する。1番目のATGの後のヌクレオチドは、いかなる終止コドンも有しない少なくとも35個の明確なアミノ酸をコードしなければならない。1番目のATGが必要なアミノ酸を有する場合、2番目のATGは、試験されない。どちらもが必要条件を満たさない場合、候補配列は、スコア付けされない。EST配列が確実なシグナル配列を含むか否かを判定するために、ATGコドンの周辺のDNA配列および対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られている7つのセンサー(評価パラメータ)のセットを使用してスコア付けする。

## 【0697】

上記のシグナル配列アルゴリズムを使用することにより、IncyteデータベースからESTクラスター配列が同定できた。次いで、そのESTクラスター配列を、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)および企業のEST DNAデータベース(LIFESeq(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(EST)データベースと比較することにより、存在する相性を同定した。相同性検索を、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2(Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480(1996))を使用して行った。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70(またはいくつかの場合においては90)またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、本明細書中でDNA75180と命名する。DNA75180に鑑み、DNA92289が同定された。

## 【0698】

図61に示す完全長クローンは、ヌクレオチド74-76位の明らかな翻訳開始部位を

有し、ヌクレオチド 776 - 778 位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた (図 6 1 ; 配列番号 6 1 )。予測されるポリペプチド前駆体 (図 6 2 , 配列番号 6 2 ) は、234 アミノ酸長である。PRO4369 は、算出分子量が約 26077 ダルトン、推定 pI が約 8.13 である。

#### 【0699】

図 6 2 (配列番号 6 2) に示される完全長配列の WU - BLAST2 配列アラインメント解析を使用した Dayhoff データベース (バージョン 35.45 SwissProt 35) の解析により、PRO4369 アミノ酸配列と以下の Dayhoff 配列 (本明細書中に組み込まれた配列および関連テキスト) : Y081\_\_HUMAN、NUCL\_\_CHICK、S64439、YG3A\_\_YEAST、CELF12F3\_\_3、ATGEL SOLI\_\_1、S55395、NFM\_\_RABIT、PFAHSP86B\_\_1 および NPM\_\_XENLA との間の相同性が明らかになった。

10

#### 【0700】

DNA92289 - 2598 と命名されるクローン DNA92289 - 2598 (UNQ1911) は、1999 年 5 月 25 日に ATTC に寄託され、ATCC 寄託番号 PTA - 131 が割り当てられている。

#### 【0701】

実施例 32 : ヒト PRO4381 ポリペプチド [UNQ1916] をコードする cDNA クローンの単離

Genentech, Inc. (South San Francisco, CA) によって開発された、企業のシグナル配列探索アルゴリズムを EST に適用することによって DNA92225 - 2603 を同定するだけでなく、クラスター化し、公的データベース (例えば、GenBank) および / または企業データベース (LIFESEQ (登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA) から EST フラグメントを構築した。そのシグナル配列アルゴリズムは、目的の配列または配列フラグメントの 5' - 末端の 1 番目および必要に応じて 2 番目のメチオニンコドン (ATG) 周辺の DNA ヌクレオチドの特徴に基づいて分泌シグナルスコアを計算する。1 番目の ATG の後のヌクレオチドは、いかなる終止コドンも有しない少なくとも 35 個の明確なアミノ酸をコードしなければならない。1 番目の ATG が必要なアミノ酸を有する場合、2 番目の ATG は、試験されない。どちらもが必要条件を満たさない場合、候補配列は、スコア付けされない。EST 配列が確実なシグナル配列を含むか否かを判定するために、ATG コドンの周辺の DNA 配列および対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られている 7 つのセンサー (評価パラメータ) のセットを使用してスコア付けする。

20

30

#### 【0702】

上記のシグナル配列アルゴリズムを使用することにより、Incyte データベースから EST 配列が同定できた。次いで、公的 EST データベース (例えば、GenBank) および企業の EST DNA データベース (LIFESEQ (登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) を含む種々の発現配列タグ (EST) データベースとこの EST 配列を比較することにより、存在する相同性を同定した。相同性検索を、コンピュータプログラム BLAST または BLAST2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266 : 460 - 480 (1996)) を使用して行った。既知のタンパク質をコードしなかった、BLAST スコアが 70 (またはいくつかの場合においては 90) またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington) を用いてコンセンサス DNA 配列を構築した。

40

#### 【0703】

該構築に使用された EST の 1 つ以上は、胸腺組織ライブラリー由来のものであった。

#### 【0704】

50

そこから得られたコンセンサス配列を、本明細書中でDNA79136と命名する。

【0705】

DNA79136配列に鑑み、DNA92225-2603を同定し、配列決定した。

【0706】

図63に示す完全長クローンは、ヌクレオチド145-147位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド460-462位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた(図63;配列番号63)。予測されるポリペプチド前駆体(図64,配列番号64)は、105アミノ酸長である。PRO4381は、算出分子量が約10803ダルトン、推定pIが約7.2である。

【0707】

図64(配列番号64)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO4381アミノ酸配列と以下のDayhoff配列(本明細書中に組み込まれた配列および関連テキスト):A2AC\_\_CAVPO、P102KB\_\_39、S7123、I54343、HSL25A3\_\_1、C71466、P\_\_R62382、S76774、HS0934,およびA64763との間の相同性が明らかになった。

【0708】

DNA92225-2603と命名されるクローンDNA92225-2603(UNQ1916)は、1999年4月20日にATTCに寄託され、ATCC寄託番号203950が割り当てられている。

【0709】

実施例33:ヒトPRO4407ポリペプチド[UNQ1932]をコードするcDNAクローンの単離

Genentech, Inc. (South San Francisco, CA)によって開発された、企業のシグナル配列探索アルゴリズムをESTに適用することによってDNA92264-2616を同定するだけでなく、クラスター化し、公的データベース(例えば、GenBank)および/または企業データベース(LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA)からESTフラグメントを構築した。そのシグナル配列アルゴリズムは、目的の配列または配列フラグメントの5'-末端の1番目および必要に応じて2番目のメチオニンコドン(ATG)周辺のDNAヌクレオチドの特徴に基づいて分泌シグナルスコアを計算する。1番目のATGの後のヌクレオチドは、いかなる終止コドンも有しない少なくとも35個の明確なアミノ酸をコードしなければならない。1番目のATGが必要なアミノ酸を有する場合、2番目のATGは、試験されない。どちらもが必要条件を満たさない場合、候補配列は、スコア付けされない。EST配列が確実なシグナル配列を含むか否かを判定するために、ATGコドンの周辺のDNA配列および対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られている7つのセンサー(評価パラメータ)のセットを使用してスコア付けする。

【0710】

上記のシグナル配列アルゴリズムを使用することにより、IncyteデータベースからESTクラスター配列が同定できた。次いで、そのESTクラスター配列を、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)および企業のEST DNAデータベース(LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(EST)データベースと比較することにより、存在する相同性を同定した。相同性検索を、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2(Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480(1996))を使用して行った。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70(またはいくつかの場合においては90)またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phr

10

20

30

40

50

ap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。

【0711】

クラスター配列および配列アラインメントに基づき、DNA 92264 - 2616を同定し、配列決定した。

【0712】

図65に示す完全長クローンは、ヌクレオチド109 - 111位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド757 - 759位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた(図65; 配列番号65)。予測されるポリペプチド前駆体(図66, 配列番号66)は、216アミノ酸長である。PRO4407は、算出分子量が約23729ダルトン、推定pIが約4.73である。

10

【0713】

図66(配列番号66)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO4407アミノ酸配列と以下のDayhoff配列: SC1E6\_\_12、D80003\_\_1、HMGASOYBN、DROTR012\_\_1、HSU91934\_\_1、GEN14338、AF051945\_\_1、A45644、P\_\_W60213, およびP\_\_W33807との間の相同性が明らかになった。

【0714】

DNA 92264 - 2616と命名されるクローンDNA 92264 - 2616(UNQ1932)は、1999年4月27日にATTCに寄託され、ATCC寄託番号203969が割り当てられている。

20

【0715】

実施例34: ヒトPRO4425ポリペプチド[UNQ1942]をコードするcDNAクローンの単離

上の実施例3に記載したシグナル配列アルゴリズムを使用することにより、IncyteデータベースからESTクラスター配列が同定できた。次いで、そのESTクラスター配列を、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)および企業のEST DNAデータベース(LIFESSEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(EST)データベースと比較することにより、存在する相同性を同定した。相同性検索を、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2(Altschul et al., Method in Enzymology 266: 460 - 480 (1996))を使用して行った。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70(またはいくつかの場合においては90)またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、本明細書中でDNA 81099と命名する。

30

【0716】

DNA 81099配列とESTクローン番号AA448744に含まれたEST配列間で観察された配列相同性に鑑み、ESTクローンAA448744をMerckから購入し、cDNA挿入物を得て、配列決定した。

40

このcDNA挿入物の配列を本明細書中でDNA 93011 - 2637と命名する。

【0717】

図67に示す完全長クローンは、ヌクレオチド27 - 29位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド435 - 437位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた(図67; 配列番号67)。予測されるポリペプチド前駆体(図68, 配列番号68)は、136アミノ酸長である。PRO4425は、算出分子量が約15,577ダルトン、推定pIが約8.88である。

50

## 【0718】

図68(配列番号68)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO4425アミノ酸配列と以下のDayhoff配列: HGS\_\_RE295、S44655、YOJ8\_\_CAEEL、VBR1\_\_CLVK、P\_\_R39520、P\_\_R65332、P\_\_R39388、TGL4\_\_HUMAN、YKAB\_\_CAEEL, およびS71105との間の相同性が明らかになった。

## 【0719】

クローンDNA93011-2637)は、1999年5月4日にATTCに寄託され、ATCC寄託番号20-PTAが割り当てられている。

10

## 【0720】

実施例35: ヒトPRO4985ポリペプチド[UNQ2426]をコードするcDNAクローンの単離

Swiss-Prot公的データベースからの約950個の既知の分泌タンパク質の細胞外ドメイン(ECD)配列(もしあれば、分泌シグナル配列を含む)を使用して、ESTデータベースを検索した。そのESTデータベースは、企業のESTデータベース(LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含んでいた。検索は、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2[Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480(1996)]を使用して、ECDタンパク質配列とEST配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70(またはいくつかの場合においては90)またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。

20

## 【0721】

コンセンサスDNA配列を、上に記載したように他のEST配列に関してphrapを使用して構築した。このコンセンサス配列を本明細書中でDNA42819と命名する。いくつかの場合において、DNA42819コンセンサス配列は、BLASTおよびphrapの繰り返しサイクルを使用して伸長された中間コンセンサスDNA配列から得られ、これにより、上記のEST配列の起源を使用してその中間コンセンサス配列をできる限り伸長した。

30

## 【0722】

そのDNA42819コンセンサス配列に基づいて、1)目的の配列を含むcDNAライブラリーをPCRによって同定するため、および2)PRO4985に対する完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。順方向および逆方向PCRプライマーは、一般に20~30ヌクレオチドの範囲であり、約100~1000bp長のPCR産物が得られるように設計されることが多い。プローブ配列は、代表的には40~55bp長である。いくつかの場合において、コンセンサス配列が約1~1.5kbpより大きいとき、さらなるオリゴヌクレオチドを合成する。完全長クローンについていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のDNAを、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, 前出のように、PCRプライマー対を用いてPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよびプライマー対の一方を使用して、目的の遺伝子をコードするクローンを単離した。

40

## 【0723】

PCRプライマー(順方向および逆方向)を合成した:

順方向PCRプライマー: 5' - TGTCTCTCTATTGGAGAACCAACAGCC - 3' (配列番号: 155)

50

逆方向PCRプライマー：5' - T A A A A G T T G G C T G G G C A A A G T T T G C - 3' (配列番号：156)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサスDNA 42819配列から構築した：

ハイブリダイゼーションプローブ

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

cDNAライブラリーを構築するためのRNAをヒト甲状腺組織から単離した。cDNAクローンを単離するために使用したcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAの試薬などの市販の試薬を使用して標準的な方法によって構築した。cDNAを、NotI部位を含むオリゴdTをプライマーとして増幅し、SalI半リン酸化アダプターに平滑末端で連結し、NotIで切断し、ゲル電気泳動によって適切にサイズ分離し、適当なクローニングベクター（例えば、pRKBまたはpRKD；pRKB5Bは、SfiI部位を含まないpRKB5Dの前駆体である；Holmes et al., Science, 253:1278-1280 (1991)を参照のこと）に所定の方向で独特のXhoI部位およびNotI部位においてクローニングした。

【0724】

上で記載したように単離したクローンのDNA配列決定により、完全長PRO4985ポリペプチドに対する完全長DNA配列（本明細書中でDNA59770-2652と命名[図69, 配列番号69]）およびPRO4985ポリペプチドに対して誘導タンパク質配列が得られた。

【0725】

上で同定した完全長クローンは、ヌクレオチド133-135位の明らかな翻訳開始部位およびヌクレオチド3172-3174位の終止シグナルを有する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた（図69, 配列番号69）。予測されるポリペプチド前駆体は、1013アミノ酸長であり、その算出分子量は、約111,348.50ダルトン、推定pIは、約6.34である。図70（配列番号70）に示す完全長PRO4985配列の解析により、図70に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、その重要なポリペプチドドメインについて与えられる位置は、上記のようにおよびその位置である。クローンDNA59770-2652は、1999年7月27日にATTCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-427が割り当てられている。

【0726】

図70（配列番号70）に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt35）の解析により、PRO4985アミノ酸配列と以下のDayhoff配列：CEF58E6\_\_3；XELERTK\_\_1；CELW02C12\_\_2；I49071；I48653；EPB3\_\_MOUSE；EPB3\_\_HUMAN；LMG1\_\_DROME；CVU90226\_\_1；P\_\_W57046との間の配列同一性が明らかになった。

【0727】

実施例36：ヒトPRO4989ポリペプチド[UNQ2429]をコードするcDNAクローンの単離

Swiss-Prot公的データベースからの約950個の既知の分泌タンパク質の細胞外ドメイン（ECD）配列（もしあれば、分泌シグナル配列を含む）を使用して、ESTデータベースを検索した。

【0728】

ESTデータベースには、（1）公的ESTデータベース（例えば、Merck/ワシントン大学）、（2）公的ESTデータベース（LIFESeq（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）、および（3）Genentechの公的ESTデータベースが含まれた。

【0729】

10

20

30

40

50

検索は、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2 [Altschulet al., Methods in Enzymology, 266: 460-480 (1996)] を使用して、ECDタンパク質配列とEST配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70 (またはいくつかの場合においては90) またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington) を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。

#### 【0730】

コンセンサスDNA配列を、上に記載したように他のEST配列に関してphrapを使用して構築した。このコンセンサス配列を本明細書中でDNA54206と命名する。いくつかの場合において、DNA54206コンセンサス配列は、BLASTおよびphrapの繰り返しサイクルを使用して伸長された中間コンセンサスDNA配列から得られ、これにより、上記のEST配列の起源を使用してその中間コンセンサス配列をできる限り伸長した。

#### 【0731】

そのDNA54206コンセンサス配列に基づいて、1) 目的の配列を含むcDNAライブラリーをPCRによって同定するため、および2) PRO4989に対する完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。順方向および逆方向PCRプライマーは、一般に20~30ヌクレオチドの範囲であり、約100~1000bp長のPCR産物が得られるように設計されることが多い。プローブ配列は、代表的には40~55bp長である。いくつかの場合において、コンセンサス配列が約1~1.5kbpより大きいとき、さらなるオリゴヌクレオチドを合成する。完全長クローンについていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のDNAを、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, 前出のように、PCRプライマー対を用いてPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよびプライマー対の一方を使用して、目的の遺伝子をコードするクローンを単離した。

#### 【0732】

PCRプライマー(順方向および逆方向)を合成した:

順方向PCRプライマー: 5' - CAAGGTCCTGCGGAATGTCCTCTGG - 3' (配列番号: 158)

逆方向PCRプライマー: 5' - GGGAAAGTCCCTGGAACCTGGTTCCGG - 3' (配列番号: 159)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサスDNA54206配列から構築した:

ハイブリダイゼーションプローブ

5' - CCTCATCAACCTGCGCTAACAAACGAGCTTAAGTCCCTCAACAGCAAG - 3' (配列番号: 160)

cDNAライブラリーを構築するためのRNAをヒト精巣組織から単離した。cDNAクローンを単離するために使用したcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAの試薬などの市販の試薬を使用して標準的な方法によって構築した。cDNAを、NotI部位を含むオリゴdTをプライマーとして増幅し、SalI半リン酸化アダプターに平滑末端で連結し、NotIで切断し、ゲル電気泳動によって適切にサイズ分離し、適当なクローニングベクター(例えば、pRKBまたはpRKD; pRK5Bは、SfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である; Holmes et al., Science, 253: 1278-1280 (1991)を参照のこと)に所定の方向で独特のXhoI部位およびNotI部位においてクローニングした。

#### 【0733】



上で記載したように単離したクローンのDNA配列決定により、完全長PRO4989ポリペプチドに対する完全長DNA配列（本明細書中でDNA80135-2655と命名〔図71，配列番号71〕）およびPRO4989ポリペプチドに対して誘導タンパク質配列が得られた。

#### 【0734】

上で同定した完全長クローンは、ヌクレオチド223-225位の明らかな翻訳開始部位およびヌクレオチド775-777位の終止シグナルを有する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた（図71，配列番号71）。予測されるポリペプチド前駆体は、184アミノ酸長であり、その算出分子量は、約20,509ダルトン、推定pIは、約6.47である。図72（配列番号72）に示す完全長PRO4989配列の解析により、図72に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、その重要なポリペプチドドメインについて与えられる位置は、上記のようにおよそその位置である。

10

#### 【0735】

クローンDNA80135は、1999年6月15日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-234が割り当てられている。

#### 【0736】

図72（配列番号72）に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt35）の解析により、PRO4989アミノ酸配列と以下のDayhoff配列：DDU82512\_\_1；AF061443\_\_1；AF054827\_\_1；AF068919\_\_1；AB016816\_\_1；ATY16046\_\_1；AF068920\_\_1；AF054828\_\_1；CYAA\_\_YEAST；およびCYAA\_\_SCHPOとの間の配列同一性が明らかになった。

20

#### 【0737】

実施例37：ヒトPRO5737ポリペプチド〔UNQ2456〕をコードするcDNAクローンの単離

発現された配列タグ（EST）DNAデータベース（LIFESeq（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto、CA）を、ヒトインターロイキン-1受容体アンタゴニスト（hIL-1Ra）配列に関して検索し、本明細書中で1433156と命名したEST配列が同定され、これは、hIL-1Ra既知タンパク質との相同性を示した。ESTクローン1433156をIncyte Pharmaceuticals（Palo Alto、CA）から購入し、cDNA挿入物を得てその全体を配列決定し、DNA92929-2534配列を得た。

30

#### 【0738】

DNA92929-2534のヌクレオチド配列全体を図73（配列番号73）に示す。

クローンDNA92929-2534は、ヌクレオチド96-98位に明らかな翻訳開始部位およびヌクレオチド498-500に終止コドン（TGA）を有する単一のオープンリーディングフレームを含む（図73；配列番号：73）。

40

#### 【0739】

予測されるポリペプチド前駆体（hIL-1Ra2）は134アミノ酸長である。推定シグナル配列は、アミノ酸1-17位に存在する。クローンDNA92929-2534は、1999年1月12日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203586が割り当てられた。図74に示す完全長hIL-1ra2タンパク質は、約14,927ダルトンの推定分子量および約4.8のpIを有する。

#### 【0740】

完全長配列のBLASTおよびFastA配列アラインメント解析（ALIGN-2コンピュータプログラムを使用）に基づき、hIL-1Ra2（図74、配列番号：74）は、hIL-1Rタンパク質との有意なアミノ酸配列同一性を示す。hIL-1Ra2は

50

、h I L - 1 R のスプライス改変体であると考えられる。

【0741】

実施例38：ヒトPRO5800ポリペプチド[UNQ2500]をコードするcDNAクローンの単離

Swiss-Prot 公的データベースからの約950個の既知の分泌タンパク質の細胞外ドメイン(ECD)配列(もしあれば、分泌シグナル配列を含む)を使用して、ESTデータベースを検索した。そのESTデータベースは、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)を含んでいた。検索は、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2[Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480(1996)]を使用して、ECDタンパク質配列とEST配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70(またはいくつかの場合においては90)またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。

【0742】

コンセンサスDNA配列を、上に記載したように他のEST配列に関してphrapを使用して構築した。このコンセンサス配列を本明細書中でDNA102836と命名する。いくつかの場合において、コンセンサス配列は、BLASTおよびphrapの繰り返しサイクルを使用して伸長された中間コンセンサスDNA配列から得られ、これにより、上記のEST配列の起源を使用してその中間コンセンサス配列をできる限り伸長した。

【0743】

そのDNA102836コンセンサス配列に基づいて、1)目的の配列を含むcDNAライブラリーをPCRによって同定するため、および2)PRO5800に対する完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。順方向および逆方向PCRプライマーは、一般に20~30ヌクレオチドの範囲であり、約100~1000bp長のPCR産物が得られるように設計されることが多い。プローブ配列は、代表的には40~55bp長である。いくつかの場合において、コンセンサス配列が約1~1.5kbpより大きいとき、さらなるオリゴヌクレオチドを合成する。完全長クローンについていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のDNAを、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, 前出のように、PCRプライマー対を用いてPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよびプライマー対の一方を使用して、目的の遺伝子をコードするクローンを単離した。

【0744】

PCRプライマー(順方向および逆方向)を合成した：

順方向PCRプライマー1：5'-CAGCGAACC GG GTGCCGGGTC-3'  
(配列番号：161)

順方向PCRプライマー2：5'-GAGCGACGAGCGCGCAGCGAAC-3'  
(配列番号：162)

順方向PCRプライマー3：

5'-ATACTGCGATCGCTAAACCACCATGCGCCGCGCCCTGTGGCTG-3'(配列番号：163)

逆方向PCRプライマー1：5'-GCCGGCCTCTCAGGGCCTCAG-3'  
(配列番号：164)

逆方向PCRプライマー2：5'-CCCCACGTGTACAGAGCGGATCTC-3'  
(配列番号：165)

逆方向PCRプライマー3：5'-GAGACCAGGACGGGCAAGGAAGTG-3'  
(配列番号：166)

逆方向PCRプライマー4: 5' - C A G G C A C C T T G G G G A G C C G C C - 3' (配列番号: 167)

逆方向PCRプライマー5: 5' - C C C A C G T G T A C A G A G C G G A T C T C - 3' (配列番号: 168)

逆方向PCRプライマー6: 5' - G A G A C C A G G A C G G G C A G G A A G T G - 3' (配列番号: 169)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサスDNA 102836配列から構築した:

ハイブリダイゼーションプローブ

5' - C T C T A C G G G T A C T G C A G G T T C C G G G A G C G C A T C G A A G A G A A C G G - 3' (配列番号: 170)

cDNAライブラリーを構築するためのRNAをヒト胎児肝臓組織から単離した。cDNAクローンを単離するために使用したcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAの試薬などの市販の試薬を使用して標準的な方法によって構築した。cDNAを、NotI部位を含むオリゴdTをプライマーとして増幅し、SalI半リン酸化アダプターに平滑末端で連結し、NotIで切断し、ゲル電気泳動によって適切にサイズ分離し、適当なクローニングベクター(例えば、pRKBまたはpRKD; pRK5Bは、SfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である; Holmes et al., Science, 253: 1278-1280 (1991)を参照のこと)に所定の方向で独特のXhoI部位およびNotI部位においてクローニングした。

【0745】

上で記載したように単離したクローンのDNA配列決定により、完全長PRO5800ポリペプチドに対する完全長DNA配列(本明細書中でDNA 108912-2680と命名[図75, 配列番号75])およびPRO5800ポリペプチドに対して誘導タンパク質配列が得られた。

【0746】

上で同定した完全長クローンは、ヌクレオチド7-9位の明らかな翻訳開始部位およびヌクレオチド517-519位の終止シグナルを有する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた(図75, 配列番号75)。予測されるポリペプチド前駆体は、170アミノ酸長であり、その算出分子量は、約19,663ダルトン、推定pIは、約11.81である。図76(配列番号76)に示す完全長PRO5800配列の解析により、図76に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、その重要なポリペプチドドメインについて与えられる位置は、上記のようにおよその位置である。クローンDNA 108912-2680は、1999年5月25日にATTCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-124が割り当てられている。

【0747】

図76(配列番号76)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO5800アミノ酸配列と以下のDayhoff配列: P\_\_W52595、P\_\_W57313、FGFA\_\_HUMAN、P\_\_W57264、FGFA\_\_RAT、P\_\_W52597、MMU94517\_\_1、FGFA\_\_MOUSE、P\_\_W57306およびD86333\_\_1との間の配列同一性が明らかになった。

【0748】

実施例39: ヒトPRO5993ポリペプチド[UNQ2504]をコードするcDNAクローンの単離

Swiss-Prot公的データベースからの約950個の既知の分泌タンパク質の細胞外ドメイン(ECD)配列(もしあれば、分泌シグナル配列を含む)を使用して、ESTデータベースを検索した。

【0749】

ESTデータベースには、(1)公的ESTデータベース(例えば、Merck/ワシ

10

20

30

40

50

ントン大学)、(2)公的ESTデータベース(LIFESEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA)、(3)Genentechの公的ESTデータベースが含まれた。検索は、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2[Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480(1996)]を使用して、ECDタンパク質配列とEST配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70(またはいくつかの場合においては90)またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。

10

#### 【0750】

このコンセンサス配列を本明細書中でDNA91365と命名する。いくつかの場合において、DNA91365コンセンサス配列は、BLASTおよびphrapの繰り返しサイクルを使用して伸長された中間コンセンサスDNA配列から得られ、これにより、上記のEST配列の起源を使用してその中間コンセンサス配列をできる限り伸長した。

#### 【0751】

そのDNA91365コンセンサス配列に基づいて、1)目的の配列を含むcDNAライブラリーをPCRによって同定するため、および2)PRO5993に対する完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。順方向および逆方向PCRプライマーは、一般に20~30ヌクレオチドの範囲であり、約100~1000bp長のPCR産物が得られるように設計されることが多い。プローブ配列は、代表的には40~55bp長である。いくつかの場合において、コンセンサス配列が約1~1.5kbpより大きいとき、さらなるオリゴヌクレオチドを合成する。完全長クローンについていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のDNAを、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, 前出のように、PCRプライマー対を用いてPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよびプライマー対の一方を使用して、目的の遺伝子をコードするクローンを単離した。

20

#### 【0752】

PCRプライマー(順方向および逆方向)を合成した:

順方向PCRプライマー: 5'CGACCCCAAGCGGATCGAAGGTTTC 3'  
(配列番号: 171)

逆方向PCRプライマー: 5'GTCACCTTCCTGGCACCCAGCTGCTTC 3'  
(配列番号: 172)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサスDNA91365配列から構築した:

ハイブリダイゼーションプローブ

5'GTTAGCAACTCTCTGGCAGCCTTTGCTTACATTAGAGACCACCCG 3'(配列番号: 173)

40

cDNAライブラリーを構築するためのRNAをヒト大動脈内皮組織から単離した。cDNAクローンを単離するために使用したcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAの試薬などの市販の試薬を使用して標準的な方法によって構築した。cDNAを、NotI部位を含むオリゴdTをプライマーとして増幅し、SalI半リン酸化アダプターに平滑末端で連結し、NotIで切断し、ゲル電気泳動によって適切にサイズ分離し、適当なクローニングベクター(例えば、pRKBまたはpRKD; pRK5Bは、SfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である; Holmes et al., Science, 253:1278-1280(1991))を参照のこと)に所定の方

50

#### 【0753】

上で記載したように単離したクローンのDNA配列決定により、完全長PRO5993ポリペプチドに対する完全長DNA配列（本明細書中でDNA100276-2684と命名〔図77，配列番号77〕）およびPRO5993ポリペプチドに対して誘導タンパク質配列が得られた。

#### 【0754】

上で同定した完全長クローンは、ヌクレオチド411-413位の明らかな翻訳開始部位およびヌクレオチド1734-1736位の終止シグナルを有する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた（図77，配列番号77）。予測されるポリペプチド前駆体は、441アミノ酸長であり、その算出分子量は、約49483ダルトン、推定pIは、約6.91である。図78（配列番号78）に示す完全長PRO5993配列の解析により、図78に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、その重要なポリペプチドドメインについて与えられる位置は、上記のようにおよそその位置である。クローンDNA100276-2684は、1999年7月20日にATTCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-380が割り当てられている。

10

#### 【0755】

図78（配列番号78）に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt35）の解析により、PRO5993アミノ酸配列と以下のDayhoff配列：CEF32A7\_\_4；CEF32A7\_\_3；LEG\_\_ANTCR；AF081149\_\_1；P\_\_W74585；HASA131581\_\_1；RNU72487\_\_1；AF111098\_\_1；P\_\_W59050との間の配列同一性が明らかになった。

20

#### 【0756】

実施例40：ヒトPRO6017ポリペプチド〔UNQ2524〕をコードするcDNAクローンの単離

Genentech, Inc. (South San Francisco, CA)によって開発された、企業のシグナル配列探索アルゴリズムをESTに適用することによってDNA96860-2700を同定するだけでなく、クラスター化し、公的データベース（例えば、GenBank）および/または企業データベース（LIFESeq（登録商標），Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA）からESTフラグメントを構築した。そのシグナル配列アルゴリズムは、目的の配列または配列フラグメントの5'-末端の1番目および必要に応じて2番目のメチオニンコドン（ATG）周辺のDNAヌクレオチドの特徴に基づいて分泌シグナルスコアを計算する。1番目のATGの後のヌクレオチドは、いかなる終止コドンも有しない少なくとも35個の明確なアミノ酸をコードしなければならない。1番目のATGが必要なアミノ酸を有する場合、2番目のATGは、試験されない。どちらもが必要条件を満たさない場合、候補配列は、スコア付けされない。EST配列が確実なシグナル配列を含むか否かを判定するために、ATGコドンの周辺のDNA配列および対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られている7つのセンサー（評価パラメータ）のセットを使用してスコア付けする。

30

#### 【0757】

上記のシグナル配列アルゴリズムを使用することにより、LIFESeq（登録商標）データベース，Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CAからESTクラスター配列が同定でき同定でき、本明細書中でCLU98611と命名する。次いで、そのESTクラスター配列を、公的ESTデータベース（例えば、GenBank）および企業のEST DNAデータベース（LIFESeq（登録商標），Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（EST）データベースと比較することにより、存在する相同性を同定した。相同性検索を、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2（Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)）を使用して行った。既知のタンパク質をコードしなかった、B

40

50

LASTスコアが70（またはいくつかの場合においては90）またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、本明細書中でDNA82392と命名する。

#### 【0758】

DNA82392配列とLIFESSEQ（登録商標）データベース由来のクローン番号653153に包含されるEST配列との間の配列相同性に鑑みて、Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA, クローン番号653153を購入し、そのcDNA挿入断片を得て、配列決定した。このcDNA挿入断片が、完全長タンパク質をコードしていることが見出された。このcDNA挿入断片の配列を図79に示し、本明細書中でDNA96860-2700と命名する。

10

#### 【0759】

クローンDNA96860-2700は、ヌクレオチド83-85位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド1667-1669位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる（図79；配列番号79）。予測されるポリペプチド前駆体は、528アミノ酸長である（図80）。図80に示される完全長PRO6017タンパク質は、推定分子量が約59,000ダルトン、pIが約8.73である。図80（配列番号80）に示す完全長PRO6017配列の解析により、図80に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、その重要なポリペプチドドメインについて与えられる位置は、上記のようにおよそその位置である。クローンDNA96860-2700は、1999年8月3日にATTCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-478が割り当てられている。

20

#### 【0760】

図80（配列番号80）に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt35）の解析により、PRO6017アミノ酸配列と以下のDayhoff配列：HSA011001\_\_1；P\_\_W36903；HSH6\_\_1；AF111092\_\_1；GEN14046；P\_\_W48756；AC004262\_\_1；AF031573\_\_1；P\_\_W07600；P\_\_W37412との間の配列同一性が明らかになった。

30

#### 【0761】

実施例41：ヒトPRO7174ポリペプチド[UNQ2784]をコードするcDNAクローンの単離

Genentech, Inc. (South San Francisco, CA)によって開発された、企業のシグナル配列探索アルゴリズムをESTに適用することによってDNA96883-2745を同定するだけでなく、クラスター化し、公的データベース（例えば、GenBank）および/または企業データベース（LIFESSEQ（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA）からESTフラグメントを構築した。そのシグナル配列アルゴリズムは、目的の配列または配列フラグメントの5'-末端の1番目および必要に応じて2番目のメチオニンコドン（ATG）周辺のDNAヌクレオチドの特徴に基づいて分泌シグナルスコアを計算する。1番目のATGの後のヌクレオチドは、いかなる終止コドンも有しない少なくとも35個の明確なアミノ酸をコードしなければならない。1番目のATGが必要なアミノ酸を有する場合、2番目のATGは、試験されない。どちらもが必要条件を満たさない場合、候補配列は、スコア付けされない。EST配列が確実なシグナル配列を含むか否かを判定するために、ATGコドンの周辺のDNA配列および対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られている7つのセンサー（評価パラメータ）のセットを使用してスコア付けする。

40

#### 【0762】

上記のシグナル配列アルゴリズムを使用することにより、LIFESSEQ（登録商標）

50

データベース, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA から EST クラスター配列が同定でき同定でき、本明細書中で CLU92188 と命名する。次いで、その EST クラスター配列を、公的 EST データベース (例えば、GenBank) および企業の EST DNA データベース (LIFESEQ (登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) を含む種々の発現配列タグ (EST) データベースと比較することにより、存在する相同性を同定した。相同性検索を、コンピュータプログラム BLAST または BLAST2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266: 460 - 480 (1996)) を使用して行った。既知のタンパク質をコードしなかった、BLAST スコアが 70 (またはいくつかの場合においては 90) またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington) を用いてコンセンサス DNA 配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、本明細書中で DNA83604 と命名する。

10

#### 【0763】

DNA83604 配列と LIFESEQ (登録商標) データベース由来のクローン番号 3362284 に包含される EST 配列との間の配列相同性に鑑みて、Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA, クローン番号 3362284 を購入し、その cDNA 挿入断片を得て、配列決定した。この cDNA 挿入断片が、完全長タンパク質をコードしていることが見出された。この cDNA 挿入断片の配列を図 81 に示し、本明細書中で DNA96883 - 2745 と命名する。

20

#### 【0764】

クローン DNA96883 - 2745 は、ヌクレオチド 3 - 5 位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド 1545 - 1547 位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる (図 81; 配列番号 81)。予測されるポリペプチド前駆体は、514 アミノ酸長である (図 82)。図 82 に示される完全長 PRO7174 タンパク質は、推定分子量が約 55,687 ダルトン、pI が約 8.78 である。図 82 (配列番号 82) に示す完全長 PRO7174 配列の解析により、図 82 に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、その重要なポリペプチドドメインについて与えられる位置は、上記のようにおよそその位置である。クローン DNA96883 - 2745 は、1999 年 8 月 17 日に ATTC に寄託され、ATCC 寄託番号 PTA-544 が割り当てられている。

30

#### 【0765】

図 82 (配列番号 82) に示される完全長配列の WU-BLAST2 配列アラインメント解析を使用した Dayhoff データベース (バージョン 35.45 SwissProt35) の解析により、PRO7174 アミノ酸配列と以下の Dayhoff 配列: RNU44129\_\_1; ER53\_\_HUMAN; XLU44130\_\_1; P\_\_W88699; VP36\_\_CANFA; G01447; P\_\_W67846; P\_\_W67963; HSE R G I C P 0 2 \_\_1; および CCAD\_\_CHICK との間の配列同一性が明らかになった。

40

#### 【0766】

実施例 42: ヒト PRO9744 ポリペプチド [UNQ3003] をコードする cDNA クローンの単離

天然のヒト PRO9744 ポリペプチドをコードする cDNA クローン (DNA136110 - 2763) は、CARD ドメイン含有分子 SOCA-1 を用いて同定された。より具体的には、SOCA-1 の N 末端部分をコードする cDNA 断片を用いて、ヒト胎児腎臓ライブラリーをスクリーニングした。

いくつかの陽性コロニーを選出し、DNA を調製して配列決定した。

DNA 配列決定により、cDNA クローンの 1 つが、ヒト Rac タンパク質に相同な本明細書中で DNA136110 - 2763 と命名する完全長オープンリーディングフレーム

50

タンパク質をコードするを含むことが明らかになった。

【0767】

クローンDNA 136110 - 2763は、ヌクレオチド242 - 244位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド1334 - 1336位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる(図83; 配列番号83)。予測されるポリペプチド前駆体は、364アミノ酸長である(図84; 配列番号84)。図84に示される完全長PRO9744タンパク質は、推定分子量が約42195ダルトン、pIが約7.4である。図84(配列番号84)に示す完全長PRO9744配列の解析により、図84に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、その重要なポリペプチドドメインについて与えられる位置は、上記のようにおよその位置である。

10

クローンDNA 136110 - 2763は、1999年9月14日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA - 652が割り当てられている。

【0768】

図84に示す完全長配列(配列番号: 84)のALIGN - 2配列アラインメント解析を用いたDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の解析により、PRO9744アミノ酸配列と以下のDayhoff配列: KRA C\_\_D I C D I、KAPC\_\_D I C D I、PK2\_\_D I C D I、KAPC\_\_D R O M E、GEN13181、GEN12288、P\_\_R95911、TCU63742\_\_1、SGK\_\_HUMANおよびAF135794\_\_1との配列同一性が示された。

20

【0769】

実施例43: ヒトPRO9821ポリペプチド[UNQ3023]をコードするcDNAクローンの単離

Genentech, Inc. (South San Francisco, CA)によって開発された、企業のシグナル配列探索アルゴリズムをESTに適用することによってDNA108725 - 2766を同定するだけでなく、クラスター化し、公的データベース(例えば、GenBank)および/または企業データベース(LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA)からESTフラグメントを構築した。そのシグナル配列アルゴリズムは、目的の配列または配列フラグメントの5' - 末端の1番目および必要に応じて2番目のメチオニンコドン(ATG)周辺のDNAヌクレオチドの特徴に基づいて分泌シグナルスコアを計算する。1番目のATGの後のヌクレオチドは、いかなる終止コドンも有しない少なくとも35個の明確なアミノ酸をコードしなければならない。1番目のATGが必要なアミノ酸を有する場合、2番目のATGは、試験されない。どちらもが必要条件を満たさない場合、候補配列は、スコア付けされない。EST配列が確実なシグナル配列を含むか否かを判定するために、ATGコドンの周辺のDNA配列および対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られている7つのセンサー(評価パラメータ)のセットを使用してスコア付けする。

30

【0770】

上記のシグナル配列アルゴリズムを使用することにより、IncyteデータベースからEST配列が同定でき同定でき、本明細書中でDNA21277と命名する。次いで、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)および企業のEST DNAデータベース(LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(EST)データベースとこのEST配列を比較することにより、存在する相同性を同定した。相同性検索を、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2(Altschul et al., Methods in Enzymology 266: 460 - 480 (1996))を使用して行った。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70(またはいくつかの場合においては90)またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)を用いてコンセンサ

40

50



スDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、本明細書中でDNA 91971と命名する。

#### 【0771】

DNA 91971配列とIncyteデータベースのクローン番号3232833H1に含まれるEST配列との間で観察された配列相同性に鑑み、クローン番号3232833を購入し、cDNA挿入物を得て、配列決定した。

このcDNA挿入断片が、完全長タンパク質をコードしていることが見出された。このcDNA挿入断片の配列を図85に示し、本明細書中でDNA 108725-2766と命名する。

#### 【0772】

10

クローンDNA 108725-2766は、ヌクレオチド196-198位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド709-711位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる(図85;配列番号85)。

予測されるポリペプチド前駆体を図86に示す。図86に示す完全長PRO9821タンパク質は約19118ダルトンの推定分子量および約5.99のpIを有する。

図86(配列番号86)に示す完全長PRO9821配列の解析により、図86に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、その重要なポリペプチドドメインについて与えられる位置は、上記のようにおよその位置である。クローンDNA 108725-2766は、1999年10月19日にATTCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-863が割り当てられている。

20

#### 【0773】

図86(配列番号86)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO9821アミノ酸配列と以下のDayhoff配列: P\_\_Y27573;UPAR\_\_MOUSE;UPAR\_\_RAT;S42152;SP63\_\_STRPU;AF007789\_\_1;CELLR11F4\_\_1;LY6A\_\_MOUSE;P\_\_Y02738;およびAF141377\_\_1との間の配列同一性が明らかになった。

#### 【0774】

実施例44: ヒトPRO9852ポリペプチド[UNQ3037]をコードするcDNAクローンの単離

30

Genentech, Inc. (South San Francisco, CA)によって開発された、企業のシグナル配列探索アルゴリズムをESTに適用することによってDNA 129332-2775を同定するだけでなく、クラスター化し、公的データベース(例えば、GenBank)および/または企業データベース(LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA)からESTフラグメントを構築した。そのシグナル配列アルゴリズムは、目的の配列または配列フラグメントの5'-末端の1番目および必要に応じて2番目のメチオニンコドン(ATG)周辺のDNAヌクレオチドの特徴に基づいて分泌シグナルスコアを計算する。1番目のATGの後のヌクレオチドは、いかなる終止コドンも有しない少なくとも35個の明確なアミノ酸をコードしなければならない。1番目のATGが必要なアミノ酸を有する場合、2番目のATGは、試験されない。どちらもが必要条件を満たさない場合、候補配列は、スコア付けされない。EST配列が確実なシグナル配列を含むか否かを判定するために、ATGコドンの周辺のDNA配列および対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られている7つのセンサー(評価パラメータ)のセットを使用してスコア付けする。

40

#### 【0775】

上記のシグナル配列アルゴリズムの使用によって、DNA 124065コンセンサス配列の同定が可能となり、この配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成した。

これらのオリゴヌクレオチドを用いて、1)目的の配列を含むcDNAライブラリーをPCRによって同定するため、および2)PRO9852についての完全長コード配列のク

50

ローンを単離するためのプローブとして使用するために順方向および逆方向PCRプライマーは、一般に20～30ヌクレオチドの範囲であり、約100～1000bp長のPCR産物が得られるように設計されることが多い。プローブ配列は、代表的には40～55bp長である。いくつかの場合において、コンセンサス配列が約1～1.5kbpより大きいとき、さらなるオリゴヌクレオチドを合成する。完全長クローンについていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のDNAを、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, 前出のように、PCRプライマー対を用いてPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよびプライマー対の一方を使用して、目的の遺伝子をコードするクローンを単離した。

10

#### 【0776】

PCRプライマー（順方向および逆方向）を合成した：

順方向PCRプライマー：5' - CGATACTCGCGGGAGGCTAAC - 3'

（配列番号：174）

逆方向PCRプライマー：5' - CCTTCTGTGGGTGTCTCCAGTTAGCG - 3' （配列番号：175）

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサスDNA124065配列から構築した：

ハイブリダイゼーションプローブ

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

20

cDNAライブラリーを構築するためのRNAをヒト胎児腎臓組織から単離した。cDNAクローンを単離するために使用したcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAの試薬などの市販の試薬を使用して標準的な方法によって構築した。cDNAを、NotI部位を含むオリゴdTをプライマーとして増幅し、SalI半リン酸化アダプターに平滑末端で連結し、NotIで切断し、ゲル電気泳動によって適切にサイズ分離し、適当なクローニングベクター（例えば、pRKBまたはpRKD；pRK5Bは、SfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である；Holmes et al., Science, 253: 1278 - 1280 (1991)を参照のこと）に所定の方

30

#### 【0777】

上で記載したように単離したクローンのDNA配列決定により、完全長PRO9852ポリペプチドに対する完全長DNA配列（本明細書中でDNA129332 - 2775と命名〔図87，配列番号87〕）およびPRO9852ポリペプチドに対して誘導タンパク質配列が得られた。

#### 【0778】

クローンDNA129332 - 2775は、ヌクレオチド18 - 20位の明らかな翻訳開始部位を有し、ヌクレオチド1296 - 1298位の終止コドンで終結する単一のオープンリーディングフレームを含んでいる（図87）。予測されるポリペプチド前駆体は、426アミノ酸長である（図88）。図88に示される完全長PRO9852タンパク質は、推定分子量が約46,884ダルトン、pIが約7.01である。図88（配列番号88）に示す完全長PRO9852配列の解析により、図88に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、その重要なポリペプチドドメインについて与えられる位置は、上記のようにおよそその位置である。クローンDNA129332 - 2775は、1999年11月9日にATTCに寄託され、ATCC寄託番号PTA - 944が割り当てられている。

40

#### 【0779】

図88（配列番号88）に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt35）の解析により、PRO9852アミノ酸配列と以下のDayhoff配列：C

50

7 0 6 4 3 ; P \_ Y 1 9 5 5 7 ; A 7 2 1 1 4 ; B 7 1 5 5 1 ; S 7 4 7 0 5 ; H 7 0 7  
9 3 ; F 6 9 8 1 2 ; T 0 8 7 1 5 ; P \_ Y 3 4 7 5 0 ; P \_ W 1 4 4 5 0 との間の配列  
同一性が明らかになった。

#### 【 0 7 8 0 】

実施例 4 5 : ヒト P R O 9 8 7 3 ポリペプチド [ U N Q 3 0 5 4 ] をコードする c D N A  
A クロンの単離

S w i s s - P r o t 公的データベースからの約 9 5 0 個の既知の分泌タンパク質の細  
胞外ドメイン ( E C D ) 配列 ( もしあれば、分泌シグナル配列を含む ) を使用して、E S  
T データベースを検索した。

E S T データベースには、( 1 ) 公的 E S T データベース ( 例えば、G e n B a n k ) 、  
( 2 ) 公的 E S T データベース ( L I F E S E Q ( 登録商標 ) 、I n c y t e P h a r  
m a c e u t i c a l s 、P a l o A l t o 、C A ) 、および ( 3 ) G e n e n t e c h  
h の公的 E S T データベースが含まれた。

10

検索は、コンピュータプログラム B L A S T または B L A S T 2 [ A l t s c h u l e  
t a l . , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , 2 6 6 : 4 6 0 - 4 8 0 ( 1 9 9 6 ) ] を使用して、E C D タンパク質配列と E S T 配列の 6 フレーム翻訳との比較  
として実施した。既知のタンパク質をコードしなかった、B L A S T スコアが 7 0 ( また  
はいくつかの場合においては 9 0 ) またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し  
、そしてプログラム「p h r a p」( P h i l G r e e n , U n i v e r s i t y o f  
W a s h i n g t o n , S e a t t l e , W a s h i n g t o n ) を用いてコンセン  
サス D N A 配列を構築した。

20

#### 【 0 7 8 1 】

コンセンサス D N A 配列を、上に記載したように他の E S T 配列に関して p h r a p を  
使用して構築した。このコンセンサス配列を本明細書中で D N A 1 1 7 9 4 2 と命名する  
。いくつかの場合において、コンセンサス配列は、B L A S T および p h r a p の繰り返し  
サイクルを使用して伸長された中間コンセンサス D N A 配列から得られ、これにより、  
上記の E S T 配列の起源を使用してその中間コンセンサス配列をできる限り伸長した。

#### 【 0 7 8 2 】

その D N A 1 1 7 9 4 2 コンセンサス配列に基づいて、1 ) 目的の配列を含む c D N A  
ライブラリーを P C R によって同定するため、および 2 ) P R O 9 8 7 3 に対する完全長  
コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチ  
ドを合成した。順方向および逆方向 P C R プライマーは、一般に 2 0 ~ 3 0 ヌクレオチ  
ドの範囲であり、約 1 0 0 ~ 1 0 0 0 b p 長の P C R 産物が得られるように設計されることが  
多い。プローブ配列は、代表的には 4 0 ~ 5 5 b p 長である。いくつかの場合において  
、コンセンサス配列が約 1 ~ 1 . 5 k b p より大きいとき、さらなるオリゴヌクレオチ  
ドを合成する。完全長クローンについていくつかのライブラリーをスクリーニングするた  
めに、そのライブラリー由来の D N A を、A u s u b e l e t a l . , C u r r e n t  
P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , 前出のように、P  
C R プライマー対を用いて P C R 増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライ  
ブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよびプライマー対の一方を使用して、  
目的の遺伝子をコードするクローンを単離した。

30

40

#### 【 0 7 8 3 】

P C R プライマー ( 順方向および逆方向 ) を合成した :

順方向 P C R プライマー : 5 ' - C A G A A A A A A G G A A G A T G G C A A G - 3 '  
( 配列番号 : 1 7 7 ) ;

順方向 P C R プライマー : 5 ' - G G C A A G A A T A T T G T T A C T T T T C C T C  
C C G - 3 ' ( 配列番号 : 1 7 8 ) ;

逆方向 P C R プライマー : 5 ' - T T A C C A G C T T T G A G T A C A C A T A G A -  
3 ' ( 配列番号 : 1 7 9 ) ; および

逆方向 P C R プライマー : 5 ' - A A C G T T A A T G A A T C T A C A G T C C G G G

50

G C - 3 ' ( 配列番号 : 1 8 0 ) 。

【 0 7 8 4 】

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサスDNA 1 1 7 9 4 2 配列から構築した：

ハイブリダイゼーションプローブ

5 ' - G G T C C A T A A A T A T T C C A T G C A C A G C A C A T A C A G C C A C A A G A C C C G G G A G G - 3 ' ( 配列番号 : 1 8 1 ) ；およびハイブリダイゼーションプローブ

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

cDNAライブラリーを構築するためのRNAをヒト脳組織から単離した。cDNAクローンを単離するために使用したcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAの試薬などの市販の試薬を使用して標準的な方法によって構築した。

【 0 7 8 5 】

cDNAを、NotI部位を含むオリゴdTをプライマーとして増幅し、SalI半リン酸化アダプターに平滑末端で連結し、NotIで切断し、ゲル電気泳動によって適切にサイズ分離し、適当なクローニングベクター（例えば、pRKBまたはpRKD；pRK5Bは、SfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である；Holmes et al., Science, 253:1278-1280 (1991)を参照のこと）に所定の方向で独特のXhoI部位およびNotI部位においてクローニングした。

【 0 7 8 6 】

上で記載したように単離したクローンのDNA配列決定により、完全長PRO9873ポリペプチドに対する完全長DNA配列（本明細書中でDNA 1 4 3 0 7 6 - 2 7 8 7と命名[図89, 配列番号89]）およびPRO9873ポリペプチドに対して誘導タンパク質配列が得られた。

【 0 7 8 7 】

上で同定した完全長クローンは、ヌクレオチド38 - 40位の明らかな翻訳開始部位およびヌクレオチド422 - 444位の終止シグナルを有する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた（図89, 配列番号89）。予測されるポリペプチド前駆体は、128アミノ酸長であり、その算出分子量は、約14332ダルトン、推定pIは、約4.83である。図90（配列番号90）に示す完全長PRO9873配列の解析により、図90に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、その重要なポリペプチドドメインについて与えられる位置は、上記のようにおよその位置である。クローンDNA 1 4 3 0 7 6 - 2 7 8 7は、1999年12月7日にATTCに寄託され、ATCC寄託番号PTA - 1 0 2 8が割り当てられている。

【 0 7 8 8 】

図90（配列番号90）に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt35）の解析により、PRO9873アミノ酸配列と以下のDayhoff配列：MIA\_\_HUMAN、A42965\_\_1、P\_\_R69811、MIA\_\_BOVIN、RNU67884\_\_1、GEN14164、MIA\_\_MOUSE、P\_\_R69812、P\_\_Y24788, およびP\_\_Y22236との間の配列同一性が明らかになった。

【 0 7 8 9 】

実施例46：ヒトPRO10196ポリペプチド[UNQ3115]をコードするcDNAクローンの単離

Swiss-Prot公的データベースからの約950個の既知の分泌タンパク質の細胞外ドメイン（ECD）配列（もしあれば、分泌シグナル配列を含む）を使用して、ESTデータベースを検索した。そのESTデータベースは、（1）公的ESTデータベース（例えば、GenBank）および（2）企業のESTデータベース（LIFESEQ（

10

20

30

40

50

登録商標)、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含んでいた。検索は、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2[Altschul et al., Methods in Enzymology, 266: 460-480 (1996)]を使用して、ECDタンパク質配列とEST配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードしなかった、BLASTスコアが70(またはいくつかの場合においては90)またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)を用いてコンセンサスDNA配列を構築した。

#### 【0790】

コンセンサスDNA配列を、上に記載したように他のEST配列に関してphrapを使用して構築した。このコンセンサス配列を本明細書中でDNA139146と命名する。いくつかの場合において、コンセンサス配列は、BLASTおよびphrapの繰り返しサイクルを使用して伸長された中間コンセンサスDNA配列から得られ、これにより、上記のEST配列の起源を使用してその中間コンセンサス配列をできる限り伸長した。

#### 【0791】

次いで、ESTクローン番号5398353をLIFEESEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CAから購入し、該クローンのcDNA挿入物を得て全体を配列決定した。

#### 【0792】

上記のクローンから得た挿入物のDNA配列決定により、完全長PRO10196ポリペプチド(本明細書中でDNA144841-2816と命名する[図91、配列番号: 91])の完全長DNA配列が得られ、該PRO10196ポリペプチドの誘導タンパク質配列が得られた。

#### 【0793】

上で同定した完全長クローンは、ヌクレオチド151-153位の明らかな翻訳開始部位およびヌクレオチド775-777位の終止シグナルを有する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた(図91、配列番号91)。予測されるポリペプチド前駆体は、208アミノ酸長であり、その算出分子量は、約22187ダルトン、推定pIは、約5.08である。図92(配列番号92)に示す完全長PRO10196配列の解析により、図92に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、その重要なポリペプチドドメインについて与えられる位置は、上記のようにおよそその位置である。クローンDNA144841-2816は、2000年1月11日にATTCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-1188が割り当てられている。

#### 【0794】

図92(配列番号92)に示される完全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント解析を使用したDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt35)の解析により、PRO10196アミノ酸配列と以下のDayhoff配列: P\_\_Y08581、rFGF19\_\_1、AB018122\_\_1、AF110400\_\_1、P\_\_Y08582、FGFF\_\_MOUSE、FGF6\_\_MOUSE、P\_\_R80781およびP\_\_R70825との間の配列同一性が明らかになった。

#### 【0795】

実施例47: ヒトPRO21956ポリペプチド[UNQ6973]をコードするcDNAクローンの単離

Swiss-Prot公的データベースからの約950個の既知の分泌タンパク質の細胞外ドメイン(ECD)配列(もしあれば、分泌シグナル配列を含む)を使用して、ESTデータベースを検索した。

データベースには、公的データベース(例えば、GenBank)が含まれた。この場合、GenBankのゲノムDNA配列を、スタンフォード大学から使用許諾された遺伝子予測プログラムENSCANを用いて解析した。GENSCAN解析により、遺伝子コー

10

20

30

40

50

ド領域が予測され、E C D 検索に供され得る配列がもたらされる。検索は、コンピュータプログラム B L A S T または B L A S T 2 [ A l t s c h u l e t a l . , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , 2 6 6 : 4 6 0 - 4 8 0 ( 1 9 9 6 ) ] を使用して、E C D タンパク質配列と E S T 配列の 6 フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードしなかった、B L A S T スコアが 7 0 ( またはいくつかの場合においては 9 0 ) またはそれ以上であった比較結果を、クラスター化し、そしてプログラム「p h r a p」( P h i l G r e e n , U n i v e r s i t y o f W a s h i n g t o n , S e a t t l e , W a s h i n g t o n ) を用いてコンセンサス D N A 配列を構築した。

#### 【 0 7 9 6 】

コンセンサス D N A 配列を構築した。このコンセンサス配列を本明細書中で D N A 1 4 6 8 2 2 と命名する。

#### 【 0 7 9 7 】

その D N A 1 4 6 8 2 2 コンセンサス配列に基づいて、1) 目的の配列を含む c D N A ライブラリーを P C R によって同定するため、および 2) P R O 2 1 9 5 6 に対する完全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとして使用するためにオリゴヌクレオチドを合成した。順方向および逆方向 P C R プライマーは、一般に 2 0 ~ 3 0 ヌクレオチドの範囲であり、約 1 0 0 ~ 1 0 0 0 b p 長の P C R 産物が得られるように設計されることが多い。プローブ配列は、代表的には 4 0 ~ 5 5 b p 長である。いくつかの場合において、コンセンサス配列が約 1 ~ 1 . 5 k b p より大きいとき、さらなるオリゴヌクレオチドを合成する。完全長クローンについていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来の D N A を、A u s u b e l e t a l . , C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , 前出のように、P C R プライマー対を用いて P C R 増幅によってスクリーニングした。次いで、陽性のライブラリーを使用し、プローブオリゴヌクレオチドおよびプライマー対の一方を使用して、目的の遺伝子をコードするクローンを単離した。

#### 【 0 7 9 8 】

P C R プライマー ( 順方向および逆方向 ) を合成した :

順方向 P C R プライマー :

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

逆方向 P C R プライマー :

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

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有するコンセンサス D N A 1 4 6 8 2 2 配列から構築した :

ハイブリダイゼーションプローブ

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

種々の組織に由来する 5 0 の異なるヒト c D N A ライブラリーのプールをクローニングに使用した。

c D N A クローンを単離するために使用した c D N A ライブラリーは、I n v i t r o g e n , S a n D i e g o , C A の試薬などの市販の試薬を使用して標準的な方法によって構築した。c D N A を、N o t I 部位を含むオリゴ d T をプライマーとして増幅し、S a l I 半リン酸化アダプターに平滑末端で連結し、N o t I で切断し、ゲル電気泳動によって適切にサイズ分離し、適当なクローニングベクター ( 例えば、p R K B または p R K D ; p R K 5 B は、S f i I 部位を含まない p R K 5 D の前駆体である ; H o l m e s e t a l . , S c i e n c e , 2 5 3 : 1 2 7 8 - 1 2 8 0 ( 1 9 9 1 ) を参照のこと ) に所定の方向で独特の X h o I 部位および N o t I 部位においてクローニングした。

#### 【 0 7 9 9 】

上で記載したように単離したクローンの D N A 配列決定により、完全長 P R O 2 1 9 5

10

20

30

40

50

6 ポリペプチドに対する完全長 DNA 配列（本明細書中で DNA 1 7 8 5 5 1 - 2 9 8 6 と命名 [ 図 9 7 , 配列番号 9 7 ] ）および PRO 2 1 9 5 6 ポリペプチドに対して誘導タンパク質配列が得られた。

【 0 8 0 0 】

上で同定した完全長クローンは、ヌクレオチド 7 4 - 7 6 位の明らかな翻訳開始部位およびヌクレオチド 1 1 4 5 - 1 1 4 7 位の終止シグナルを有する単一のオープンリーディングフレームを含んでいた（図 9 7 , 配列番号 9 7 ）。予測されるポリペプチド前駆体は、3 5 7 アミノ酸長であり、その算出分子量は、約 3 9 0 0 1 ダルトン、推定 p I は、約 9 . 2 8 である。図 9 8 （配列番号 9 8 ）に示す完全長 PRO 2 1 9 5 6 配列の解析により、図 9 8 に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、その重要なポリペプチドドメインについて与えられる位置は、上記のようにおよその位置である。クローン DNA 1 7 8 5 1 1 - 2 9 8 6 は、2 0 0 0 年 9 月 1 2 日に A T T C に寄託され、A T C C 寄託番号 P T A - 2 4 5 2 が割り当てられている。

10

【 0 8 0 1 】

図 9 8 （配列番号 9 8 ）に示す完全長配列の A L I G N - 2 配列アラインメント解析を使用したタンパク質データベース（バージョン 3 5 . 4 5 S w i s s P r o t 3 5 ）の解析により、PRO 2 1 9 5 6 アミノ酸配列と以下のタンパク質配列：WN 1 4 \_ C H I C K との間の配列同一性が明らかになった。

【 0 8 0 2 】

実施例 48 : PRO 2 2 6 、 PRO 2 5 7 、 PRO 2 6 8 、 PRO 2 9 0 、 PRO 3 6 0 0 6 、 PRO 3 6 3 、 PRO 3 6 5 、 PRO 3 8 2 、 PRO 4 4 4 、 PRO 7 0 5 、 PRO 1 0 7 1 、 PRO 1 1 2 5 、 PRO 1 1 3 4 、 PRO 1 1 5 5 、 PRO 1 2 8 1 、 PRO 1 3 4 3 、 PRO 1 3 7 9 、 PRO 1 3 8 0 、 PRO 1 3 8 7 、 PRO 1 4 1 9 、 PRO 1 4 3 3 、 PRO 1 4 7 4 、 PRO 1 5 5 0 、 PRO 1 5 7 1 、 PRO 1 5 7 2 、 PRO 1 7 5 9 、 PRO 1 9 0 4 、 PRO 3 5 1 9 3 、 PRO 4 3 4 1 、 PRO 4 3 4 8 、 PRO 4 3 6 9 、 PRO 4 3 8 1 、 PRO 4 4 0 7 、 PRO 4 4 2 5 、 PRO 4 9 8 5 、 PRO 4 9 8 9 、 PRO 5 7 3 7 、 PRO 5 8 0 0 、 PRO 5 9 9 3 、 PRO 6 0 1 7 、 PRO 7 1 7 4 、 PRO 9 7 4 4 、 PRO 9 8 2 1 、 PRO 9 8 5 2 、 PRO 9 8 7 3 、 PRO 1 0 1 9 6 、 PRO 3 4 7 7 8 、 PRO 2 0 2 3 3 、 PRO 2 1 9 5 6 、 PRO 5 7 2 9 0 、 PRO 3 8 4 6 5 、 PRO 3 8 6 8 3 または PRO 8 5 1 6 1 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

20

30

PRO 2 2 6 、 PRO 2 5 7 、 PRO 2 6 8 、 PRO 2 9 0 、 PRO 3 6 0 0 6 、 PRO 3 6 3 、 PRO 3 6 5 、 PRO 3 8 2 、 PRO 4 4 4 、 PRO 7 0 5 、 PRO 1 0 7 1 、 PRO 1 1 2 5 、 PRO 1 1 3 4 、 PRO 1 1 5 5 、 PRO 1 2 8 1 、 PRO 1 3 4 3 、 PRO 1 3 7 9 、 PRO 1 3 8 0 、 PRO 1 3 8 7 、 PRO 1 4 1 9 、 PRO 1 4 3 3 、 PRO 1 4 7 4 、 PRO 1 5 5 0 、 PRO 1 5 7 1 、 PRO 1 5 7 2 、 PRO 1 7 5 9 、 PRO 1 9 0 4 、 PRO 3 5 1 9 3 、 PRO 4 3 4 1 、 PRO 4 3 4 8 、 PRO 4 3 6 9 、 PRO 4 3 8 1 、 PRO 4 4 0 7 、 PRO 4 4 2 5 、 PRO 4 9 8 5 、 PRO 4 9 8 9 、 PRO 5 7 3 7 、 PRO 5 8 0 0 、 PRO 5 9 9 3 、 PRO 6 0 1 7 、 PRO 7 1 7 4 、 PRO 9 7 4 4 、 PRO 9 8 2 1 、 PRO 9 8 5 2 、 PRO 9 8 7 3 、 PRO 1 0 1 9 6 、 PRO 3 4 7 7 8 、 PRO 2 0 2 3 3 、 PRO 2 1 9 5 6 、 PRO 5 7 2 9 0 、 PRO 3 8 4 6 5 、 PRO 3 8 6 8 3 または PRO 8 5 1 6 1 ポリペプチドの役割を調査するため、PRO 2 2 6 、 PRO 2 5 7 、 PRO 2 6 8 、 PRO 2 9 0 、 PRO 3 6 0 0 6 、 PRO 3 6 3 、 PRO 3 6 5 、 PRO 3 8 2 、 PRO 4 4 4 、 PRO 7 0 5 、 PRO 1 0 7 1 、 PRO 1 1 2 5 、 PRO 1 1 3 4 、 PRO 1 1 5 5 、 PRO 1 2 8 1 、 PRO 1 3 4 3 、 PRO 1 3 7 9 、 PRO 1 3 8 0 、 PRO 1 3 8 7 、 PRO 1 4 1 9 、 PRO 1 4 3 3 、 PRO 1 4 7 4 、 PRO 1 5 5 0 、 PRO 1 5 7 1 、 PRO 1 5 7 2 、 PRO 1 7 5 9 、 PRO 1 9 0 4 、 PRO 3 5 1 9 3 、 PRO 4 3 4 1 、 PRO 4 3 4 8 、 PRO 4 3 6 9 、 PRO 4 3 8 1 、 PRO 4 4 0 7 、 PRO 4 4 2 5 、 PRO 4 9 8 5 、 PRO 4 9 8 9 、 PRO 5 7 3 7 、 PRO 5 8 0 0 、 PRO 5 9 9 3 、 PRO 6 0 1 7 、 PRO

40

50

7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161遺伝子における破壊を、相同組換えまたはレトロウイルス挿入技術によって作出した。具体的には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161遺伝子に破壊を含むトランスジェニックマウス（すなわち、ノックアウトマウス）を、遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラッピングのいずれかによって作出した。サザンブロット解析により変異を確認することにより、5'末端と3'末端の両方における正確なターゲティングを確認した。挿入部位に隣接するエクソンにアニーリングするプライマーを使用したRT-PCRによって裏付けられるように、遺伝子特異的なジェノタイピングをゲノムPCRによって行うことにより、内在性の天然の転写物が失われていることが確認された。ターゲティングベクターを129系統のES細胞に電気穿孔し、標的クローンを同定した。標的クローンを宿主胚盤胞に微量注入することにより、キメラを作製した。キメラをC57動物と交雑し、F1ヘテロ接合体を作製した。ヘテロ接合体を交雑受精することにより、F2野生型、ヘテロ接合体およびホモ接合体コホートを作製し、表現型解析に使用した。まれに、F1ヘテロ接合体が十分に作製されない場合に、そのF1ヘテロ接合体を野生型C57マウスと交雑することにより、十分なヘテロ接合体を得て、表現型の解析用のコホートと交雑させた。すべての表現型解析を生後12～16週から実施した。

#### 【0803】

表現型結果の全体的な概要：

48.1.DNA33460-1166(UNQ200)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO226ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA33460-1166と命名)(UNQ200)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_021474ムス・ムスクルス上皮細胞増殖因子含有フィブリン様細胞外マトリックスタンパク質2(Efemp2)；参照タンパク質：

Q9J M06 Q9J M06 Q9J M06 EGF-CONTAINING FIBULIN-LIKE EXTRACELLULAR M；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_016938 ACCESSION：NM\_016938 NID：8393298ホモ・サピエンスホモ・サピエンスEGF含有フィブリン様細胞外マトリックスタンパク質2(EFEMP2)；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

O95967 FBL4\_HUMAN O95967 EGF-CONTAINING FIBULIN-LIKE EXTRACELLUL.

#### 【0804】

目的のマウス遺伝子は、ヒトEFEMP2のオルソログであるEfemp2(上皮細胞増殖因子含有フィブリン様細胞外マトリックスタンパク質2)である。別名としては、MBP1、UPH1、FBLN4、0610011K11Rik、フィブリン4およびフィブリン-4が挙げられる。



## 【 0 8 0 5 】

E F E M P 2 は、おそらく細胞外マトリックスタンパク質としての機能を果たす分泌タンパク質である。該タンパク質は、シグナルペプチド、6つの上皮細胞増殖因子 ( E G F ) 様ドメイン、および球状フィブリン型モジュールを含む。E F E M P 2 は、大きな静脈および動脈の内側層ならびに多種多様な他の組織で顕著に発現される。E F E M P 2 は、血液凝固、補体活性化、および発生中の細胞の運命の決定などのプロセスにおいてある役割を果たしている可能性がある。

E F E M P 2 は、染色体 11 にマッピングされる網膜症の候補遺伝子である ( K a t s a n i s e t a l . , H u m G e n e t 106 ( 1 ) : 66 - 72 ( 2000 ) ; A r g r a v e s e t a l . , E M B O R e p 4 ( 12 ) : 1127 - 31 ( 2003 ) ) 。

10

## 【 0 8 0 6 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 129 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 129 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

20

## 【 0 8 0 7 】

## 【 化 2 3 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	15	43	0	58
予測値	14.5	29	14.5	58

カイ二乗値 = 20.29 有意性 = 3.9271934E - 5 ( h o m / n ) = 0.09 平均同腹仔数 = 8

変異情報

変異型：相同組換え ( 標準 )

30

説明：コードエクソン 1 から 3 をターゲティングした ( N C B I アクセッション N M \_ 021474.1 ) 。

1. 野生型発現パネル：R T - P C R によって試験された、胚性幹細胞 ( E S ) 細胞および 13 のすべての成体組織サンプルにおいて標的遺伝子の発現を検出した。

2. Q C 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

## 【 0 8 0 8 】

48.1.1. 表現型解析 ( 破壊遺伝子：D N A 33460 - 1166 ( U N Q 200 ) )

( a ) 全体的な表現型の概要：

40

ヒト上皮細胞増殖因子含有フィブリン様細胞外マトリックスタンパク質 2 ( E F E M P 2 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、( - / - ) 変異型の後期胚致死性もたらされた。遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

## 【 0 8 0 9 】

( b ) 病理学

顕微鏡的：胚致死性。

第 12.5 日に、49 の胚を観察した：

12 個の ( - / - ) 胚、19 個の ( + / - ) 胚、9 個の ( + / + ) 胚、8 個の不明確なおよび 1 個の i n c - h e t - h o m 。

これらの 12.5 日胚において、肉眼または組織学的検査による構造的発生異常は検出さ

50

れなかった。

#### 【0810】

致死性の胚の発達異常に関連する考察：

ノックアウトマウスにおける胚性致死は、通常、種々の重篤な発生上の問題（神経変性疾患、血管障害、炎症性疾患が挙げられるが、これらに限定されない）によって生じるか、または遺伝子/タンパク質が多く細胞型において基礎的な細胞シグナル伝達プロセスで重要な役割を果たす場合に生じる。さらに、胚性致死は、潜在的な癌モデルとして有用である。同様に、対応するヘテロ接合性（+/-）変異動物は、これらがノックアウトされた遺伝子の機能に関する非常に有益な手がかりを明らかにする表現型および/または病理学報告を示す場合に特に有用である。例えば、EPOノックアウト動物は胚致死性を示したが、胚に関する病理学報告は、RBCの著しい欠如を示した。

10

#### 【0811】

48.2.DNA35841-1173（UNQ224）遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO257ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA35841-1173と命名）（UNQ224）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_008411 ACCESSION: NM\_008411 NID: 119939  
40 ムス・ムスクルスムス・ムスクルス内在性膜会合タンパク質1（Itmap1）；参照タンパク質：

20

P70412 ACCESSION: P70412 NID:  
ムス・ムスクルス（マウス）。

INTEGRAL MEMBRANE - ASSOCIATED PROTEIN 1；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_022034 ホモ・サピエンスCUBおよび透明帯様ドメイン1（CUZD1）；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q86UP6 ACCESSION: Q86UP6 NID:  
ホモ・サピエンス（ヒト）。

30

膜貫通タンパク質UO-44D。

#### 【0812】

目的のマウス遺伝子は、Cu zd 1（CUBおよび透明帯様ドメイン1）、ヒトCUZD1のオルソログである。

別名としては、USG、ERG-1、UO-44、UTCZP、Itmap1、内在性膜会合タンパク質1およびエストロゲン調節遺伝子1が挙げられる。

#### 【0813】

CUZD1は、シグナルペプチド、2つのCUB（補体垂成分C1r/C1s、ウニUegf タンパク質、骨形成タンパク質1）ドメイン、透明帯（ZP）ドメイン、およびC末端付近に膜貫通セグメントを含む内在性膜タンパク質である（Kasik et al., Biochem J 330 Pt 2: 947-50 (1998); Chen et al., J Biol Chem 275 (7): 5248 (1999)）。

40

CUB（InterProアクセッションIPR000859）およびZP（PfamアクセッションPF00100）ドメインは、一般的に、タンパク質-タンパク質相互作用に関与する細胞外タンパク質に見られる。CUZD1の正確な機能は不明である。

CUZD1は、正常な卵巢組織および卵巢腫瘍の上皮ならびに妊婦の子宮の子宮内膜および卵管由来の上皮において発現され、ここで、CUZD1は、エストロゲンによって上方調節され、プロゲステロンによって下方調節される（Chen et al., J Biol Chem 275 (7): 5248 (1999); Huynh et al., Endocrinology 142 (7): 2985-95 (2001)）。

これらの上皮において、CUZD1は、原形質膜上（Huynh et al., End

50

ocrinology 142(7):2985-95(2001); Leong et al., Oncogene 23(33):5707-18(2004)または子宮上皮の尖領域内の粒状構造体内(Imamura et al., J Biol Chem 277(52):50725-33(2002))に確認されることがあり得る。

CUZD1はまた、膵臓の腺房細胞のトリプシノゲン含有チモーゲン顆粒の膜上で発現される(Imamura et al., J Biol Chem 277(52):50725-33(2002))。

CUZD1は、生殖周期および妊娠(Kasik, Biochem J 330Pt2):947-50(1998); Chen et al., J Biol Chem 275(7):5248(1999)、細胞運動および細胞-細胞相互作用(Leong et al., Oncogene 23(33):5707-18(2004)、上皮細胞増殖および分化(Huynh et al., Endocrinology 142(7):2985-95(2001)、and indigestion(Imamura et al., J Biol Chem 277(52):50725-33(2002))においてある役割を果たしている可能性がある。

#### 【0814】

Imamuraおよび共働者(J Biol Chem 277(52):50725-33(2002))により、ノックアウトマウスを用いて、CUZD1の生理学的役割が調査された。彼らにより、分泌促進薬誘導性および食事誘導性膵炎の易罹患性は、CUZD1ホモ接合性ヌルマウスにおいて野生型マウスよりもずっと高いことが示された。生殖には影響がないようであった。

Imamuraおよび共働者により、CUZD1は、チモーゲン顆粒内でのトリプシノゲン活性化のモジュレーションにおいてある役割を果たしていること、および改変されたトリプシノゲン活性化は、膵炎の重症性と関連していることが提案された。

#### 【0815】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹(ES)細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

#### 【0816】

##### 【化24】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	26	38	17	81
予測値	20.25	40.5	20.25	81

カイ二乗値 = 1.75 有意性 = 0.416862 (hom/n) = 0.22 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え(標準)

説明：コードエクソン1をターゲティングした(NCBIアクセッションNM\_008411.2)。

1. 野生型発現パネル：

標的遺伝子の発現は、RT-PCRによって試験した26の成体組織試料のうち、脳；目；脾臓；腎臓；骨格筋；胃、小腸および結腸；心臓；脂肪；心臓の带状組織(banded)；皮膚線維芽細胞；前立腺；ならびにMG-12-DPCにおいて検出された。

2. QC発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した

。

## 【 0 8 1 7 】

4 8 . 2 . 1 . 表現型解析 ( 破壊遺伝子 : D N A 3 5 8 4 1 - 1 1 7 3 ( U N Q 2 2 4 ) )

( a ) 全体的な表現型の概要 :

ヒト C U B および透明帯様ドメイン 1 ( C U Z D 1 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、( - / - ) マウスにおける血清 I g G 3 レベルの増加ならびに B 細胞サブセットのパーセンテージの増加がもたらされた。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

## 【 0 8 1 8 】

10

( b ) 免疫学表現型解析

免疫関連疾患および炎症性疾患は、正常な生理機能において、傷害または損傷に応答し、傷害または損傷からの修復を開始し、そして外来生物体に対する先天的および後天的な防御を開始することによって重大な意味を有する、かなり複雑で、複雑に相互連結していることが多い生物学的経路の症状または結果である。これらの正常な生理学的経路が、応答の強度に直接関連してか、異常な制御もしくは過度の刺激の結果としてか、自己に対する応答としてか、またはこれらの組み合わせのいずれかとして、さらなる傷害または損傷を引き起こすときに、疾患または病態が生じる。

## 【 0 8 1 9 】

20

これらの疾患の起源が、多段階の経路および複数の異なる生物学的系 / 経路に関連することが多いが、これらの経路の 1 個以上の重大な点における介入は、寛解性または治療的な効果を有し得る。治療的な介入は、有害なプロセス / 経路の拮抗作用または有益なプロセス / 経路の刺激のいずれかによって生じ得る。

## 【 0 8 2 0 】

T リンパ球 ( T 細胞 ) は、哺乳動物の免疫応答の重要な成分である。T 細胞は、主要組織適合遺伝子複合体 ( M H C ) 内の遺伝子によってコードされる自己の分子に関連する抗原を認識する。この抗原は、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上に M H C 分子とともに提示され得る。T 細胞系は、宿主哺乳動物に対して健康への脅威をもたらすこれらの改変細胞を排除する。T 細胞としては、ヘルパー T 細胞および細胞傷害性 T 細胞が挙げられる。ヘルパー T 細胞は、抗原提示細胞上の抗原 - M H C 複合体を認識した後、広範囲に増殖する。ヘルパー T 細胞はまた、種々のサイトカイン、すなわち、リンフォカインを分泌する。リンフォカインは、B 細胞、細胞傷害性 T 細胞および免疫応答に関与する他の種々の細胞の活性化において中心的な役割を果たす。

30

## 【 0 8 2 1 】

多くの免疫応答において、炎症細胞は、損傷または感染の部位を浸潤する。遊走細胞は、罹患組織の組織学的検査によって決定され得るような、好中球、好酸球、単球またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

40

多くの免疫関連疾患が知られており、広く研究されている。このような疾患としては、免疫媒介性炎症性疾患 ( 例えば、関節リウマチ、免疫媒介性腎疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患 ( I B D ) 、乾癬および喘息 ) 、非免疫媒介性炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全疾患、新形成および移植片拒絶などが挙げられる。免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を同定した。

## 【 0 8 2 2 】

免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を本明細書中で同定した。免疫関連疾患は、1 つの場合において、免疫応答を抑制することによって処置され得る。免疫刺激性活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫媒介性疾患および炎症性疾患の処置に有益であり得る。免疫応答を阻害する分子は、免疫応答を阻害するために ( タンパク質を直接または抗体アゴニストの使用を介して ) 利用され得、その結果、

50

免疫関連疾患を寛解させ得る。

【0823】

以下の試験を実施した：

血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイ：

Cytometric Bead Array (CBA) キットを使用して、血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイを行う。このアッセイを使用して、1つのサンプル中のマウスモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖のアイソタイプを迅速に同定する。示される値は、「相対蛍光単位」であり、軽鎖の検出に基づく。6未満のいかなる値も有意ではない。

【0824】

結果：

血清 Imm. 2：

(-/-) マウスは、その (+/+) 同腹仔のもの、(+/+) マウスの中央値、および累積 (+/+) 歴史的中央値と比較した場合、平均血清 IgG3 レベルの上昇を示した。

【0825】

変異 (-/-) マウスは、その性別一致 (+/+) 同腹仔と比較して IgG3 血清免疫グロブリンの上昇を示した。IgG3 免疫グロブリンは、中和作用を有し、それほどではないが、補体系の活性化に重要である。観察された表現型から、PRO257 ポリペプチドが、炎症性応答の負の制御因子であることが示唆される。これらの免疫学的異常から、PRO257 ポリペプチドのアнтаゴニストまたはインヒビターが、免疫系を刺激し得、この作用が白血病および他のタイプの癌の場合の個体ならびに AIDS 罹患者などの免疫無防備状態の患者にとって有益であり得る場合に有用性が見出され得ることが示唆される。したがって、負の制御因子として作用する PRO257 ポリペプチドは、免疫応答を阻害し得、例えば、移植片拒絶または移植片対宿主病の場合における有害な免疫応答を抑制するための有用な候補であり得る。

【0826】

蛍光標識細胞分取 (FACS) 解析

手順：

CD4、CD8 および T 細胞レセプターを含む、末梢血由来の免疫細胞組成物の FACS 解析を実施して、T リンパ球、B リンパ球に対する CD19、白血球マーカーとしての CD45 およびナチュラルキラー (NK) 細胞に対する pan NK を評価した。FACS 解析は、2匹の野生型および6匹のホモ接合性マウスにおいて実施し、胸腺、脾臓、骨髓およびリンパ節由来の細胞を含んだ。

【0827】

これらの研究において、解析される細胞を、胸腺、末梢血、脾臓、骨髓およびリンパ節から単離した。単核細胞集団内の CD4 および CD8 陽性の T 細胞、B 細胞、NK 細胞および単球の相対的比率を決定するようにフローサイトメトリーを設定した。Becton-Dickinson FACS Calibur 3-レーザー FACS 装置を使用して、免疫状態を評価した。表現型アッセイおよびスクリーニングのために、この装置は、CD4+/CD8+ 比に加えて、CD4+/CD8-、CD8+/CD4-、NK、B 細胞および単球の数を記録する。6つの系統特異的抗体のパネル：CD45 PerCP、抗 TCRb APC、CD4 PE、CD8 FITC、pan-NK PE および CD19 FITC を用いて、各マウス由来の溶解末梢血の単一サンプルを染色することによって単核細胞プロファイルを得た。2種類の FITC 標識抗体および PE 標識抗体は、相互に排他的な細胞タイプを染色する。Cell Quest ソフトウェアを備えた Becton Dickinson FACS Calibur フローサイトメーターを使用してサンプルを解析した。

【0828】

結果：

組織特異的 FACS プロジェクト：

( - / - ) マウスは、その ( + / + ) 同腹仔のものと比較した場合、腹腔洗浄液において、B 2 2 0 + C D 1 1 b C D 2 3 細胞の低パーセンテージの増加および B 2 2 0 + C D 1 1 b - C D 2 3 + 細胞のパーセンテージの減少を示した。

#### 【 0 8 2 9 】

4 8 . 3 . D N A 3 9 4 2 7 - 1 1 7 9 ( U N Q 2 3 5 ) 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、P R O 2 6 8 ポリペプチドをコードする遺伝子 ( D N A 3 9 4 2 7 - 1 1 7 9 と命名 ) ( U N Q 2 3 5 ) を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

B C 0 1 7 6 0 3 A C C E S S I O N : B C 0 1 7 6 0 3 N I D : 1 7 1 6 0 8 5 6  
ムス・ムスクルスムス・ムスクルス、R I K E N c D N A 2 8 1 0 4 2 5 A 0 4 遺伝子、クローン M G C : 2 7 6 0 3 I M A G E : 4 5 0 3 1 2 9 ; 参照タンパク質：  
Q 8 V B T 0 A C C E S S I O N : Q 8 V B T 0 N I D :  
ムス・ムスクルス ( マウス ) 。

R I K E N C D N A 2 8 1 0 4 2 5 A 0 4 G E N E ; 参照ヒト遺伝子配列：  
N M \_ 0 3 0 7 5 5 A C C E S S I O N : N M \_ 0 3 0 7 5 5 N I D : 1 3 5 5 9 5  
1 5 ホモ・サピエンスホモ・サピエンスチオレドキシンドメイン含有 ( T X N D C ) ; ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q 9 Y 4 T 6 A C C E S S I O N : Q 9 Y 4 T 6 N I D :  
ホモ・サピエンス ( ヒト ) 。

H Y P O T H E T I C A L 3 2 . 5 K D A P R O T E I N ( F R A G M E N T ) 。

#### 【 0 8 3 0 】

目的のマウス遺伝子は、ヒト T X N D C ( チオレドキシンドメイン含有 ) のオルソログである T x n d c 1 ( チオレドキシンドメイン含有 1 ) である。

別名としては、2 8 1 0 4 2 5 A 0 4 R i k 、T M X 、T X N D C 1 、D K F Z P 5 6 4 E 1 9 6 2 、チオレドキシンドメイン含有、およびチオレドキシン関連膜貫通タンパク質が挙げられる。

#### 【 0 8 3 1 】

T X N D C は、主に小胞体内に存在している内在性膜タンパク質であり、おそらく、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼとしての機能を果たしている。

該タンパク質は、シグナルペプチド、チオレドキシンドメイン、および 1 つまたはおそらく 2 つの膜貫通セグメントを含む。

チオレドキシンドメインは、さまざまな酸化還元反応に可逆的に関与し得るジチオール活性中心を含む。

さらに、チオレドキシンドメインは、小胞体の内腔内に突き出ており、ここでは、おそらく、他の酵素とともにタンパク質のフォールディングならびにレドックス状態の調節に関与している。T X N D C の発現は、遍在性であるが、肺、腎臓、肝臓および胎盤において特に高い ( M a t s u o e t a l . , A r c h B i o c h e m B i o p h y s 4 2 3 ( 1 ) : 8 1 - 7 ( 2 0 0 4 ) ; M a t s u o e t a l . , J B i o l C h e m 2 7 6 ( 1 3 ) : 1 0 0 3 2 - 8 ( 2 0 0 1 ) ) 。

#### 【 0 8 3 2 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

10

20

30

40

50

【 0 8 3 3 】

【 化 2 5 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	11	23	13	47
予測値	11.75	23.5	11.75	47

カイ二乗値 = 7 . 3 3 有意性 = 0 . 0 2 5 6 0 4 1 7 2 ( h o m / n ) = 0 . 2 7 平均同腹仔数 = 1 0

変異情報

変異型：相同組換え（標準）

説明：コードエクソン 1 をターゲティングした（ N C B I アクセション N M \_ 0 2 8 3 3 9 . 1 ）。

1 . 野生型発現パネル： R T - P C R によって試験された、胚性幹細胞（ E S ）細胞および 1 3 のすべての成体組織サンプルにおいて標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【 0 8 3 4 】

4 8 . 3 . 1 . 表現型解析（破壊遺伝子： D N A 3 9 4 2 7 - 1 1 7 9 ( U N Q 2 3 5 )

（ a ）全体的な表現型の概要：

ヒトチオレドキシンドメイン含有（ T X N D C ）のオルソログをコードする遺伝子の変異により、変異型（ - / - ）マウスにおいて骨中無機質密度の測定値の減少がもたらされた。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

【 0 8 3 5 】

（ b ）骨代謝および全身診断学：放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治療を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するための D E X A
  - ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロ C T
- を含んだ。

【 0 8 3 6 】

D e x a 解析 - 試験の説明：

手順：4 匹の野生型マウス、4 匹のヘテロ接合性マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギー X 線吸収測定法（ D E X A ）を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量（ B M C ）、 B M C / L B M 比、容量測定による骨塩密度（ v B M D ）、全身 B M D 、大腿骨 B M D および椎骨 B M D を測定した。

【 0 8 3 7 】

A v e r t i n ( 1 . 2 5 % 2 , 2 , 2 , - トリプロモエタノール , 2 0 m L / k g 体重 ) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスを D E X A スキャンのために P I X I m u s T M デンシトメーター（ L u n a r I n c . ）のプラットフォーム上に腹臥位にした。 L u n a r P I X I m u s ソフトウェアを使用して、目的の領域（ R O I ） [ すなわち、全身、椎骨および両大腿骨 ] の骨塩密度（ B M D ）および脂肪組成物（ % 脂肪 ）および総組織質量（ T T M ）を測定した。

【 0 8 3 8 】

骨マイクロ C T 解析：

手順：マイクロ C T を使用して、非常に感度の高い B M D の測定を行った。 1 つの椎骨

10

20

30

40

50

および1つの大腿骨を、4匹の野生型マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートから取り出した。腰部の5つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。 $\mu$ CT40スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、16マイクロメートルの解像度で第5腰部椎骨(LV5)において解析し、皮質骨パラメータを、20マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

#### 【0839】

結果：

Dexa：雄(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均におけるレベルと比較して、全身、大腿骨および脊椎骨における体積測定による平均骨塩密度の減少を示した。

マイクロCT：雄(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均のものと比較して、大腿骨中軸の平均断面積の減少を示した。

#### 【0840】

Dexaおよび骨マイクロCT解析によって解析された(-/-)マウスは、その(+/-)同腹仔と比較して、異常な骨障害を示唆する、骨の測定値の減少を示した。骨の負の表現型は、PRO268ポリペプチドまたはそのアゴニストが、骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。さらに、PRO268ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、PRO268ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト(またはインヒビター)は、関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む異常な骨代謝に関連する炎症性疾患を含む、異常な骨障害または病理学的な骨障害に導き得る。

#### 【0841】

48.4.DNA35680-1212(UNQ253)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO290ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA35680-1212と命名)(UNQ253)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

XM\_150243 PREDICTED：

ムス・ムスクルス cDNA 配列 BC042396 (BC042396)；参照タンパク質：

XP\_150243 mKIAA0540 タンパク質[ムス・ムスクルス]；参照ヒト遺伝子配列：

XM\_291064 PREDICTED：

ホモ・サピエンス KIAA0540 タンパク質(KIAA0540)；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

XP\_291064 PREDICTED：

KIAA0540 タンパク質[ホモ・サピエンス]。

目的のマウス遺伝子は、ヒト KIAA0540 タンパク質のオルソログである cDNA 配列 BC042396 である。別名としては、mKIAA0540 および 1110014F23Rik が挙げられる。

KIAA0540 タンパク質は、推定シグナルペプチドまたはシグナルアンカー、BEACHドメイン(PFAMアクセッションPF02138)、および4つのタンデムWD40反復配列(SMARTアクセッションSM00320)を含む。

バイオインフォマティック解析により、該タンパク質は、細胞外(Clark et al., Genome Res 13(10):2265-70(2003))であり得ることが示唆される。

KIAA0540 タンパク質のドメイン構成は、リソソームおよびエンドソームへ、およ

10

20

30

40

50



びこれらからのタンパク質の選出 ( s o r t i n g ) ( B a r b o s a e t a l . , N a t u r e 3 8 5 ( 6 6 1 1 ) : 9 7 ( 1 9 9 6 ) ) に関与している可能性がある L Y S T ( リソソーム輸送調節因子 ) のものと類似する。

#### 【 0 8 4 2 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

#### 【 0 8 4 3 】

##### 【 化 2 6 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	19	40	9	68
予測値	17.0	34.0	17.0	68

カイ二乗値 = 6 . 0 7 有意性 = 0 . 0 4 8 0 7 4 6 6 ( h o m / n ) = 0 . 1 9 平均同腹仔数 = 8

#### 変異情報

変異型：相同組換え ( 標準 )

説明：コードエクソン 4 ~ 1 1 をターゲティングした ( N C B I アクセッション X M \_ 1 5 0 2 4 3 . 4 ) 。

1 . 野生型発現パネル：R T - P C R によって試験された、骨以外の 2 6 のすべての成体組織サンプルにおいて標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【 0 8 4 4 】

4 8 . 4 . 1 . 表現型解析 ( 破壊遺伝子：D N A 3 5 6 8 0 - 1 2 1 2 ( U N Q 2 5 3 )

( a ) 全体的な表現型の概要：

ホモ接合性変異型マウスは、顆粒球のパーセンテージの増加、L P S 攻撃に対する血清 I L - 6 応答の増加、血清 I g G 2 a レベルの低下、平均血清 I g M レベルの増加；末梢血中の C D 4 および C D 8 細胞の平均パーセンテージの減少；ならびに脾臓における B 細胞に対する T 細胞の比の減少を含む数多くの免疫学的異常を示した。また、変異型は、これらの細胞に通常存在する顆粒化を欠く好中球を示した。好中球の減少もまた観察され、好中球減少症がもたらされた。

( - / - ) マウスは、血小板の減少および血小板容積の増加を示した。

血液化学解析により、平均血清グルコースレベルの低下および平均血清トリグリセリドの減少という観察結果がもたらされた。

ホモ接合性変異型マウスはまた、その性別一致野生型同腹仔のものと比較した場合、骨測定値の減少を示した。

標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【 0 8 4 5 】

( b ) 免疫学表現型解析

免疫関連疾患および炎症性疾患は、正常な生理機能において、傷害または損傷に応答し、傷害または損傷からの修復を開始し、そして外来生物体に対する先天的および後天的な防御を開始することによって重大な意味を有する、かなり複雑で、複雑に相互連結していることが多い生物学的経路の症状または結果である。これらの正常な生理学的経路が、応

答の強度に直接関連してか、異常な制御もしくは過度の刺激の結果としてか、自己に対する応答としてか、またはこれらの組み合わせのいずれかとして、さらなる傷害または損傷を引き起こすときに、疾患または病態が生じる。

【0846】

これらの疾患の起源が、多段階の経路および複数の異なる生物学的系／経路に関連することが多いが、これらの経路の1個以上の重大な点における介入は、寛解性または治療的な効果を有し得る。治療的な介入は、有害なプロセス／経路の拮抗作用または有益なプロセス／経路の刺激のいずれかによって生じ得る。

【0847】

Tリンパ球(T細胞)は、哺乳動物の免疫応答の重要な成分である。T細胞は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)内の遺伝子によってコードされる自己の分子に関連する抗原を認識する。この抗原は、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上にMHC分子とともに提示され得る。T細胞系は、宿主哺乳動物に対して健康への脅威をもたらすこれらの改変細胞を排除する。T細胞としては、ヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞が挙げられる。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上の抗原-MHC複合体を認識した後、広範囲に増殖する。ヘルパーT細胞はまた、種々のサイトカイン、すなわち、リンフォカインを分泌する。リンフォカインは、B細胞、細胞傷害性T細胞および免疫応答に關与する他の種々の細胞の活性化において中心的な役割を果たす。

10

【0848】

多くの免疫応答において、炎症細胞は、損傷または感染の部位を浸潤する。遊走細胞は、罹患組織の組織学的検査によって決定され得るような、好中球、好酸球、単球またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

20

多くの免疫関連疾患が知られており、広く研究されている。このような疾患としては、免疫媒介性炎症性疾患(例えば、関節リウマチ、免疫媒介性腎疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患(IBD)、乾癬および喘息)、非免疫媒介性炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全疾患、新形成および移植片拒絶などが挙げられる。免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を同定した。

【0849】

30

免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を本明細書中で同定した。免疫関連疾患は、1つの場合において、免疫応答を抑制することによって処置され得る。免疫刺激性活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫媒介性疾患および炎症性疾患の処置に有益であり得る。免疫応答を阻害する分子は、免疫応答を阻害するために(タンパク質を直接または抗体アゴニストの使用を介して)利用され得、その結果、免疫関連疾患を寛解させ得る。

【0850】

以下の試験を実施した：

血液学解析：

試験の説明：血液試験は、Abbott社のCell-Dyn3500R自動血液学分析装置によって行う。その特徴の一部としては、5種類の白血球分画が挙げられる。「患者」レポートには、全部で22を超えるパラメータが含まれ得る。

40

【0851】

結果：

血液学：

(-/-)マウスは、その(+ / +)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、好中球計数の減少を示した。

しかしながら、自動解析によって(-/-)マウスで観察された好中球減少症は、手動の分画(differential)では確認されなかった。

(-/-)マウスは正常な白血球分布を有するが、好中球は、細胞内に通常存在する顆粒

50

化を示さない。

( - / - ) マウスはまた、平均血小板計数の減少および平均血小板容積の増加を示した。

【 0 8 5 2 】

これらの結果は、変異型 ( - / - ) マウスが、観察した好中球内での異常な顆粒化に伴う好中球減少症に関連する異常を示したことを示す。好中球は、血中の主要な食作用性白血球である。

したがって、( - / - ) マウスは、感染に対処する能力障害を有する。

【 0 8 5 3 】

また、DNA 35680 - 1212 遺伝子が欠損した変異型マウスにより、凝固障害に関連する表現型がもたらされた。

これと関連して、PRO290ポリペプチドまたはそのアゴニストは、異常な血液凝固に関連する障害（例えば、血友病など）の処置に有用であり得る。

【 0 8 5 4 】

急性期反応：

試験の説明：細菌のリポ多糖 ( L P S ) は、エンドトキシンであり、急性期反応および全身性炎症の強力な誘導物質である。レベル I の L P S マウスの腹腔内に ( i . p . ) 、 200  $\mu$  L 滅菌食塩水中の致死量未満の用量の L P S を 26 ゲージ針を使用して注射した。この用量は、試験マウスの平均体重に基づき、1  $\mu$  g / g 体重とした。注射の 3 時間後に 100  $\mu$  L の血液サンプルを採取し、TNF  $\alpha$  、 MCP - 1 および IL - 6 の存在を FACSCalibur 装置で解析した。

【 0 8 5 5 】

結果：

急性期反応：( - / - ) マウスは、その ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較した場合、L P S 攻撃に対する平均血清 IL - 6 応答が増加した

まとめると、L P S 内毒素攻撃は、PRO290ポリペプチドをコードする遺伝子が欠損したノックアウトマウスは、その野生型同腹仔と比較した場合、免疫学的異常を示すことを示した。特に、変異マウスは、L P S 内毒素で攻撃した場合、免疫応答 ( IL - 6 産生 ) を誘発する能力が増加し、炎症誘発応答を示す。IL - 6 は、より後期の B 細胞活性化に寄与する。さらに、IL - 6 は、急性期応答および全身炎症の誘導で極めて重要な役割を果たす。このことは、PRO290ポリペプチドに対するインヒビターまたはアンタゴニストが、免疫系を刺激し得、この作用が白血病および他のタイプの癌の場合の個体ならびに A I D S 罹患者などの免疫無防備状態の患者にとって有益であり得る場合に有用性が見出され得ることが示唆される。したがって、PRO290ポリペプチドまたはそのアゴニストは、免疫応答の阻害に有用であり得、例えば、移植片拒絶または移植片対宿主病の場合における有害な免疫応答を抑制するための有用な候補であり得る。

【 0 8 5 6 】

血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイ：

C y t o m e t r i c B e a d A r r a y ( C B A ) キットを使用して、血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイを行う。このアッセイを使用して、1つのサンプル中のマウスモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖のアイソタイプを迅速に同定する。示される値は、「相対蛍光単位」であり、軽鎖の検出に基づく。6 未満のいかなる値も有意ではない。

【 0 8 5 7 】

結果：

血清 I m m . 2 :

( - / - ) マウスは、その ( + / + ) 同腹仔のもの、当該実行プロジェクト内の ( + / + ) マウス、および歴史的中央値と各々について比較した場合、平均血清 I g M レベルの増加および平均血清 I g G 2 a レベルの低下を示した。

【 0 8 5 8 】

変異 ( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔と比較して、I g M 血清免疫

10

20

30

40

50

グロブリンの増加を示した。I g M免疫グロブリンは、細菌のトキシンの中和に対する体液性免疫応答において最初に産生され、補体系を活性化する際に特に重要である。観察された表現型から、P R O 2 9 0 ポリペプチドが、炎症性応答の負の制御因子であることが示唆される。これらの免疫学的異常から、P R O 2 9 0 ポリペプチドのインヒビター（アンタゴニスト）が、免疫系（例えば、T細胞増殖）を刺激し得る重要な物質であり得、この作用が白血病および他のタイプの癌の場合の個体ならびにA I D S 罹患者などの免疫無防備状態の患者にとって有益であり得る場合に有用性が見出され得ることが示唆される。したがって、P R O 2 9 0 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、免疫応答を阻害に有用であり得、例えば、移植片拒絶または移植片対宿主病の場合における有害な免疫応答を抑制するための有用な候補であり得る。

10

#### 【0859】

血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイにより、ホモ接合体（- / -）マウスが、その性別一致同腹仔（+ / +）コントロールと比較して、平均血清I g G 2 aレベルの低下を示したことが明らかになった。

#### 【0860】

血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイにより、ホモ接合体成体が、血清I g G 2 aレベルの低下を示したことが明らかになった。したがって、ホモ接合体は、（+ / +）同腹仔と比較して異常に低い血清免疫グロブリンを示した。したがって、P R O 2 9 0 ポリペプチドをコードする遺伝子は、免疫グロブリン（またはガンマグロブリン）を生成するのに必須である。同様に、I g G 2 a免疫グロブリンは、中和作用を有し、それほど

20

#### 【0861】

蛍光活性化細胞分取（F A C S）解析

手順：

末梢血由来の免疫細胞組成物（Tリンパ球を評価するためのC D 4、C D 8、およびT細胞受容体、Bリンパ球のためのC D 1 9、白血球マーカーとしてのC D 4 5、およびナチュラルキラー細胞のためのp a n N Kが含まれる）のF A C S解析を行った。2匹の野生型マウスおよび6匹のホモ接合体マウスに対してF A C S解析を行い、マウスは、胸腺、脾臓、骨髄、およびリンパ節由来の細胞を含んでいた。

#### 【0862】

これらの研究では、分析細胞を、胸腺、末梢血、脾臓、骨髄、およびリンパ節から単離した。単核細胞集団中のC D 4およびC D 8陽性T細胞、B細胞、NK細胞、および単球の相対的比率が決定されるようにフローサイトメトリーをデザインした。B e c t o n - D i c k i n s o n F A C S C a l i b u r 3 - レーザー F A C S装置を使用して、免疫状態を評価した。表現型アッセイおよびスクリーニングのために、この機械は、C D 4 + / C D 8 + 比に加えて、C D 4 + / C D 8 -、C D 8 + / C D 4 -、NK、B細胞、および単球の数を記録する。単核細胞プロファイルを、6系統特異的抗体のパネル（C D 4 5 P e r C P、抗T C R b A P C、C D 4 P E、C D 8 F I T C、p a n - N K P E、およびC D 1 9 F I T C）を使用した各マウス由来の溶解末梢血の単一サンプルの染色によって導いた。2つのF I T CおよびP E標識抗体は、相互排除する細胞型を染色する。C e l l Q u e s tソフトウェアを備えたB e c t o n D i c k i n s o n F A C S C a l i b u rフローサイトメーターを使用して、サンプルを分析した。

30

40

#### 【0863】

結果：

F A C S 3：

（- / -）マウスは、その（+ / +）同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、C D 4およびC D 8細胞の平均パーセンテージの減少を特徴とする末梢血中の白血球サブセットの分布の変化を示した。

#### 【0864】

組織特異的F A C Sプロジェクト：

50

( - / - ) マウスはまた、その ( + / + ) 同腹仔のものと比較した場合、散乱 ( s c a t t e r ) による顆粒球のパーセンテージの増加を示したが、骨髓における B 2 2 0 - C D 4 3 H i 細胞のパーセンテージの増加は示されなかった。

( - / - ) マウスにおいて、S S C - h i 集団は大きな S S C - i n t 集団に置き換えられた。

( - / - ) マウスはまた、腹腔洗浄液中において B 2 2 0 H i C D 2 3 + 細胞のパーセンテージの増加を示した。

#### 【 0 8 6 5 】

組織特異的 F A C S - マウス :

( - / - ) マウスは、その ( + / + ) 同腹仔のものと比較した場合、脾臓において、T 細胞 : B 細胞比の減少および C D 6 2 L H i C D 4 4 D i m C D 4 + および C D 8 + 細胞のパーセンテージの減少を示した。

#### 【 0 8 6 6 】

したがって、P R O 2 9 0 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、B 細胞生成の負の調節因子としての機能を果たしている。

#### 【 0 8 6 7 】

( c ) 骨代謝および全身診断学 : 放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は :

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するための D E X A
  - ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロ C T
- を含んだ。

#### 【 0 8 6 8 】

D e x a 解析 - 試験の説明 :

手順 : 4 匹の野生型マウス、4 匹のヘテロ接合性マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギー X 線吸収測定法 ( D E X A ) を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量 ( B M C ) 、B M C / L B M 比、容量測定による骨塩密度 ( v B M D ) 、全身 B M D 、大腿骨 B M D および椎骨 B M D を測定した。

#### 【 0 8 6 9 】

A v e r t i n ( 1 . 2 5 % 2 , 2 , 2 , - トリプロモエタノール , 2 0 m L / k g 体重 ) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスを D E X A スキャンのために P I X I m u s T M デンシトメーター ( L u n a r I n c . ) のプラットフォーム上に腹臥位にした。L u n a r P I X I m u s ソフトウェアを使用して、目的の領域 ( R O I ) [ すなわち、全身、椎骨および両大腿骨 ] の骨塩密度 ( B M D ) および脂肪組成物 ( % 脂肪 ) および総組織質量 ( T T M ) を測定した。

#### 【 0 8 7 0 】

骨マイクロ C T 解析 :

手順 : マイクロ C T を使用して、非常に感度の高い B M D の測定を行った。1 つの椎骨および 1 つの大腿骨を、4 匹の野生型マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートから取り出した。腰部の 5 つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。μ C T 4 0 スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、1 6 マイクロメートルの解像度で第 5 腰部椎骨 ( L V 5 ) において解析し、皮質骨パラメータを、2 0 マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

#### 【 0 8 7 1 】

結果 :

10

20

30

40

50

D e x a :

雄および雌 ( - / - ) マウスの両方は、歴史的平均と比較した場合、平均総組織マスおよび骨塩量および密度の測定値の減少を示し、差は雌においてより顕著であった。

雌 ( - / - ) マウスは、全身容量測定による骨塩密度 ( v B M D )、椎骨骨中無機質密度 ( B M D ) および全身骨中無機質密度の減少を示した ( 大きな差 > 2 S D )。

( - / - ) マウスはまた、大腿骨骨中無機質密度 ( B M D ) および全身骨塩量 ( B M C ) の減少を示した。

【 0 8 7 2 】

マイクロCT : 雄 ( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較して、平均椎骨骨梁の体積、数、厚さおよび結合性密度の減少を示し、大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積の減少を示した。

10

【 0 8 7 3 】

D e x a および骨マイクロCT解析によって解析された ( - / - ) マウスは、その ( + / + ) 同腹仔と比較して、異常な骨障害を示唆する、骨の測定値の減少および身体の高質の測定値の減少を示した。 ( - / - ) マウスは、負の骨表現型を示し、骨の代謝障害を反映する骨測定値が異常に減少した。

また、平均総組織マスの減少は、組織消耗性障害に関連する代謝障害を示す。

その負の骨表現型は、P R O 2 9 0 ポリペプチドまたはそのアゴニストが、骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。さらに、P R O 2 9 0 ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、P R O 2 9 0 ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト ( またはインヒビター ) は、関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む異常な骨代謝に関連する炎症性疾患を含む異常な骨障害または病理学的な骨障害に導き得る。

20

【 0 8 7 4 】

( d ) 表現型解析 : 代謝 - 血液化学

代謝領域では、糖尿病の治療のための標的を同定することができる。血液化学表現型解析には、血糖値測定が含まれる。C O B A S I n t e g r a 4 0 0 ( m f r : R o c h e ) を、マウスの血流化学試験のために使用した。代謝領域では、糖尿病治療のための標的を同定することができる。

結果 :

30

雌 ( - / - ) マウスはまた、顕著な平均血清グルコースレベルの低下を示した。

これらの研究において、変異型 ( - / - ) マウスは、インスリン感受性の増大のためであり得る血清グルコースレベルの顕著な減少を示した。したがって、P R O 2 9 0 ポリペプチドまたはそのコード遺伝子に対するアンタゴニスト ( インヒビター ) は、損傷したグルコースホメオスタシスの処置に有用であり得る。

【 0 8 7 5 】

( e ) 表現型解析 : 心臓学

心臓血管生物学の分野において、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠動脈疾患、異常脂肪血症 ( 例えば、高コレステロール ( 高コレステロール血症 ) および血清トリグリセリドの増加 ( 高トリグリセリド血症 ) )、糖尿病および / または肥満症の処置のための標的を本明細書中で同定した。表現型試験は、血清コレステロールおよび血清トリグリセリドの測定を含んでいた。

40

【 0 8 7 6 】

血中脂質

手順 : 4 匹の野生型マウス、4 匹のヘテロ接合性マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートを、このアッセイで試験した。高いコレステロールレベルおよび血中トリグリセリドレベルの上昇は、心血管疾患および / または糖尿病の発症における認識された危険因子である。血中脂質の測定により、血中脂質レベルを制御する生物学的スイッチの発見が容易になる。血中脂質レベルを上昇させる因子の阻害は、心血管疾患リスクの軽減に有用であり得る。これらの血液化学試験では、C O B A S I n t e g r a 4 0 0 ( m f

50

r : R o c h e ) を使用して測定値を記録した。

【 0 8 7 7 】

結果：

血液化学：雄（ - / - ）マウスは、その性別一致（ + / + ）同腹仔および歴史的平均と比較して、平均血清中トリグリセリドレベルの低下を示した。

【 0 8 7 8 】

まとめると、これらのノックアウト変異型マウスは、脂質代謝に関して正の表現型を示した。

したがって、P R O 2 9 0 遺伝子が欠損した変異型マウスは、脂質血異常、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、または様々な冠動脈疾患と関連する心血管疾患の処置のモデルとして役立ち得る。

【 0 8 7 9 】

4 8 . 5 . D N A 2 2 5 5 4 3 ( U N Q 2 9 4 ) 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、P R O 3 6 0 0 6 ポリペプチドをコードする遺伝子（D N A 2 2 5 5 4 3 と命名）（U N Q 2 9 4 ）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

M \_ 1 4 5 5 8 1 A C C E S S I O N : N M \_ 1 4 5 5 8 1 N I D : 2 1 7 0 4 1 6  
7 ムス・ムスクルスムス・ムスクルスシアル酸結合レクチン S i g l e c - F ( L O C 2  
3 3 1 8 6 ) ; 参照タンパク質：

Q 9 2 0 G 3 A C C E S S I O N : Q 9 2 0 G 3 N I D :  
ムス・ムスクルス（マウス）。

S I A L I C A C I D - B I N D I N G L E C T I N S I G L E C - F ; 参照ヒト  
遺伝子配列：

N M \_ 0 0 3 8 3 0 A C C E S S I O N : N M \_ 0 0 3 8 3 0 N I D : 4 5 0 2 6 5  
8 ホモ・サピエンスホモ・サピエンスシアル酸結合 I g 様レクチン 5 ( S I G L E C 5 )  
；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

O 1 5 3 8 9 A C C E S S I O N : O 1 5 3 8 9 N I D :  
ホモ・サピエンス（ヒト）。

O B B I N D I N G P R O T E I N - 2 ( S I G L E C 5 ) 。

【 0 8 8 0 】

目的のマウス遺伝子は、ヒト S I G L E C 5 のオルソログである S i g l e c 5 （シアル酸結合 I g 様レクチン 5 ）である。別名としては、m S i g l e c - F 、シアル酸結合レクチン S i g l e c - F 、O B B P 2 、C D 3 3 L 2 、O B - B P 2 、S I G L E C - 5 、C D 3 3 抗原様 2 、O B 結合タンパク質 - 2 、およびシアル酸結合免疫グロブリン様レクチン 5 が挙げられる。

【 0 8 8 1 】

S I G L E C 5 は、主に、骨髓単球性系統の未成熟細胞、特に、血中の好酸球および骨髓中の好酸球前駆体において発現される I 型内在性原形質膜タンパク質である。該タンパク質は、シグナルペプチド、4 つの細胞外免疫グロブリン様ドメイン、膜貫通セグメント、および 1 つ以上の細胞質免疫受容体チロシン系阻害性モチーフ（I T I M ）を含む。

チロシンリン酸化の場合、I T I M は、いくつかのホスファターゼの S H 2 ドメインと結合し得る。S I G L E C 5 の細胞外ドメインは、リポ多糖上の 2 , 3 結合シアル酸と結合し、おそらく細胞接着分子またはシグナル伝達受容体としての機能を果たす（C o r n i s h e t a l . , B l o o d 9 2 ( 6 ) : 2 1 2 3 - 3 2 ( 1 9 9 8 ) ; P a t e l e t a l . , J B i o l C h e m 2 7 4 ( 3 2 ) : 2 2 7 2 9 - 3 8 ( 1 9 9 9 ) ; A n g a t a e t a l . , J B i o l C h e m 2 7 6 ( 4 8 ) : 4 5 1 2 8 - 3 6 ( 2 0 0 1 ) ; Z h a n g e t a l . , E u r J I m m u n o l 3 4 ( 4 ) : 1 1 7 5 - 8 4 ( 2 0 0 4 ) ）。

10

20

30

40

50

S I G L E C 5 は、好酸球、好中球、単球、肺、脾臓および胎盤において発現される (Zhang et al., Eur J Immunol 34 (4): 1175 - 84 (2004); Patel et al., J Biol Chem 274 (32): 22729 - 38 (1999); Erickson - Miller et al., Exp Hematol 31 (5): 382 - 8 (2003))。

好中球 S I G L E C 5 発現は、f M L P および腫瘍壊死因子 - での処置に応答して上方調節され、S I G L E C 5 は、f M L P に応答した好中球の酸化的大量放出の増大に関与している。これらの活性により、S I G L E C 5 は、微生物への曝露後に細胞 - 細胞相互作用または食作用に関与することによって免疫細胞機能においてある役割を果たしていることが示唆される (Erickson - Miller et al., Exp Hematol 31 (5): 382 - 8 (2003); Jones et al., Mol Microbiol 49 (5): 1213 - 25 (2003))。

10

#### 【0882】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 129 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 (E S) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 129 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

20

#### 【0883】

##### 【化27】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	14	47	30	91
予測値	22.75	45.5	22.75	91

カイ二乗値 = 1.61 有意性 = 0.4470879 (hom / n) = 0.25 平均同腹仔数 = 9

変異情報

30

変異型：相同組換え (標準)

説明：コードエクソン 1 から 4 および先行する非コードエクソンをターゲティングした (NCBI アクセッション NM\_145581.1)。

1. 野生型発現パネル：RT - PCR によって試験された、13 のすべての成体組織サンプルのうちの脳、脊椎、眼、胸腺、脾臓、肺、および腎臓中の標的遺伝子の発現を検出した。

2. Q C 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【0884】

48.5.1. 表現型解析 (破壊遺伝子：DNA 225543 (UNQ294))

40

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒトシアル酸結合 Ig 様レクチン 5 (S I G L E C 5) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、雌 (- / -) マウスにおいて皮膚線維芽細胞の増殖割合の増加がもたらされた。また、変異型 (- / -) マウスは、リンパ節および腹腔洗浄液の両方において B 細胞および B 細胞前駆体のパーセンテージの増加を示した。遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

#### 【0885】

(b) 免疫学表現型解析

免疫関連疾患および炎症性疾患は、正常な生理機能において、傷害または損傷に応答し、傷害または損傷からの修復を開始し、そして外来生物体に対する先天的および後天的な

50



防御を開始することによって重大な意味を有する、かなり複雑で、複雑に相互連結していることが多い生物学的経路の症状または結果である。これらの正常な生理学的経路が、応答の強度に直接関連してか、異常な制御もしくは過度の刺激の結果としてか、自己に対する応答としてか、またはこれらの組み合わせのいずれかとして、さらなる傷害または損傷を引き起こすときに、疾患または病態が生じる。

#### 【0886】

これらの疾患の起源が、多段階の経路および複数の異なる生物学的系／経路に関連することが多いが、これらの経路の1個以上の重大な点における介入は、寛解性または治療的な効果を有し得る。治療的な介入は、有害なプロセス／経路の拮抗作用または有益なプロセス／経路の刺激のいずれかによって生じ得る。

10

#### 【0887】

Tリンパ球（T細胞）は、哺乳動物の免疫応答の重要な成分である。T細胞は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）内の遺伝子によってコードされる自己の分子に関連する抗原を認識する。この抗原は、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上にMHC分子とともに提示され得る。T細胞系は、宿主哺乳動物に対して健康への脅威をもたらすこれらの改変細胞を排除する。T細胞としては、ヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞が挙げられる。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上の抗原-MHC複合体を認識した後、広範囲に増殖する。ヘルパーT細胞はまた、種々のサイトカイン、すなわち、リンフォカインを分泌する。リンフォカインは、B細胞、細胞傷害性T細胞および免疫応答に関与する他の種々の細胞の活性化において中心的な役割を果たす。

20

#### 【0888】

多くの免疫応答において、炎症細胞は、損傷または感染の部位を浸潤する。遊走細胞は、罹患組織の組織学的検査によって決定され得るような、好中球、好酸球、単球またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

多くの免疫関連疾患が知られており、広く研究されている。このような疾患としては、免疫媒介性炎症性疾患（例えば、関節リウマチ、免疫媒介性腎疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患（IBD）、乾癬および喘息）、非免疫媒介性炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全疾患、新形成および移植片拒絶などが挙げられる。免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を同定した。

30

#### 【0889】

免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を本明細書中で同定した。免疫関連疾患は、1つの場合において、免疫応答を抑制することによって処置され得る。免疫刺激性活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫媒介性疾患および炎症性疾患の処置に有益であり得る。免疫応答を阻害する分子は、免疫応答を阻害するために（タンパク質を直接または抗体アゴニストの使用を介して）利用され得、その結果、免疫関連疾患を寛解させ得る。

40

#### 【0890】

以下の試験を実施した：

蛍光（Fluorescence）標識細胞分取（FACS）解析

手順：

CD4、CD8およびT細胞レセプターを含む、末梢血由来の免疫細胞組成物のFACS解析を実施して、Tリンパ球、Bリンパ球に対するCD19、白血球マーカーとしてのCD45およびナチュラルキラー細胞に対するpan NKを評価した。FACS解析は、2匹の野生型および6匹のホモ接合性マウスにおいて実施し、胸腺、脾臓、骨髄およびリンパ節由来の細胞を含んだ。

#### 【0891】

これらの研究において、解析される細胞を、胸腺、末梢血、脾臓、骨髄およびリンパ節

50

から単離した。単核細胞集団内のCD4およびCD8陽性のT細胞、B細胞、NK細胞および単球の相対的比率を決定するようにフローサイトメトリーを設定した。Beckton-Dickinson FACSCalibur 3-レーザーFACS装置を使用して、免疫状態を評価した。表現型アッセイおよびスクリーニングのために、この装置は、CD4+/CD8+比に加えて、CD4+/CD8-、CD8+/CD4-、NK、B細胞および単球の数を記録する。6つの系統特異的抗体のパネル：CD45 PerCP、抗TCRb APC、CD4 PE、CD8 FITC、pan-NK PEおよびCD19 FITCを用いて、各マウス由来の溶解末梢血の単一サンプルを染色することによって単核細胞プロファイルを得た。2種類のFITC標識抗体およびPE標識抗体は、相互に排他的な細胞タイプを染色する。CellQuestソフトウェアを備えたBeckton Dickinson FACSCaliburフローサイトメーターを使用してサンプルを解析した。

10

## 【0892】

結果：

組織特異的FACS-プロジェクト：

(-/-)マウスは、その(+/+ )同腹仔のものと比較した場合、リンパ節においてB細胞のパーセンテージの増加を示した。

(-/-)マウスはまた、腹腔洗浄液中において、B220-CD11b Hi 細胞のパーセンテージの減少ならびにB220-CD11 LowおよびCD11b細胞のパーセンテージの増加を示した。

20

したがって、UNQ294は、B細胞生成および分化の負の調節因子であるようである。

## 【0893】

(c)表現型解析：代謝-血液化学

代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、血糖測定を含む。マウスにおける血液化学試験を実施するためにCOBAS Integra 400 (mfr: Roche)を使用した。代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。

## 【0894】

結果：

血液化学：雌(-/-)マウスは、その性別一致(+ / +)同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清グルコースレベルが増加した。雌(-/-)マウスは、その性別一致(+ / +)同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清コレステロールレベルが増加した。

30

しかしながら、すべての雄(-/-)マウスは、歴史的平均より高い血清グルコースレベルを有した。

## 【0895】

したがって、変異型(-/-)マウスは、グルコース代謝の変化と関連するものであり得る高血糖症または糖尿病を示した。

## 【0896】

(d)成体皮膚細胞増殖：

40

手順：皮膚細胞を16週齢の動物(2匹の野生型マウス4匹のホモ接合性マウス)から単離した。これらを、初代線維芽細胞培養物に発達させて、その線維芽細胞増殖速度を厳密に制御されたプロトコルにおいて測定した。このアッセイが過剰増殖性表現型および低増殖性表現型を検出する能力は、p53およびKu80で証明されている。BrdU取り込みを使用して増殖を測定した。

## 【0897】

詳細には、これらの研究において、皮膚線維芽細胞増殖アッセイを使用した。標準化された培養物中の細胞数の増加を、相対的な増殖能力の基準として使用した。野生型マウスおよび変異マウスから採取した皮膚バイオプシーから初代線維芽細胞を確立した。5万個の細胞の2つ組または3つ組の培養物を播種し、6日間生育させた。培養期間の終わり

50

に、培養物中に存在する細胞の数を、電子粒子カウンターを使用して測定した。

#### 【0898】

結果：

皮膚増殖：雌（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均皮膚線維芽細胞増殖速度が増加した。

#### 【0899】

したがって、ホモ接合体変異マウスは、高増殖表現型を示した。これらの所見によって示唆されるように、PRO36006ポリペプチドまたはその作用剤は、腫瘍抑制因子として機能することができ、異常な細胞増殖の減少に有用であろう。

#### 【0900】

48.6.DNA45419-1252（UNQ318）遺伝子破壊を含むマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験では、PRO363ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA45419-1252と示す）（UNQ318）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報を以下に示す：変異マウス遺伝子は、以下に対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_\_133733 ACCESSION: NM\_\_133733 NID: gi\_31542034 ref NM\_\_133733.2 ムス・ムスクルスRIKEN cDNA 9030425E11 遺伝子（9030425E11Rik）；参照タンパク質：Q8R373 ACCESSION: Q8R373 NID: ムス・ムスクルス（マウス）。

CAR様膜タンパク質（脂肪細胞接着分子）（ムス・ムスクルス成体雄盲腸cDNA、RIKEN完全長高含有ライブラリー、クローン：9130232017産物：ADIPOCYTE-SPECIFIC PROTEIN 5、完全挿入物配列）；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_\_024769 ホモ・サピエンス脂肪細胞特異的接着分子（ASAM）；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q9H6B4 ACCESSION: Q9H6B4 NID:

ホモ・サピエンス（ヒト）。

CDNA:

FLJ22415 FIS、CLONE HRC08561（HYPOTHETICAL 41.3 KDA PROTEIN）。

#### 【0901】

目的のマウス遺伝子は、ヒトASAM（脂肪細胞特異的接着分子）のオルソログであるRIKEN cDNA 9030425E11 遺伝子である。別名としては、ASAM、CLMP、FLJ22415、asp5、IGSF11、CAR様膜タンパク質および脂肪細胞特異的タンパク質5が挙げられる。

#### 【0902】

ASAMは、おそらく細胞接着分子および強固な連結部の成分としての機能を果たしているI型原形質膜タンパク質である。

該タンパク質は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、シグナルペプチド、免疫グロブリン様ドメイン、免疫グロブリン定常2型ドメイン、膜貫通セグメントおよび細胞質テールからなる。ASAMは、主に、多種多様な組織由来の上皮細胞において発現され、おそらく細胞-細胞連絡および強固な連結部形成においてある役割を果たしている（Raschperger et al., J Biol Chem 279(1):796-804(2004)；KatoohおよびKatooh, Int J Oncol 23(2):525-31(2003)）。

#### 【0903】

ターゲティングされたか遺伝子トラップされた変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹（ES）細胞で行った。キメラマウスを、C57BL/6Jアルビノマウスと交

10

20

30

40

50

配して F 1 ヘテロ接合体動物を作製する。これらの子孫を交雑受精して F 2 野生型子孫、ヘテロ接合体変異子孫、およびホモ接合体変異子孫を作製する。稀に、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合、F 1 ヘテロ接合体マウスを、129SvEv<sup>B</sup><sub>r</sub><sup>d</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑してさらなるヘテロ接合体動物を作製し、これを交雑受精して F 2 マウスを作製する。この世代由来のマウスに対してレベル I 表現型解析を行う。

【0904】

【化28】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	28	52	9	89
予測値	22.25	44.5	22.5	89

10

カイ二乗 = 7.06 有意性 = 0.029304916 (hom/n) = 0.17 平均同腹仔数 = 10

変異情報

変異型：相同組換え（標準）

1. 野生型発現パネル：

2. QC 発現：

48.6.1. 表現型解析（破壊遺伝子：DNA45419-1252 (UNQ318)）

20

（a）全体的な表現型の概要：

ヒト脂肪細胞特異的接着分子（ASAM）のオルソログをコードする遺伝子の変異により、（-/-）変異型のパイアビリティの低下がもたらされた。

CAT スキャン分析および検死の両方により、生存ホモ接合性変異型マウスにおいて、臨床的に観察された平均収縮期血圧の顕著な増加および血中尿素窒素の増加と一致する両側性水腎症および炎症が明らかになった。

変異型（-/-）マウスは、「洋ナシ形の腹」ならびに多発性嚢胞腎と認められる慢性炎症を伴う両側性で腫脹した腎臓を示した。

また、変異型は、その野生型同腹仔よりも小さく、数多くの血液化学、免疫学的および神経学的異常を示した。

30

成長遅延のさらなる証拠が、骨中無機質密度の測定値の減少とともに体脂肪、除脂肪体重および総組織マスの減少も示す変異型（-/-）マウスによって示される。標的遺伝子の破壊を、サザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【0905】

（b）病理学

全般的な観察結果：（-/-）マウスの生存能低下が観察された。

顕微鏡的：12.5日目に、48個の胚：11個の（-/-）胚、18個の（+/-）胚、10個の（+/+）胚、5個の再吸収モルおよび4個の不確定な胚が観察された。

3匹の（-/-）マウスはすべて、両側性水腎症を示した。

また、化膿性および熱性肉芽種性（pyrogranulomatous）炎症も2/3匹の（-/-）マウスにおいて認められ、これらの変異型における細菌感染に対する易罹性の増大を示す（尿分析により尿路感染症の可能性が示された）。

40

【0906】

（c）免疫学表現型解析

免疫関連疾患および炎症性疾患は、正常な生理機能において、傷害または損傷に応答し、傷害または損傷からの修復を開始し、そして外来生物体に対する先天的および後天的な防御を開始することによって重大な意味を有する、かなり複雑で、複雑に相互連結していることが多い生物学的経路の症状または結果である。これらの正常な生理学的経路が、応答の強度に直接関連してか、異常な制御もしくは過度の刺激の結果としてか、自己に対する応答としてか、またはこれらの組み合わせのいずれかとして、さらなる傷害または損傷

50

を引き起こすときに、疾患または病態が生じる。

【0907】

これらの疾患の起源が、多段階の経路および複数の異なる生物学的系 / 経路に関連することが多いが、これらの経路の1個以上の重大な点における介入は、寛解性または治療的な効果を有し得る。治療的な介入は、有害なプロセス / 経路の拮抗作用または有益なプロセス / 経路の刺激のいずれかによって生じ得る。

【0908】

Tリンパ球(T細胞)は、哺乳動物の免疫応答の重要な成分である。T細胞は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)内の遺伝子によってコードされる自己の分子に関連する抗原を認識する。この抗原は、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上にMHC分子とともに提示され得る。T細胞系は、宿主哺乳動物に対して健康への脅威をもたらすこれらの改変細胞を排除する。T細胞としては、ヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞が挙げられる。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上の抗原-MHC複合体を認識した後、広範囲に増殖する。ヘルパーT細胞はまた、種々のサイトカイン、すなわち、リンフォカインを分泌する。リンフォカインは、B細胞、細胞傷害性T細胞および免疫応答に關与する他の種々の細胞の活性化において中心的な役割を果たす。

10

【0909】

多くの免疫応答において、炎症細胞は、損傷または感染の部位を浸潤する。遊走細胞は、罹患組織の組織学的検査によって決定され得るような、好中球、好酸球、単球またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

20

多くの免疫関連疾患が知られており、広く研究されている。このような疾患としては、免疫媒介性炎症性疾患(例えば、関節リウマチ、免疫媒介性腎疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患(IBD)、乾癬および喘息)、非免疫媒介性炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全疾患、新形成および移植片拒絶などが挙げられる。免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を同定した。

【0910】

免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を本明細書中で同定した。免疫関連疾患は、1つの場合において、免疫応答を抑制することによって処置され得る。免疫刺激性活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫媒介性疾患および炎症性疾患の処置に有益であり得る。免疫応答を阻害する分子は、免疫応答を阻害するために(タンパク質を直接または抗体アゴニストの使用を介して)利用され得、その結果、免疫関連疾患を寛解させ得る。

30

【0911】

以下の試験を実施した：

血液学解析：

試験の説明：血液試験は、Abbott社のCell-Dyn3500R自動血液学分析装置によって行う。その特徴の一部としては、5種類の白血球分画が挙げられる。「患者」レポートには、全部で22を超えるパラメータが含まれ得る。

40

【0912】

結果：

血液学：雌(-/-)マウスは、その(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較して、平均絶対好中球数の増加を示した。

【0913】

(d)骨代謝および身体診断

(1)組織マスおよび除脂肪体重の測定-Dexa

Dexa解析-試験の説明：

手順：野生型、ヘテロ接合体、およびホモ接合体マウスのコホートを、このアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)を使用して、総組織マス(TTM

50

) の変化を首尾よく同定した。

#### 【0914】

マウスを、アベルチン(1.25%2, 2, 2-トリプロモエタノール、20 mL/kg 体重)の腹腔内注射によって麻酔し、体長および体重を測定し、DEXA スキャンのために、マウスをPIXImusTM デンシトメータ(Lunar Inc.)のプラットフォーム上に腹臥位で配置した。Lunar PIXImus ソフトウェアを使用して、関心領域(ROI)(すなわち、全身、脊椎、および両大腿骨)中の骨中無機質密度(BMD)、脂肪組成(%脂肪)、および総組織マス(TTM)を決定した。

#### 【0915】

身体測定(体長および体重)：

身体測定：約16週齢で体長および体重の測定を行った。

10

#### 【0916】

結果：

体重：(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均体重が減少した。

#### 【0917】

体長：(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較して、平均体長の減少を示した。

また、8匹の(-/-)マウスのうち6匹は「洋ナシ形」の腹を示した。

20

#### 【0918】

生殖能力：

解析に利用可能な雄(-/-)マウスでは、交配の40日後子供が生まれなかった。

#### 【0919】

基礎体温：

雄(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、基礎体温中央値の減少を示した。

#### 【0920】

(2) 骨代謝：放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は

30

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのDEXA
  - ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCT
- を含んだ。

#### 【0921】

Dexa 解析 - 試験の説明：

手順：野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性のコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量(BMC)、BMC/LBM比、容量測定による骨塩密度(vBMD)、全身BMD、大腿骨BMDおよび椎骨BMDを測定した。

40

#### 【0922】

Avertin(1.25%2, 2, 2, -トリプロモエタノール、20 mL/kg 体重)をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXA スキャンのためにPIXImusTM デンシトメータ(Lunar Inc.)のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImus ソフトウェアを使用して、目的の領域(ROI)[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度(BMD)および脂肪組成物(%脂肪)および総組織質量(TTM)を測定した。

#### 【0923】

骨マイクロCT解析：

50

手順：マイクロCTを使用して、非常に感度の高いBMDの測定を行った。1つの椎骨および1つの大腿骨を、野生型マウスおよびホモ接合性マウスのコホートから取り出した。腰部の5つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。 $\mu$ CT40スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、16マイクロメートルの解像度で第5腰部椎骨(LV5)において解析し、皮質骨パラメータを、20マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

#### 【0924】

##### CATスキャン分析

試験の説明：CT造影剤であるOmnipaque 300 (Nycomed Amer-shan, 300mgヨウ素/mL、0.25mL/動物または2.50~3.75gヨウ素/kg体重)をマウスの腹腔内に注射した。約10分間、ケージ内で安静にさせた後、Avertin (1.25% 2,2,2-トリブロムエタノール、20mL/kg体重)を腹腔内注射することによりそのマウスを鎮静させた。麻酔動物を試験台に腹臥位にして、MicroCATスキャナー (ImTek, Inc.) を使用してCATスキャンを行った。三次元像を、ImTek 3D RECONソフトウェアを使用してワークステーションクラスターでFeldkampアルゴリズムによって再構成した。

#### 【0925】

##### 結果：

##### Dexa：

雄(-/-)マウスは、平均総組織マスおよび除脂肪体重の顕著な減少を示した。雄および雌(-/-)マウスの両方は、その性別一致(+/-)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均体脂肪パーセント、総脂肪質量およびすべての骨塩密度関連測定値の顕著な減少を示した。

#### 【0926】

##### マイクロCT：

顕著な差はなし。

しかしながら、解析に利用可能な(-/-)マウスはなかった。

#### 【0927】

##### CATスキャン：

解析した3匹すべての(-/-)マウス(M-154、F-81およびF-147)は、多発性嚢胞腎または重症な水腎症を示唆する著しい炎症を伴う両側性で腫脹した腎臓を示した。これらの結果は、血中尿素窒素レベルの増加および以下に報告する全身性高血圧症と一致する。

1匹の(+/-)マウス(F-76)もまた、左側に中等度の水腎症を示した。

#### 【0928】

PRO363ポリペプチドをコードする遺伝子が欠損した変異(-/-)マウスは、体重および体長の減少および組織のいそう疾患(総体脂肪(%))および脂肪質量(g)の減少)を特徴とする成長遅延と一致する表現型を示す。したがって、PRO363ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニストまたはインヒビターは、これらの代謝関連効果および成長関連効果を模倣するであろう。他方では、PRO363ポリペプチドまたはその作用剤は、糖尿病などの代謝障害または他の組織のいそう疾患の防止および/または治療で有用であろう。

#### 【0929】

また、DEXAによって解析した(-/-)マウスは、その(+/-)同腹仔と比較した場合、異常な骨障害を示唆する、骨測定値の減少およびボディマス測定値の減少を示した。

(-/-)マウスは、骨代謝障害を反映する異常な骨測定値の減少を含む負の骨表現型を示した。

10

20

30

40

50

また、平均総組織マスおよび除脂肪体重の減少は、成長遅延および組織消耗性障害に関連する代謝障害を示す。

骨の負の表現型は、PRO363ポリペプチドまたはそのアゴニストが、正常な成長発達に加えて骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。

さらに、PRO363ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、PRO363ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト（またはインヒビター）は、関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む異常な骨代謝に関連する炎症性疾患を含む異常な骨障害または病理学的な骨障害に導き得る。

#### 【0930】

（e）表現型解析：CNS / 神経学

神経学の分野において、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害を含む神経性障害および精神医学的障害の処置のためのインビボにおいて有効な標的の同定についての解析に本明細書中では注目した。神経障害は、「不安障害」として定義されるカテゴリーを含む。その「不安障害」としては、以下：軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、別段特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴うパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、I型またはII型の双極性障害、別段特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害にあってはまるることがあり、その人格障害としては、以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0931】

手順：

行動スクリーニングを、野生型、ヘテロ接合性変異マウスおよびホモ接合性変異マウスのコホートにおいて実施した。生存能低下のために、より早期の試験が必要とならない限り、すべての行動試験は、12～16週齢の間に実施した。これらの試験には、不安、活動レベルおよび探索を測定するためのオープンフィールドが含まれていた。

機能観察バッテリー（FOB）試験 - 尾部懸垂試験：

FOBは、肉眼的に感覚および運動の欠損を決定するために動物に適用される一連の状況である。肉眼的神経機能を評価するア－ウィンの神経学的スクリーニング由来の試験の一部を使用する。一般に、短期間の触覚、嗅覚、および視覚に対する刺激を動物に適用して、その正常に検出および応答する能力を決定する。これらの簡潔な試験は約10分かかり、試験終了後にマウスをそのホームケージに戻す。

#### 【0932】

尾部懸垂試験：

尾部懸垂試験は、げっ歯類の抑鬱症様挙動モデルとして開発された手順である。この特定の準備では、マウスの尾部を6分間懸垂し、それに応じてマウスがこの位置から逃れるためにもがく。一定時間後、マウスのもがきは減少し、これは、どうすることもできないパラダイムの学習型と解釈される。無効なデータ（すなわち、試験中にその尾部を登る）を有する動物を、この分析から排除する。

#### 【0933】

結果：

尾部懸垂2：

（-/-）マウスは、その（+/+）同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、変異型において鬱様応答の増大を示唆する不動時間中央値の増加を示した。

#### 【0934】

したがって、ノックアウトマウスは、抑鬱症、全般性不安障害、認知障害、痛覚過敏、感覚障害、および/または双極性障害と一致する表現型を示した。したがって、PRO3

10

20

30

40

50



63 ポリペプチドおよびその作用剤は、抑鬱性障害に関連する症状の治療または改善に有用である。

#### 【0935】

(f) 表現型解析：代謝 - 血液化学

代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、血糖測定を含む。マウスにおける血液化学試験を実施するためにCOBAS Integra 400 (mfr: Roche) を使用した。血糖値の測定に加えて、以下の血液化学試験もまた日常的に行う：アルカリホスファターゼ；アラニンアミノ・トランスフェラーゼ；アルブミン；ビリルビン；亜リン酸；クレアチニン；BUN = 血中尿素窒素；カルシウム；尿酸；ナトリウム；カリウム；および塩化物。代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、インスリン感度およびグルコース代謝の変化を測定する耐糖能試験を含む。異常な耐糖能試験結果は、以下の障害または状態：1型糖尿病および2型糖尿病、シンドロームX、様々な循環器疾患および/または肥満症を示唆し得るが、これらに限定されない。

10

#### 【0936】

結果：

血液化学：雄(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清アルカリホスファターゼレベルが増加した。

これらの結果は、多発性嚢胞腎の顕著な病理所見および血中尿素窒素の増加と一致する。

20

#### 【0937】

(-/-)マウスはまた、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清グルコースレベルの減少を示した。

また、雄および雌(-/-)マウスの両方は、平均血清血中尿素窒素レベルの増加を示した。

平均血清グルコースレベルの低下は、これらの変異型(-/-)マウスにおける耐糖能の向上という観察結果と一致する。

同様に、血中尿素窒素の増加レベルは、腎臓機能不全および/または組織消耗性疾患と一致する。

#### 【0938】

(g) 表現型解析：代謝 - 血液化学 / 耐糖能

30

代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、血糖測定を含む。マウスにおける血液化学試験を実施するためにCOBAS Integra 400 (mfr: Roche) を使用した。代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、インスリン感度およびグルコース代謝の変化を測定する耐糖能試験を含む。異常な耐糖能試験結果は、以下の障害または状態：1型糖尿病および2型糖尿病、シンドロームX、様々な循環器疾患および/または肥満症を示唆し得るが、これらに限定されない。

#### 【0939】

手順：野生型およびホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイに使用した。耐糖能試験は、哺乳動物における損傷したグルコースホメオスタシスを定義するための標準的な試験である。LifeScan血糖測定器を使用して耐糖能試験を行った。20%溶液として送達される2g/kgのD-グルコースを動物にIP注射し、血糖値を注射の0、30、60および90分後に測定した。

40

#### 【0940】

結果：

経口耐糖能：

解析に利用可能な雄(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、耐糖能の向上を示した。

#### 【0941】

50

## (h) 心臓学 - 血圧

説明:

V i s i t e c h B P - 2 0 0 0 血圧解析システムによる4日間の非侵襲性テールカフ法によって収縮期血圧を測定する。血圧を、4日間にわたって1日10回測定する。次いで、4日間の値を平均して、マウスの意識下収縮期血圧を得る。

【0942】

結果:

血圧:

雄および雌(-/-)マウスの両方は、その性別一致(+/-)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、変異型(-/-)マウスにおいて全身性高血圧症を示唆する平均収縮期血圧の顕著な上昇を示した(顕著な腎臓病理と一致する)。

10

【0943】

48.7.DNA46777-1253(UNQ320)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO365ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA46777-1253と命名)(UNQ320)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである:変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する:参照ヌクレオチド:

NM\_020622 ACCESSION:NM\_020622 NID:

gi\_22296879 ref NM\_020622.1 ムス・ムスクルスRIKEN cDNA 9030624C24 遺伝子(9030624C24Rik);参照タンパク質:

20

Q9D309 ACCESSION:Q9D309 NID:

ムス・ムスクルス(マウス)。

タンパク質FAM3B前駆体;参照ヒト遺伝子配列:

配列類似性3を有するNM\_058186ホモ・サピエンスファミリー、構成員B(FAM3B)、転写物改変体1;ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する:

P58499 ACCESSION:P58499 NID:

ホモ・サピエンス(ヒト)。

タンパク質FAM3B前駆体(タンパク質PRE44)。

30

【0944】

目的のマウス遺伝子は、ヒトFAM3B(配列類似性3を有するファミリー、構成員B)のオルソログであるORF9(オープンリーディングフレーム9)である。

別名としては、2-21、D16Jhu19e、9030624C24Rik、PRE44、C21orf11、C21orf76、D21M16SJHU19e、サイトカイン様タンパク質2-21、染色体21オープンリーディングフレーム11が挙げられる。

【0945】

FAM3Bは、おそらくシグナル伝達性リガンドとしての機能を果たしている分泌サイトカインである。該タンパク質は、膵島の-および-細胞において高レベルで、ならびに小腸、前立腺、細精管内の円形精子細胞、数多くの脳幹の核の神経細胞体、および小脳のプルキンエ細胞において低レベルで発現される。FAM3Bは、細胞からのインスリン分泌の基礎レベルを上昇させ得、カスパーゼ-3-媒介性経路によって島細胞においてアポトーシスを誘導し得る(Zhu et al., Genomics 80(2):144-50(2002);Cao et al., Diabetes 52(9):2296-303(2003))。

40

【0946】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹(ES)細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。ま

50

れに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B</sup> r d / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

【 0 9 4 7 】

【 化 2 9 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	20	37	21	78
予測値	19.5	39	19.5	78

カイ二乗値 = 0 . 9 1 有意性 = 0 . 6 3 4 4 4 7 9 3 ( h o m / n ) = 0 . 2 5 平均同腹仔数 = 8

変異情報

変異型：相同組換え（標準）

説明：コードエクソン 1 および 2 をターゲティングした（NCBI アクセッション NM \_ 0 2 0 6 2 2 . 1 ）。

1 . 野生型発現パネル：RT - PCR によって試験された、1 3 のすべての成体組織サンプル（骨および脂肪以外）において標的遺伝子の発現を検出した。

2 . QC 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【 0 9 4 8 】

4 8 . 7 . 1 . 表現型解析（破壊遺伝子：DNA 4 6 7 7 7 - 1 2 5 3 ( U N Q 3 2 0 )

（ a ）全体的な表現型の概要：

配列類似性 3 を有するヒトファミリー、構成員 B ( F A M 3 B ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、脾臓において C D b + C D 1 1 c - 細胞（これは、単球 / マクロファージおよび好中球を含む）のパーセンテージの増加を示す（ - / - ）マウスがもたらされた。

変異型（ - / - ）マウスはまた、平均心拍数の減少を示した。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

【 0 9 4 9 】

（ b ）免疫学表現型解析

免疫関連疾患および炎症性疾患は、正常な生理機能において、傷害または損傷に応答し、傷害または損傷からの修復を開始し、そして外来生物体に対する先天的および後天的な防御を開始することによって重大な意味を有する、かなり複雑で、複雑に相互連結していることが多い生物学的経路の症状または結果である。これらの正常な生理学的経路が、応答の強度に直接関連してか、異常な制御もしくは過度の刺激の結果としてか、自己に対する応答としてか、またはこれらの組み合わせのいずれかとして、さらなる傷害または損傷を引き起こすときに、疾患または病態が生じる。

【 0 9 5 0 】

これらの疾患の起源が、多段階の経路および複数の異なる生物学的系 / 経路に関連することが多いが、これらの経路の 1 個以上の重大な点における介入は、寛解性または治療的な効果を有し得る。治療的な介入は、有害なプロセス / 経路の拮抗作用または有益なプロセス / 経路の刺激のいずれかによって生じ得る。

【 0 9 5 1 】

T リンパ球（T 細胞）は、哺乳動物の免疫応答の重要な成分である。T 細胞は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）内の遺伝子によってコードされる自己の分子に関連する抗原を認識する。この抗原は、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上に MHC 分子とともに提示され得る。T 細胞系は、宿主哺乳動物に対して健康への脅威をもたらすこれらの改変細胞を排除する。T 細胞としては、ヘルパー T 細胞および細胞

10

20

30

40

50

傷害性 T 細胞が挙げられる。ヘルパー T 細胞は、抗原提示細胞上の抗原 - M H C 複合体を認識した後、広範囲に増殖する。ヘルパー T 細胞はまた、種々のサイトカイン、すなわち、リンフォカインを分泌する。リンフォカインは、B 細胞、細胞傷害性 T 細胞および免疫応答に關与する他の種々の細胞の活性化において中心的な役割を果たす。

#### 【0952】

多くの免疫応答において、炎症細胞は、損傷または感染の部位を浸潤する。遊走細胞は、罹患組織の組織学的検査によって決定され得るような、好中球、好酸球、単球またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

10

多くの免疫関連疾患が知られており、広く研究されている。このような疾患としては、免疫媒介性炎症性疾患（例えば、関節リウマチ、免疫媒介性腎疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患（IBD）、乾癬および喘息）、非免疫媒介性炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全疾患、新形成および移植片拒絶などが挙げられる。免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を同定した。

#### 【0953】

免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を本明細書中で同定した。免疫関連疾患は、1つの場合において、免疫応答を抑制することによって処置され得る。免疫刺激性活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫媒介性疾患および炎症性疾患の処置に有益であり得る。免疫応答を阻害する分子は、免疫応答を阻害するために（タンパク質を直接または抗体アゴニストの使用を介して）利用され得、その結果、免疫関連疾患を寛解させ得る。

20

#### 【0954】

以下の試験を実施した：

蛍光標識細胞分取（FACS）解析

手順：

CD4、CD8およびT細胞レセプターを含む、末梢血由来の免疫細胞組成物のFACS解析を実施して、Tリンパ球、Bリンパ球に対するCD19、白血球マーカーとしてのCD45およびナチュラルキラー細胞に対するpan NKを評価した。FACS解析は、2匹の野生型および6匹のホモ接合性マウスにおいて実施し、胸腺、脾臓、骨髓およびリンパ節由来の細胞を含んだ。

30

#### 【0955】

これらの研究において、解析される細胞を、胸腺、末梢血、脾臓、骨髓およびリンパ節から単離した。単核細胞集団内のCD4およびCD8陽性のT細胞、B細胞、NK細胞および単球の相対的比率を決定するようにフローサイトメトリーを設定した。Becton-Dickinson FACSCalibur 3-レーザーFACS装置を使用して、免疫状態を評価した。表現型アッセイおよびスクリーニングのために、この装置は、CD4+/CD8+比に加えて、CD4+/CD8-、CD8+/CD4-、NK、B細胞および単球の数を記録する。6つの系統特異的抗体のパネル：CD45 PerCP、抗TCRβ APC、CD4 PE、CD8 FITC、pan-NK PEおよびCD19 FITCを用いて、各マウス由来の溶解末梢血の単一サンプルを染色することによって単核細胞プロファイルを得た。2種類のFITC標識抗体およびPE標識抗体は、相互に排他的な細胞タイプを染色する。CellQuestソフトウェアを備えたBecton-Dickinson FACSCaliburフローサイトメーターを使用してサンプルを解析した。

40

#### 【0956】

結果：

組織特異的FACS-マウス：

(-/-)マウスは、その(+/+)同腹仔のものと比較した場合、脾臓においてCD11b+ CD11c-細胞のパーセンテージの増加を示した。

50

したがって、変異型（-/-）マウスは、脾臓において単球/マクロファージおよび好中球のレベルの上昇を示した。

【0957】

（c）心臓学 - 心拍数

説明：

Visit ech BP - 2000 血圧解析システムによる4日間の非侵襲性テールカフ法によって心拍数を測定する。心拍数を、4日間にわたって1日10回測定する。次いで、4日間の値を平均して、マウスの意識下心拍数を得る。

【0958】

心拍数：

（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均心拍数の減少（1~2SD未満）を示した。

【0959】

48.8.DNA45234-1277（UNQ323）遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO382ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA45234-1277と命名）（UNQ323）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_080727 ACCESSION: NM\_080727 NID: 181415  
58 ムス・ムスクリス・ムスクリス膜貫通プロテアーゼ、セリン3（Tmprss3）；参照タンパク質：

Q8VDE0 ACCESSION: Q8VDE0 NID:  
ムス・ムスクリス（マウス）。

TMPRSS3 PROTEIN；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_024022 ACCESSION: NM\_024022 NID: 131734  
70 ホモ・サピエンスホモ・サピエンス膜貫通プロテアーゼ、セリン3（TMPRSS3）；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

P57727 ACCESSION: P57727 NID:

ホモ・サピエンス（ヒト）。

TRANSMEMBRANE PROTEASE、SERINE 3（EC 3.4.21.-）（SERINE PROTEASE TADG-12）（TUMOR ASSOCIATED DIFFERENTIALLY-EXPRESSED GENE-12 PROTEIN）。

【0960】

目的のマウス遺伝子は、ヒトTMPRSS3のオルソログであるTmprss3（膜貫通プロテアーゼ、セリン3）である。別名としては、DFNB8、DFNB10、ECHOS1、TADG12およびセリンプロテアーゼTADG12が挙げられる。

【0961】

TMPRSS3は、主に小胞体上に存在するII型内在性膜タンパク質であり、おそらくチャネル活性化セリンプロテアーゼとしての機能を果たしている。該タンパク質は、膜貫通セグメント、LDL受容体Aドメイン、スカベンジャー受容体ドメイン、タンパク質分解活性化部位、およびC末端セリンプロテアーゼドメインを含む（Wallrapp et al., Cancer Res 60(10):2602-6(2000); Guipponi et al., Hum Mol Genet 11(23):2829-36(2002)）。

バイオインフォマティック解析（Clark et al., Genome Res 13(10):2265-70(2003)）TMPRSS3が細胞外タンパク質であり得ることが示唆された。

TMPRSS3は、上皮のアミロリド感受性ナトリウムチャネルENaCの切断をインビ

10

20

30

40

50

トロで触媒し、該チャネルを活性化する。

TMPRSS3は、ENaC、例えば、蝸牛内のコルチ器および血管条を支持する細胞であるらせん神経節もまた発現するいくつかの組織において発現される。TMPRSS3はまた、胸腺、胃、精巣およびE19マウス胚においても発現される。

TMPRSS3は、おそらく、ENaC活性を調節することにより聴力においてある役割を果たしており、これにより、内耳の内リンパにおいて低濃度のナトリウムが維持される(Guipponi et al., Hum Mol Genet 11(23):2829-36(2002))。

TMPRSS3は、多くの場合、ある種の型の癌で過剰発現され、ここでは転移および腫瘍浸潤においてある役割を果たしている可能性がある(Wallrapp et al., Cancer Res 60(10):2602-6(2000); Underwood et al., Biochim Biophys Acta 1502(3):337-50(2000); Sawasaki et al., Tumour Biol 25(3):141-8(2004))。

TMPRSS3遺伝子における変異は感音難聴を引き起こし得る(Wattenhofer et al., J Mol Med 80(2):124-31(2002); Lee et al., J Med Genet 40(8):629-31(2003); Ahmed et al., BMC Med Genet 5(1):24(2004))。

#### 【0962】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹(ES)細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

#### 【0963】

#### 【化30】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	16	48	18	82
予測値	20.5	41	20.5	82

カイ二乗値 = 0.76 有意性 = 0.68386143 (hom/n) = 0.24 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え(標準)

説明：コードエクソン1をターゲティングした(NCBIアクセッションNM\_080727.1)。

1. 野生型発現パネル：RT-PCRによって試験された、26のすべての成体組織サンプルのうち、脳、脊椎、眼、胸腺、脾臓、および血液において標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【0964】

48.8.1. 表現型解析(破壊遺伝子：DNA45234-1277(UNQ323))

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒト膜貫通プロテアーゼ、セリン3(TMPRSS3)のオルソログをコードする遺伝

10

20

30

40

50

子の変異により、( - / - )マウスにおいて驚愕応答はもたらされず、聴力障害を示唆した。

顕微解析により、ホモ接合性変異型マウスにおいて、プレパルス抑制試験の際に認められた聴力障害と一致するコルチ器の変性が明らかになった。

標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【0965】

(b) 病理学

顕微鏡的：

解析に利用可能な4匹の( - / - )マウスのうち、3匹がコルチ器の変性を示した；該器官は、残りの変異型では、組織学的切開( s e c t i o n )のレベルではなかった。

これは、臨床的に認められた聴力障害の可能性と一致する。

【0966】

(c) 表現型解析：CNS / 神経学

神経学の分野において、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害を含む神経性障害および精神医学的障害の処置のためのインビボにおいて有効な標的の同定についての解析に本明細書中では注目した。神経障害は、「不安障害」として定義されるカテゴリーを含む。その「不安障害」としては、以下：軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、別段特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴うパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、I型またはII型の双極性障害、別段特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害にあてはまることもあり、その人格障害としては、以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない。

【0967】

手順：

行動スクリーニングを、4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性変異マウスのコホートにおいて実施した。生存能低下のために、より早期の試験が必要とならない限り、すべての行動試験は、12～16週齢の間に実施した。これらの試験には、不安、活動レベルおよび探索を測定するためのオープンフィールドが含まれていた。

【0968】

聴覚驚愕反射のプレパルス抑制

聴覚驚愕反射のプレパルス抑制は、大きな120デシベル(dB)驚愕誘発音が、より小さい(プレパルス)音に先行する場合に起こる。PPIパラダイムは、6種類の異なる試行型(70dBバックグラウンドノイズ、120dB単独、74dB+120dB-pp4、78dB+120dB-pp8、82dB+120dB-pp12、および90dB+120dB-pp20)からなり、各々、擬似ランダム順に6回、合計36回の試行が繰り返される。刺激に対する最大応答(Vmax)を、各試行型について平均する。100以下の120dB平均値を有する動物は、解析から除外する。プレパルスが動物の驚愕刺激に対する応答を抑制するパーセンテージを計算し、グラフで示す。

【0969】

結果：

PPI：

8匹の( - / - )マウスはすべて、驚愕応答を示さず、変異型における聴力障害を示唆した。

したがって、プレパルス抑制は評価され得なかった。

コルチ器の変性はこれらの観察結果と一致する。

## 【0970】

概日性試験の説明：

雌マウスを、試験の1日目の午後4時に48.2cm×26.5cmのホームケージ内に個々に収容し、飼料および水を随意に与える。動物を、12時間明/暗サイクル（午前7時に点灯し、午後7時に消灯する）に曝露する。システムソフトウェアが、動物の動きによって引き起こされる光線遮断回数を記録し、光線中断回数は自動的に移動回数で割り算される。活動性は、3日間の試験中、1時間間隔で60回記録する。得られたデータは、3日間の試験期間における各時間で記録した活動性レベル（概日リズム）の中央値および各明/暗サイクル中の総活動性（自発活動性）の中央値によって示される。

## 【0971】

結果：

日周期：

雌（-/-）マウスは、明期の1つにおいて活性の急上昇を示したが、サイクルの破壊は、試験期間を通して一貫していなかった。

## 【0972】

48.9.DNA26846-1397（UNQ328）遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO444ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA26846-1397と命名）（UNQ328）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_026274 ACCESSION: NM\_026274 NID:  
gi\_31541972 ref NM\_026274.2 ムス・ムスクルスRIKEN  
cDNA 4930470D19 遺伝子（4930470D19Rik）；参照タンパク質

Q8BVR6 ACCESSION: Q8BVR6 NID:  
ムス・ムスクルス（マウス）。

ムス・ムスクルス成体雄精巣cDNA、RIKEN完全長高含有ライブラリー、クローン：4930470D19産物：仮想SP1aおよびRYアノジン受容体（SPRY）/SPRYドメイン/RINGフィンガー含有タンパク質、完全挿入物配列（RIKEN cDNA 4930470D19）（MKIAA1972 タンパク質）；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_133368 ACCESSION: NM\_133368 NID:  
gi\_45387948 ref NM\_133368.1 ホモ・サピエンスKIAA1972タンパク質（KIAA1972）；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：  
Q96DX4 ACCESSION: Q96DX4 NID:

ホモ・サピエンス（ヒト）。

仮想タンパク質KIAA1972。

## 【0973】

目的のマウス遺伝子は、ヒトKIAA1972タンパク質のオルソログであるRIKEN cDNA 4930470D19遺伝子である。

## 【0974】

KIAA1972タンパク質は、シグナルペプチド、SPRY（splAおよびryアノジン受容体）ドメイン（SMARTアクセッションSM00449）、ならびにRING（Ringフィンガー）ドメイン（SMARTアクセッションSM00184）を含む推定E3ユビキチンリガーゼである。

RINGドメインは、多くの場合、E3ユビキチンリガーゼ活性を有し、多くのE3ユビキチンリガーゼに見られ得る（SMARTアクセッションSM00184）。

SPRYドメインは、おそらくタンパク質-タンパク質相互作用に参与している（Wang et al., J Biol Chem 280(16):

10

20

30

40

50



バイオインフォマティク解析により、K I A A 1 9 7 2 タンパク質は細胞外であることが示唆される ( C l a r k e t a l . , G e n o m e R e s 1 3 ( 1 0 ) : 2 2 6 5 - 7 0 ( 2 0 0 3 ) ) 。

#### 【 0 9 7 5 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

#### 【 0 9 7 6 】

##### 【 化 3 1 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	13	30	16	59
予測値	14.75	29.5	14.75	59

カイ二乗値 = 0 . 8 3 有意性 = 0 . 6 6 0 3 4 0 3 ( h o m / n ) = 0 . 2 2 平均同腹仔数 = 8

変異情報

変異型：相同組換え ( 標準 )

説明：コードエクソン 1 をターゲティングした ( N C B I アクセッション N M \_ 0 2 6 2 7 4 . 1 ) 。

1 . 野生型発現パネル：

標的遺伝子の発現は、R T - P C R によって試験した 2 6 の成体組織試料で、胚性幹 ( E S ) 細胞ならびに脊髄；胸腺；脾臓；肺；肝臓；骨格筋；骨；胃、小腸および結腸；心臓；脂肪；喘息肺；および血液において検出された。

2 . Q C 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【 0 9 7 7 】

4 8 . 9 . 1 . 表現型解析 ( 破壊遺伝子：D N A 2 6 8 4 6 - 1 3 9 7 ( U N Q 3 2 8 ) )

( a ) 全体的な表現型の概要：

推定ヒト E 3 ユビキチンリガーゼ ( K I A A 1 9 7 2 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、数多くの免疫学的異常を示す小型の ( - / - ) マウスがもたらされた。ホモ接合性変異型マウスは、その性別一致野生型同腹仔よりも小さく、平均体重および体長、総組織マスおよび除脂肪体重の減少を示した。その野生型同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、数多くの免疫学的異常、例えば、末梢血中のナチュラルキラー細胞のパーセンテージの減少ならびに L P S 攻撃に対する平均血清 I L - 6 および T N F 応答の増大がホモ接合性変異型マウスにおいて認められた。( - / - ) マウスで観察された免疫学的異常は、U N Q 3 2 8 の E 3 ユビキチンリガーゼ活性により媒介される作用機序によるものであり得る。

また、変異型は、オープンフィールド試験において活動性の低下または鬱様表現型を示した。

( - / - ) マウスは、拡張期血圧の増加および心拍数の減少を伴う全身性高血圧症を示した。血液化学の結果により、おそらく肝細胞機能不全または胆管閉塞に関連しているアルカリホスファターゼレベルの増加が示された。雄 ( - / - ) マウスは、マイクロ C T 椎骨密度の測定値の顕著な減少を示した。

標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

## 【0978】

## (b) 免疫表現型解析

免疫関連疾患および炎症疾患は、通常の生理学では発作または損傷に応答し、発作または損傷からの修復を開始し、外来生物に対する先天性および後天性防御を増加させるために極めて重要な非常に複雑でしばしば複数の相互関連した生物学的経路の徴候および結果である。これらの正常な生理学的経路が応答強度の直接的関連、異常な制御または過剰な刺激の結果、自己反応、またはこれらの組み合わせとしてさらなる発作または損傷を引き起こす場合、疾患または病変が起こる。

## 【0979】

これらの疾患の発症は、しばしば多段階経路およびしばしば複数の異なる生体系 / 生物学的経路に関与するが、1つまたは複数のこれらの経路における臨界点での介入が改善効果または治療効果を示し得る。有害な過程 / 経路の拮抗作用または有益な過程 / 経路の刺激のいずれかによって治療介入を行うことができる。

## 【0980】

Tリンパ球(T細胞)は、哺乳動物免疫応答の重要な構成要素である。T細胞は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)内の遺伝子によってコードされる自己分子に関連する抗原を認識する。抗原を、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上のMHC分子と共に提示することができる。T細胞系は、宿主哺乳動物の健康に害を及ぼすこれらの変化した細胞を排除する。T細胞には、ヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞が含まれる。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上の抗原-MHC複合体の認識後に大規模に増殖する。ヘルパーT細胞はまた、B細胞、細胞傷害性T細胞、および免疫応答に関与する種々の他の細胞の活性化で中心的な役割を果たす種々のサイトカイン(すなわち、リンフォカイン)を分泌する。

## 【0981】

多くの免疫応答では、炎症細胞が損傷部位または感染部位に浸潤する。移動細胞は、罹患組織の組織学的試験によって決定することができる好中球、好酸球、単球、またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

多くの免疫関連疾患が公知であり、広く研究されている。このような疾患には、免疫介在炎症疾患(関節リウマチ、免疫介在腎臓疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患(IBD)、乾癬、および喘息など)、非免疫介在炎症疾患、感染症、免疫不全、新形成、および移植片拒絶などが含まれる。免疫学領域では、炎症および炎症障害の治療のための標的を同定した。

## 【0982】

免疫学領域では、本明細書中で、炎症および炎症障害の治療のための標的を同定した。免疫関連障害を、ある場合において、免疫応答の抑制によって治療することができる。免疫刺激活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫介在疾患および炎症疾患の治療で有利であろう。免疫応答を阻害する分子(直接または抗体作用剤の使用を介したタンパク質)を使用して、免疫応答を阻害し、免疫関連疾患を改善することができる。

## 【0983】

以下の試験を行った。

## 【0984】

急性期応答：

試験の説明：細菌リポ多糖(LPS)は内毒素であり、そのようなものとして、急性期応答および全身性炎症の強い誘導因子である。レベルI LPSマウスに、26ゲージの針を使用して、亜致死量のLPSを含む200μL滅菌生理食塩水を腹腔内(i.p.)注射した。この用量は、注射から3時間後に1μg/g体重で試験したマウスの平均体重に基づいた。次いで、100μLの血液サンプルを採取し、FACSCalibur装置でTNFα、MCP-1、およびIL-6の存在について分析した。

## 【0985】

結果：

急性期応答：（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較した場合、LPS攻撃に対する平均血清IL-6およびTNF- 応答が増加した。

## 【0986】

まとめると、LPS内毒素攻撃は、PRO444ポリペプチドをコードする遺伝子が欠損したノックアウトマウスは、その野生型同腹仔と比較した場合、免疫学的異常を示すことを示した。特に、変異マウスは、LPS内毒素で攻撃した場合、免疫応答（IL-6およびTNF- 産生）を誘発する能力の増加を示した。IL-6およびTNF- は、より後期のB細胞活性化に寄与する。さらに、IL-6は、急性期反応および全身性炎症の誘導に重要な役割を果たす。これにより、PRO444ポリペプチドのインヒビターまたはアンタゴニストが免疫系を刺激し、この効果が白血病、他の癌型、および免疫不全患者（AIDS患者など）などの場合の個体に有利である場合に使用されるであろうということが示唆される。したがって、PRO444ポリペプチドまたはその作用剤は、免疫応答の阻害で有用であり、例えば、移植片拒絶または移植片対宿主疾患の場合の有害な免疫応答の抑制のための有用な候補であろう。

## 【0987】

蛍光標識細胞分取（FACS）解析

手順：

CD4、CD8およびT細胞レセプターを含む、末梢血由来の免疫細胞組成物のFACS解析を実施して、Tリンパ球、Bリンパ球に対するCD19、白血球マーカーとしてのCD45およびナチュラルキラー細胞に対するpan NKを評価した。FACS解析は、2匹の野生型および6匹のホモ接合性マウスにおいて実施し、胸腺、脾臓、骨髄およびリンパ節由来の細胞を含んだ。

## 【0988】

これらの研究において、解析される細胞を、胸腺、末梢血、脾臓、骨髄およびリンパ節から単離した。単核細胞集団内のCD4およびCD8陽性のT細胞、B細胞、NK細胞および単球の相対的比率を決定するようにフローサイトメトリーを設定した。Beckton-Dickinson FACSCalibur 3-レーザーFACS装置を使用して、免疫状態を評価した。表現型アッセイおよびスクリーニングのために、この装置は、CD4+/CD8+比に加えて、CD4+/CD8-、CD8+/CD4-、NK、B細胞および単球の数を記録する。6つの系統特異的抗体のパネル：CD45 PerCP、抗TCRb APC、CD4 PE、CD8 FITC、pan-NK PEおよびCD19 FITCを用いて、各マウス由来の溶解末梢血の単一サンプルを染色することによって単核細胞プロファイルを得た。2種類のFITC標識抗体およびPE標識抗体は、相互に排他的な細胞タイプを染色する。Cell Questソフトウェアを備えたBeckton-Dickinson FACSCaliburフローサイトメーターを使用してサンプルを解析した。

## 【0989】

結果：

FACS3：

（-/-）マウスは、その（+/+）同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、ナチュラルキラー細胞の平均パーセンテージの減少を特徴とする末梢血中の白血球サブセットの分布の変化を示した。

## 【0990】

これらのFACS結果から、ホモ接合性変異マウスにおいてナチュラルキラー細胞の平均パーセンテージが減少したことが示される。ナチュラルキラー細胞は、ウイルスの免疫および腫瘍に対する防御に関係するので、これらの細胞は、ウイルス感染に対する防御の第一線である。ナチュラルキラー細胞すなわちNK細胞は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害におけるエフェクターとして作用し、それらは、事前の免疫または活性化の必要なしに

10

20

30

40

50

、特定のリンパ系腫瘍細胞株をインビトロにおいて殺滅する能力によって同定されてきた。

したがって、PRO444ポリペプチドまたはそのアゴニストは、この白血球生成の刺激または調節に有用であり得る。

#### 【0991】

(c) 表現型解析：代謝 - 血液化学

代謝領域では、代謝障害の治療のための標的を同定することができる。血液化学表現型解析は血糖値測定も含む。COBAS Integra 400 (mfr. Roche) を、マウスの血流化学試験のために使用した。血糖値の測定に加えて、以下の血液化学試験も日常的に行う：アルカリホスファターゼ；アラニンアミノトランスフェラーゼ；アルブミン；ビリルビン；リン；クレアチニン；BUN = 血中尿素窒素；カルシウム；尿酸；ナトリウム；カリウム；および塩化物。代謝領域では、糖尿病治療のための標的を同定することができる。血液化学表現型解析は、インスリン感受性およびグルコース代謝の変化を測定するための耐糖能試験を含む。耐糖能試験の異常な結果は、以下の障害または容態を示し得るが、これらに限定されない：1型および2型糖尿病、症候群X、種々の心血管疾患、および/または肥満症。

10

#### 【0992】

手順：

血液化学：雄および雌(-/-)マウスの両方は、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清アルカリホスファターゼレベルが増加した。この結果は、肝臓の変化に起因する可能性が高い。

20

これらの結果は、肝細胞機能不全または胆管閉塞によるものであり得る。

#### 【0993】

(d) 骨代謝および骨診断

(1) 組織マスおよび除脂肪体重測定 - Dexa

Dexa解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)を、うまく使用して総組織質量(TTM)の変化を同定した。

30

#### 【0994】

Avertin (1.25% 2, 2, 2, -トリブromoエタノール, 20 mL/kg 体重) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXAスキャンのためにPIXImus TMDensitometer (Lunar Inc.) のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域(ROI、すなわち、全身、椎骨および両大腿骨)の骨塩密度(BMD)および脂肪組成物(%脂肪)および総組織質量(TTM)を測定した。

#### 【0995】

身体測定(体長および体重)：

身体測定：約16週齢で体長および体重の測定を行った。

40

#### 【0996】

結果：

体重：(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較して平均体重の減少を示した。

#### 【0997】

体長：(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較して平均体長が減少した。

(2) 骨代謝：放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治療を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

50

・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのDEXA  
 ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCT  
 を含んだ。

#### 【0998】

Dexa解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量(BMC)、BMC/LBM比、容量測定による骨塩密度(vBMD)、全身BMD、大腿骨BMDおよび椎骨BMDを測定した。

10

#### 【0999】

Avertin(1.25%2,2,2-トリブromoエタノール,20mL/kg体重)をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンシトメーター(Lunar Inc.)のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域(ROI)[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度(BMD)および脂肪組成物(%脂肪)および総組織質量(TTM)を測定した。

#### 【1000】

骨マイクロCT解析：

20

手順：マイクロCTを使用して、非常に感度の高いBMDの測定を行った。1つの椎骨および1つの大腿骨を、4匹の野生型マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートから取り出した。腰部の5つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。 $\mu$ CT40スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、16マイクロメートルの解像度で第5腰部椎骨(LV5)において解析し、皮質骨パラメータを、20マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

#### 【1001】

結果：

30

Dexa：

雄および雌(-/-)マウスの両方は、その性別一致(+/-)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均総組織マス、除脂肪体重、ならびに骨塩量および密度の測定値の減少を示した。

#### 【1002】

マイクロCT：雄(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均脊椎小柱の体積、数、厚さ、および連結密度が顕著に減少し、大腿骨中軸の平均皮質厚および平均断面積が減少した。

#### 【1003】

PRO444ポリペプチドをコードする遺伝子が欠失した変異型(-/-)マウスは、体重および体長の減少が顕著な成長遅延と一致する表現型を示す。

40

したがって、PRO444ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニストまたはインヒビターは、これらの代謝関連作用および成長関連作用を模倣し得る。他方で、PRO444ポリペプチドまたはそのアゴニストは、糖尿病または他の組織的疾患などの代謝障害の予防および/または処置に有用であり得る。

また、DEXAおよびマイクロCTによって解析した(-/-)マウスは、その(+/-)同腹仔と比較した場合、骨測定値の減少およびボディマス測定値の減少を示し、異常な骨障害が示唆された。

その(-/-)マウスは、負の骨表現型を示し、骨の代謝障害を反映する骨測定値が異常に減少した。

50

また、平均総組織マスおよび除脂肪体重の減少は、成長遅延および組織消耗性障害に関連する代謝障害を示す。

骨の負の表現型は、PRO444ポリペプチドまたはそのアゴニストが、正常な成長発達に加えて骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。

#### 【1004】

PRO444ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎または骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、PRO444ポリペプチドのアнтаゴニスト（またはインヒビター）およびそのコード遺伝子は、関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む異常な骨代謝に関連する炎症性障害を含む異常または病的な骨障害を引き起こすであろう。

#### 【1005】

(e) 表現型解析：CNS / 神経学

神経学の分野において、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害を含む神経性障害および精神医学的障害の処置のためのインビボにおいて有効な標的の同定についての解析に本明細書中では注目した。神経障害は、「不安障害」として定義されるカテゴリーを含む。その「不安障害」としては、以下：軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、別段特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴うパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、I型またはII型の双極性障害、別段特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害にあてはまることがあり、その人格障害としては、以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【1006】

手順：

行動スクリーニングを、4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性変異マウスのコホートにおいて実施した。生存能低下のために、より早期の試験が必要とならない限り、すべての行動試験は、12～16週齢の間に実施した。これらの試験は、不安、活動性レベルおよび探索を計測するためのオープンフィールドを含んだ。

#### 【1007】

オープンフィールド試験：

公知の薬物のいくつかの標的は、オープンフィールド試験において表現型を示した。これらとしては、セロトニン (serotonin) トランスポーター、ドーパミントランスポーター (Giros et al., Nature, 1996 Feb 15; 379 (6566): 606-12) および GABA レセプター (Homans et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1997 Apr 15; 94 (8): 4143-8) のノックアウトを含む。自動化されたオープンフィールドアッセイをカスタマイズして、感情状態に関連する変化および学習に関する探索パターンを扱った。まず、フィールド (40 x 40 cm) をマウスに対して比較的大きくするように選択することによって探索に関連する自発運動の変化を取り上げるように設計した。さらに、4つの穴を床に設け、探索に特に関連する活動である鼻の突っ込みを可能にした。この試験に関連した感情状態を高めるためにいくつかの因子を設けた。オープンフィールド試験は、マウスが試験される最初の実験的手順であり、なされる測定は被験体のチャンバーとの最初の経験であった。さらに、オープンフィールドは明るく照らした。これらの因子のすべてによって、新しい開放性空間に関連する天然の不安が高められる。次いで、探索活動のパターンおよび程度ならびに特に中心からの全移動距離比は、不安または抑鬱症に対する罹りやすさに関する変化を識別することができる。3つの異なったレベルでの赤外線ビームを用いた大きな活動領域 (40 cm x 40 cm, AccuScan Instr

10

20

30

40

50

umentsのVersaMax動物活動性モニターシステム)を用いて、直立、穴への突っ込みおよび自発運動を記録した。動物を中心に置き、その活動を20分間測定した。この試験のデータを4分間隔で5回分析した。全移動距離(cm)、垂直移動回数(直立)、穴突っ込み回数および中心からの全移動距離比を記録した。

#### 【1008】

マウスが新しい環境に対して正常な慣れ応答を示す傾向を、5回の間隔にわたるその水平自発運動の変化すべてを測定することにより評価する。経時的な活動性の変化のこの算定傾きは、絶対値ではなく正規化された全移動距離を使用して決定する。傾きは5回の間隔のそれぞれにおける正規化された活動を通しての回帰直線から決定する。正常な慣れは、負の傾きの値によって表される。

10

#### 【1009】

結果：

雄(-/-)マウスは、オープンフィールド試験の際、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較した場合、活動性の低下を示し、変異型における不安様応答の減少が示唆された。

#### 【1010】

注目すべき差が、オープンフィールド活動性試験中に観察された。(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔と比較して、中心領域にいる時間の合計の中央値の増加(活動性の低下)を示した。これは、変異体における不安様応答の低下を示唆する。したがって、ノックアウトマウスは、抑鬱症、全般性不安障害、認知障害、痛覚過敏ならびに感覚障害および/または双極性障害と一致する表現型を示した。したがって、PRO444ポリペプチドおよびそのアゴニストは、抑鬱性障害に関連する症状の処置または寛解に有用であり得る。

20

#### 【1011】

(f)心臓学 - 血圧 / 心拍数

説明：

Visitech BP-2000血圧解析システムによる4日間の非侵襲性テールカフ法によって収縮期血圧を測定する。血圧を、4日間にわたって1日10回測定する。次いで、4日間の値を平均して、マウスの意識下収縮期血圧を得る。

#### 【1012】

30

結果

血圧：

雌(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔のものと比較した場合、平均収縮期血圧の増大を示したが、歴史的平均内であった。

#### 【1013】

説明：

Visitech BP-2000血圧解析システムによる4日間の非侵襲性テールカフ法によって心拍数を測定する。心拍数を、4日間にわたって1日10回測定する。次いで、4日間の値を平均して、マウスの意識下心拍数を得る。

心拍数：

40

雌(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均心拍数の減少を示した。

#### 【1014】

48.10.DNA50914-1289(UNQ369)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO705ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA50914-1289と命名)(UNQ369)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_011821 ACCESSION: NM\_011821 NID: 710632

50

4 ムス・ムスクルスムス・ムスクルスグリピカン6 ( G p c 6 ) ; 参照タンパク質 :  
Q 9 R 0 8 7 A C C E S S I O N : Q 9 R 0 8 7 N I D :  
ムス・ムスクルス ( マウス ) 。

G L Y P I C A N - 6 P R E C U R S O R ; 参照ヒト遺伝子配列 :  
N M \_ 0 0 5 7 0 8 A C C E S S I O N : N M \_ 0 0 5 7 0 8 N I D : 8 0 5 1 6 0  
1 ホモ・サピエンスホモ・サピエンスグリピカン6 ( G P C 6 ) ; ヒトタンパク質配列は  
、次のものに対応する :

Q 9 Y 6 2 5 A C C E S S I O N : Q 9 Y 6 2 5 N I D :  
ホモ・サピエンス ( ヒト ) 。

G L Y P I C A N - 6 P R E C U R S O R 。

10

#### 【 1 0 1 5 】

目的のマウス遺伝子は、ヒト G P C 6 のオルソログである G p c 6 ( グリピカン6 ) で  
ある別名としては、M G C 3 2 2 2 1 、 6 7 2 0 4 2 9 C 2 2 R i k 、 b A 6 2 D 2 3 .  
1 ( グリピカン6 ) 、 b A 6 3 2 L 2 . 2 ( グリピカン6 ) および b A 1 5 8 B 1 4 . 1  
( グリピカン6 ) が挙げられる。

#### 【 1 0 1 6 】

G P C 6 は、増殖因子シグナル伝達の共受容体または調節因子として機能している可能  
性がある細胞外グリコシルホスファチジルイノシトール ( G P I ) 固定ヘパラン硫酸プロ  
テオグリカンである。該タンパク質は、ほとんどの組織、特に腎臓および卵巣において発  
現される。

20

G P C 6 は、おそらく、発達中の形態形成においてある役割を果たしている ( V e u g e  
l e r s e t a l . , J B i o l C h e m 2 7 4 ( 3 8 ) : 2 6 9 6 8 - 7 7  
( 1 9 9 9 ) ; P a i n e - S a u n d e r s e t a l . , G e n o m i c s 5 7  
( 3 ) : 4 5 5 - 8 ( 1 9 9 9 ) ; D e C a t a n d D a v i d , S e m i n C  
e l l D e v B i o l 1 2 ( 2 ) : 1 1 7 - 2 5 ( 2 0 0 1 ) ; F i l m u s , G  
l y c o b i o l o g y 1 1 ( 3 ) : 1 9 R - 2 3 R ( 2 0 0 1 ) ) 。

#### 【 1 0 1 7 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup>  
由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビ  
ノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精する  
ことにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。ま  
れに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マ  
ウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受  
精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスにつ  
いてレベル I 表現型解析を実施する。

30

#### 【 1 0 1 8 】

#### 【 化 3 2 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	18	36	0	54
予測値	13.5	27	13.5	54

40

カイ二乗値 = 1 2 . 3 6 有意性 = 0 . 0 0 2 0 7 0 4 2 8 ( h o m / n ) = 0 . 1 1 平  
均同腹仔数 = 8

変異情報

変異型 : 相同組換え ( 標準 )

説明 : コードエクソン 1 ( N C B I アクセッション N M \_ 0 1 1 8 2 1 . 1 ) をターゲテ  
ィングした。

1 . 野生型発現パネル : R T - P C R によって試験された、胚性幹細胞 ( E S ) 細胞およ  
び 1 3 のすべての成体組織サンプルにおいて標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現 : 標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した

50



。

## 【1019】

48.10.1.表現型解析(破壊遺伝子:DNA50914-1289(UNQ369))

(a)全体的な表現型の概要:

ヒトグリピカン6(GPC6)のオルソログをコードする遺伝子の変異により、(-/-)変異型の致死がもたらされた。

しかしながら、すべての(-/-)マウスが胚致死性を示した場合であっても、致死にはばらつきがあった:

一部の致死は12.5日前であり、一部は通常12.5日であった。

10

ホモ接合性マウスにおけるこの観察された致死は、おそらく増殖因子シグナル伝達の血管または欠如によるものであり得る。ヘテロ接合性(+/-)マウスは、平均血清グルコースレベルの増加ならびに血小板計数の増加を示した。

遺伝子破壊をサザンブロットによって確認した。

## 【1020】

(b)病理学

顕微鏡的:12.5日目に、40個の胚:6個の(-/-)胚、18個の(+/-)胚、11個の(+/+)胚、4個の再吸収モルおよび1個の不確定な胚が観察された。

しかしながら、(-/-)胚では構造的発達異常は検出されなかった。

20

## 【1021】

遺伝子発現:LacZ活性は、免疫組織化学によって組織パネルにおいて検出されなかった。

## 【1022】

致死性の胚の発達異常に関連する考察:

ノックアウトマウスにおける胚性致死は、通常、種々の重篤な発生上の問題(神経変性疾患、血管障害、炎症性疾患が挙げられるが、これらに限定されない)によって生じるか、または遺伝子/タンパク質が多く細胞型において基礎的な細胞シグナル伝達プロセスで重要な役割を果たす場合に生じる。さらに、胚性致死は、潜在的な癌モデルとして有用である。同様に、対応するヘテロ接合性(+/-)変異動物は、これらがノックアウトされた遺伝子の機能に関する非常に有益な手がかりを明らかにする表現型および/または病理学報告を示す場合に特に有用である。例えば、EPOノックアウト動物は胚致死性を示したが、胚に関する病理学報告は、RBCの著しい欠如を示した。

30

## 【1023】

(c)免疫表現型解析

免疫関連疾患および炎症疾患は、通常の生理学では発作または損傷にตอบสนองし、発作または損傷からの修復を開始し、外来生物に対する先天性および後天性防御を増加させるために極めて重要な非常に複雑でしばしば複数の相互関連した生物学的経路の徴候および結果である。これらの正常な生理学的経路が応答強度の直接的関連、異常な制御または過剰な刺激の結果、自己反応、またはこれらの組み合わせとしてさらなる発作または損傷を引き起こす場合、疾患または病変が起こる。

40

## 【1024】

これらの疾患の発症は、しばしば多段階経路およびしばしば複数の異なる生体系/生物学的経路に関与するが、1つまたは複数のこれらの経路における臨界点での介入が改善効果または治療効果を示し得る。有害な過程/経路の拮抗作用または有益な過程/経路の刺激のいずれかによって治療介入を行うことができる。

## 【1025】

Tリンパ球(T細胞)は、哺乳動物免疫応答の重要な構成要素である。T細胞は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)内の遺伝子によってコードされる自己分子に関連する抗原を認識する。抗原を、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上のMHC分子と共に提示することができる。T細胞系は、宿主哺乳動物の健康に害を及ぼ

50

すこれらの変化した細胞を排除する。T細胞には、ヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞が含まれる。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上の抗原-MHC複合体の認識後に大規模に増殖する。ヘルパーT細胞はまた、B細胞、細胞傷害性T細胞、および免疫応答に関与する種々の他の細胞の活性化で中心的な役割を果たす種々のサイトカイン（すなわち、リンフォカイン）を分泌する。

【1026】

多くの免疫応答では、炎症細胞が損傷部位または感染部位に浸潤する。移動細胞は、罹患組織の組織学的試験によって決定することができる好中球、好酸球、単球、またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

10

多くの免疫関連疾患が公知であり、広く研究されている。このような疾患には、免疫介在炎症疾患（関節リウマチ、免疫介在腎臓疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患（IBD）、乾癬、および喘息など）、非免疫介在炎症疾患、感染症、免疫不全、新形成、および移植片拒絶などが含まれる。免疫学領域では、炎症および炎症障害の治療のための標的を同定した。

【1027】

免疫学領域では、本明細書中で、炎症および炎症障害の治療のための標的を同定した。免疫関連障害を、ある場合において、免疫応答の抑制によって治療することができる。免疫刺激活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫介在疾患および炎症疾患の治療で有利であろう。免疫応答を阻害する分子（直接または抗体作用剤の使用を介したタンパク質）を使用して、免疫応答を阻害し、免疫関連疾患を改善することができる。

20

【1028】

以下の試験を行った。

【1029】

血液学解析：

試験の説明：血液試験は、Abbott社のCell-Dyn3500R自動血液学分析装置によって行う。その特徴の一部としては、5種類の白血球分画が挙げられる。「患者」レポートには、全部で22を超えるパラメータが含まれ得る。

30

【1030】

結果：

血液学：（+/-）マウスは、その（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血小板数の増加を示した。

【1031】

したがって、ヘテロ接合性マウスにより、凝固障害に関連する表現型がもたらされた。

【1032】

（d）表現型解析：代謝 - 血液化学

代謝領域では、糖尿病治療のための標的を同定することができる。血液化学表現型解析には、血糖値測定が含まれる。COBAS Integra 400（mfr. Roche）を、マウスの血流化学試験のために使用した。代謝領域では、糖尿病治療のための標的を同定することができる。

40

【1033】

結果：

血液化学：雌（+/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較して、平均血清グルコースレベルの増加を示した。

したがって、ヘテロ接合性（+/-）マウスは、異常なグルコース代謝に関連する負の表現型を示した。

【1034】

48.11.DNA58847-1383（UNQ528）遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

50

これらのノックアウト実験において、PRO1071ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA58847-1383と命名）（UNQ528）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

AK045085 ムス・ムスクルス9.5日胚の単為発生胚（parthenogenote）cDNA、RIKEN完全長高含有ライブラリー、クローン：B130031C01産物：ADAM-TS RELATED PROTEIN 1ホモログ[ホモ・サピエンス]；参照タンパク質：

Q8BLI0 ADAMTS様タンパク質1前駆体（Punctin）gi|26337059|dbj|BAC32213.1|無名タンパク質産物[ムス・ムスクルス]；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_139238 ホモ・サピエンスADAMTS様1（ADAMTSL1）、転写物改変体1；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

NP\_640329 ADAMTS様1 アイソフォーム 1 [ホモ・サピエンス]。  
【1035】

目的のマウス遺伝子は、ヒトADAMTSL1のオルソログであるAdamtsl1（ADAMTS様1）である。別名としては、punctin-1、6720426B09Rik、ADAMTSR1、MGC40193、punctin、ADAMTSL-1、ADAMTS様、トロンボスポンジン、およびADAM-TS関連タンパク質1が挙げられる。

【1036】

ADAMTSL1は、主に骨格筋において発現される分泌タンパク質であり、おそらく細胞外マトリックスタンパク質としての機能を果たしている。

ADAMTSL1は、プロテアーゼのADAMTSファミリーと構造が類似している。該タンパク質は、シグナルペプチド、トロンボスポンジン型1反復配列（PFAMアクセッションPF00090）、ADAM-TSスパー1領域（PFAMアクセッションPF05986）、および2～4つ以上のトロンボスポンジン型I反復配列を含むが、メタロプロテアーゼおよびディスインテグリン様ドメインを欠く（Hirohata et al., J Biol Chem 277(14):12182-9(2002)）。

【1037】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹（ES）細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

【1038】

【化33】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	23	35	17	75
予測値	18.75	37.5	18.75	75

カイ二乗値 = 0.92 有意性 = 0.63128364 (hom/n) = 0.24 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え（標準）

説明：コードエクソン1をターゲティングした（NCBIアクセッションAK045085）。

10

20

30

40

50

1. 野生型発現パネル：骨、脂肪および血液以外の26のすべての成体組織サンプルにおいて標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【1039】

48.11.1. 表現型解析（破壊遺伝子：DNA58847-1383（UNQ528）

（a）全体的な表現型の概要：

ヒトADAMTS様1（ADAMTSL1）のオルソログをコードする遺伝子の変異により、（-/-）マウス平均皮膚線維芽細胞の増殖割合の減少を示すがもたらされた。

また、変異型（-/-）マウスは、総組織マス、除脂肪体重の減少および骨中無機質密度の測定値の減少を示した。

ホモ接合性マウスはまた、平均血清グルコースレベルの上昇を示した。

標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【1040】

（b）骨代謝および全身診断学/放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのDEXA

・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCT

を含んだ。

#### 【1041】

Dexa解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法（DEXA）を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量（BMC）、BMC/LBM比、容量測定による骨塩密度（vBMD）、全身BMD、大腿骨BMDおよび椎骨BMDを測定した。

#### 【1042】

Avertin（1.25%2,2,2-トリブロモエタノール,20mL/kg体重）をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンシトメーター（Lunar Inc.）のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域（ROI）[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度（BMD）および脂肪組成物（%脂肪）および総組織質量（TTM）を測定した。

#### 【1043】

骨マイクロCT解析：

手順：マイクロCTを使用して、非常に感度の高いBMDの測定を行った。1つの椎骨および1つの大腿骨を、4匹の野生型マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートから取り出した。腰部の5つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。μCT40スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、16マイクロメートルの解像度で第5腰部椎骨（LV5）において解析し、皮質骨パラメータを、20マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

#### 【1044】

結果：

Dexa：

雌（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均総組織マス、除脂肪体重、ならびに骨塩量および密度の測定値の減少を示した。

しかしながら、変異型の平均骨塩量指数（BMC/LBM）は歴史的範囲内であった。

#### 【1045】

PRO1071ポリペプチドをコードする遺伝子が欠失した変異型（-/-）マウスは、組織消耗性疾患と一致する表現型（総組織マスおよび除脂肪体重の減少）を示す。

したがって、PRO1071ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニストまたはインヒビターは、これらの代謝関連作用を模倣し得る。他方で、PRO1071ポリペプチドまたはそのアゴニストは、悪液質または他の組織のいそう疾患などのそのような代謝障害の予防および/または処置に有用であり得る。

10

#### 【1046】

また、DEXAによって解析した（-/-）マウスは、その（+/+）同腹仔と比較した場合、骨測定値の減少ならびに全身骨塩量および密度の測定値の減少を示し、異常な骨障害を示唆する。

その（-/-）マウスは、負の骨表現型を示し、骨の代謝障害を反映する骨測定値が異常に減少した。

骨の負の表現型は、PRO1071ポリペプチドまたはそのアゴニストが、正常な成長発達に加えて骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。

さらに、PRO1071ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、PRO1071ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト（またはインヒビター）は、関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む異常な骨代謝に関連する炎症性疾患を含む、異常な骨障害または病理学的な骨障害に導き得る。

20

#### 【1047】

（c）表現型解析：代謝 - 血液化学

代謝領域では、糖尿病および他の代謝障害の治療のための標的を同定することができる。血液化学表現型解析には、血糖値測定が含まれる。COBAS Integra 400（mfr. Roche）を、マウスの血流化学試験のために使用した。代謝領域では、糖尿病治療のための標的を同定することができる。

#### 【1048】

結果：

血液化学：雌（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清グルコースレベルが増加した。

30

#### 【1049】

したがって、変異型（-/-）マウスは、グルコース代謝の変化または糖尿病に関連するものであり得る高血糖症を示した。

PRO1071ポリペプチドまたはそのアゴニストは、正常なグルコースレベル/代謝の維持に有用であり得、おそらく糖尿病の処置に有用であり得る。

#### 【1050】

（d）成体皮膚細胞増殖：

手順：皮膚細胞を16週齢の動物（2匹の野生型マウスおよび4匹のホモ接合性マウス）から単離した。これらを、初代線維芽細胞培養物に発達させて、その線維芽細胞増殖速度を厳密に制御されたプロトコルにおいて測定した。このアッセイが過剰増殖性表現型および低増殖性表現型を検出する能力は、p53およびKu80で証明されている。BrdU取り込みを使用して増殖を測定した。

40

#### 【1051】

詳細には、これらの研究において、皮膚線維芽細胞増殖アッセイを使用した。標準化された培養物中の細胞数の増加を、相対的な増殖能力の基準として使用した。野生型マウスおよび変異マウスから採取した皮膚バイオプシーから初代線維芽細胞を確立した。5万個の細胞の2つ組または3つ組の培養物を播種し、6日間生育させた。培養期間の終わり

50

に、培養物中に存在する細胞の数を、電子粒子カウンターを使用して測定した。

#### 【1052】

結果：

皮膚の増殖：

雌（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均皮膚線維芽細胞の増殖割合の減少を示した。

#### 【1053】

したがって、ホモ接合性変異マウスは、低増殖性の表現型を示した。これらの観察結果により示唆されるように、PRO1071ポリペプチドのアンタゴニストまたはインヒビターは、この低増殖性表現型を模倣し得、腫瘍サプレッサーとして機能し得、異常な細胞増殖を低下させるのに有用であり得る。

10

#### 【1054】

48.12.DNA60619-1482（UNQ563）遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO1125ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA60619-1482と命名）（UNQ563）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_013763 ACCESSION: NM\_013763 NID:

gi\_31543844 ref NM\_013763.2 ムス・ムスクルストランスデューシン（様2（Tb12）；参照タンパク質：

20

Q8CFY0 ACCESSION: Q8CFY0 NID:

ムス・ムスクルス（マウス）。

トランスデューシン（）様2と類似；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_032988 ACCESSION: NM\_032988 NID:

gi\_14670378 ref NM\_032988.1 ホモ・サピエンストランスデューシン（）様2（TBL2）、転写物改変体2；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q8N2L6 ACCESSION: Q8N2L6 NID:

ホモ・サピエンズ（ヒト）。

30

仮想タンパク質FLJ90138。

#### 【1055】

目的のマウス遺伝子は、ヒトTBL2のオルソログであるTb12（トランスデューシン〔〕様2）である。別名としては、WS-bTRP、WBS CR13、WS-TRP、DKFZP43N024およびウィリアムス-ビューレン症候群染色体領域13が挙げられる。

#### 【1056】

TBL2は、シグナルペプチドおよび5つのWD40反復配列を含む推定分泌タンパク質である（Clark et al., Genome Res 13(10):2265-70(2003)）。

40

WD40反復配列を含むタンパク質は、一般的に、多タンパク質複合体合成の骨格としての機能を果たす。WD40反復配列を有するタンパク質の例としては、Gタンパク質、転写因子およびE3ユビキチンリガーゼ（SMARTアクセションSM00320）が挙げられる。

TBL2は、主に、精巣、骨格筋、心臓および種々の内分泌組織において発現される。

TBL2は、ウィリアムス-ビューレン症候群に關与している可能性がある（Meng et al., Hum Genet 103(5):590-9(1998)；Perez-Jurado et al., Cytogenet Cell Genet 86(3-4):277-84(1999)）。

#### 【1057】

50

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 129 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 (E S) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 129 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

【 1 0 5 8 】

【 化 3 4 】

10

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	18	29	16	63
予測値	15.75	31.5	15.75	63

カイ二乗値 = 3 . 1 9 有意性 = 0 . 2 0 2 9 0 8 5 2 ( h o m / n ) = 0 . 2 平均同腹仔数 = 8

変異情報

変異型：相同組換え (標準)

説明：コードエクソン 1 をターゲティングした ( N C B I アクセッション N M \_ 0 1 3 7 6 3 . 2 ) 。

20

1 . 野生型発現パネル：R T - P C R によって試験された、13 のすべての成体組織サンプル (骨格筋、骨、胃、小腸および結腸以外) において標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【 1 0 5 9 】

4 8 . 1 2 . 1 . 表現型解析 (破壊遺伝子：D N A 6 0 6 1 9 - 1 4 8 2 ( U N Q 5 6 3 )

( a ) 全体的な表現型の概要：

ヒトトランスデューション ( ) 様 2 ( T B L 2 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、マイクロ C T 骨梁数の増加および大腿骨中軸断面積の増加を示す変異型 ( - / - ) マウスがもたらされた。

30

( - / - ) マウスはまた、( + / + ) 同腹仔対照と比較した場合、体重および体長の増加を示した。

雄 ( - / - ) マウスは、生殖能力の問題を示した。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

【 1 0 6 0 】

( b ) 骨代謝および全身診断学

( 1 ) 組織質量および除脂肪体重の測定 - D e x a

D e x a 解析 - 試験の説明：

手順：4 匹の野生型マウス、4 匹のヘテロ接合性マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギー X 線吸収測定法 ( D E X A ) を、うまく使用して総組織質量 ( T T M ) の変化を同定した。

40

【 1 0 6 1 】

A v e r t i n ( 1 . 2 5 % 2 , 2 , 2 , - トリプロモエタノール , 2 0 m L / k g 体重 ) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスを D E X A スキャンのために P I X I m u s T M デンシトメーター ( L u n a r I n c . ) のプラットフォーム上に腹臥位にした。L u n a r P I X I m u s ソフトウェアを使用して、目的の領域 ( R O I 、すなわち、全身、椎骨および両大腿骨 ) の骨塩密度 ( B M D ) および脂肪組成物 ( % 脂肪 ) および総組織質量 ( T T M ) を測定した。

【 1 0 6 2 】

50

身体測定（体長および体重）：

身体測定：約 16 週齢で体長および体重の測定を行った。

【1063】

結果：

体重：

（ - / - ）マウスは、その性別一致（ + / + ）同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均体重の増加を示し、その差は雄においてより顕著であった。

【1064】

体長：雄（ - / - ）マウスは、その性別一致（ + / + ）同腹仔および歴史的平均と比較して、平均体長の増加を示した。

【1065】

生殖能力：

解析に利用可能な雄（ - / - ）マウスでは、雌（ + / + ）マウス交配の 40 日後、子供が生まれなかった。

【1066】

（ 2 ）骨代謝：放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するための DEXA
  - ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCT
- を含んだ。

【1067】

Dexa 解析 - 試験の説明：

手順：4 匹の野生型マウス、4 匹のヘテロ接合性マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギー X 線吸収測定法（DEXA）を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量（BMC）、BMC / LBM 比、容量測定による骨塩密度（vBMD）、全身 BMD、大腿骨 BMD および椎骨 BMD を測定した。

【1068】

Avertin（1.25% 2, 2, 2, - トリプロモエタノール, 20 mL / kg 体重）をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスを DEXA スキャンのために PIXImus TM デンシトメーター（Lunar Inc.）のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImus ソフトウェアを使用して、目的の領域（ROI）[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度（BMD）および脂肪組成物（% 脂肪）および総組織質量（TTM）を測定した。

【1069】

骨マイクロCT 解析：

手順：マイクロCTを使用して、非常に感度の高い BMD の測定を行った。1 つの椎骨および 1 つの大腿骨を、4 匹の野生型マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートから取り出した。腰部の 5 つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。μCT 40 スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、16 マイクロメートルの解像度で第 5 腰部椎骨（LV5）において解析し、皮質骨パラメータを、20 マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

【1070】

結果：

マイクロCT：



雄（ - / - ）マウスは、その性別一致（ + / + ）同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均椎骨梁数の増加および平均大腿骨中軸断面積の増加を示した。

#### 【 1 0 7 1 】

まとめると、（ - / - ）マウスは、その性別一致（ + / + ）同腹仔と比較した場合、椎骨および大腿骨測定値の増加を示した。

これらの結果から、ノックアウト変異表現型が、大理石骨病のような骨の異常に関連し得ることが示唆される。大理石骨病は、骨の異常な肥厚および硬化ならびに骨の異常な脆弱性を特徴とする状態である。そのため、PRO1125ポリペプチドまたはそのアゴニストは、大理石骨病および他の骨関連障害の処置に有益であり得る。一方で、PRO1125ポリペプチドのインヒビターまたはアンタゴニストは、骨の治癒に有用であり得る。

10

#### 【 1 0 7 2 】

また、変異型（ - / - ）マウスは、平均総組織マスおよび除脂肪体重の増加ならびに体重および体長の増加を示した。

これらの研究により、変異（ - / - ）非ヒトトランスジェニック動物が肥満に関連し得る負の表現型を示すことが示唆される。したがって、PRO1125ポリペプチドまたはその作用剤は、正常な成長および代謝過程に不可欠であり、肥満の予防および / または治療で特に重要であろう。

#### 【 1 0 7 3 】

48.13.DNA56865-1491（UNQ572）遺伝子破壊を含むマウスの作製および解析

20

これらのノックアウト実験では、PRO1134ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA56865-1491と示す）（UNQ572）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報を以下に示す：変異マウス遺伝子は、以下に対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_029626 ムス・ムスクルスRIKEN cDNA 2410004H05 遺伝子（2410004H05Rik）；参照タンパク質：

Q9CWT8 Q9CWT8 Q9CWT8 2410004H05RIK PROTEIN；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_001010983 ホモ・サピエンスグリコシルトランスフェラーゼ8ドメイン含有1（GLT8D1）、転写物改変体3；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：Q9P0I5 Q9P0I5 Q9P0I5 AD-017 PROTEIN GLYCOSYLTRANSFERASE。

30

#### 【 1 0 7 4 】

目的のマウス遺伝子は、ヒトGLT8D1（グリコシルトランスフェラーゼ8ドメイン含有1）のオルソログであるRIKEN cDNA 2410004H05遺伝子である。

別名としては、5430414N14Rik、AD-017、MSTP139、FLJ14611およびグリコシルトランスフェラーゼAD-017が挙げられる。

#### 【 1 0 7 5 】

GLT8D1は、シグナルアンカーまたはシグナルペプチドおよびグリコシルトランスフェラーゼファミリー8ドメインからなる推定グリコシルトランスフェラーゼである。このドメインを含む酵素は、典型的には、アクセプター分子と活性化ドナー分子間のO-グリコシド結合の形成を触媒する。このドメインを含む酵素の一例は、共基質としてUDP-グルコースを用いてその自己グリコシル化を触媒するグリコーゲンシンターゼと強固に会合したタンパク質であるグリコゲニン（PfamアクセッションPF01501）である。GLT8D1の細胞内の位置は不明である。

40

バイオフィーマティック解析により、該タンパク質は細胞外であり得るか、またはゴルジ装置上に位置し得ることが示唆される（Coutinho et al., J Mol Biol 328（2）：307-17（2003））。

#### 【 1 0 7 6 】

50

ターゲティングされたか遺伝子トラップされた変異を、系統 129 S v E v <sup>B</sup> r <sup>d</sup> 由来の胚性幹 (E S) 細胞で行った。キメラマウスを、C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交配して F 1 ヘテロ接合体動物を作製する。これらの子孫を交雑受精して F 2 野生型子孫、ヘテロ接合体変異子孫、およびホモ接合体変異子孫を作製する。稀に、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合、F 1 ヘテロ接合体マウスを、129 S v E v <sup>B</sup> r <sup>d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑してさらなるヘテロ接合体動物を作製し、これを交雑受精して F 2 マウスを作製する。この世代由来のマウスに対してレベル I 表現型解析を行う。

【 1 0 7 7 】

【 化 3 5 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	23	41	19	83
予測値	20.75	41.5	20.75	83

カイ二乗 = 0 . 7 9 有意性 = 0 . 6 7 3 6 8 ( h o m / n ) = 0 . 2 3 平均同腹仔数 = 8  
変異情報

変異型：相同組換え (標準)

説明：コードエクソン 1 ~ 6 をターゲティングした ( N C B I アクセッション N M \_ 0 2 9 6 2 6 . 1 )。

1 . 野生型発現パネル：胚性幹 (E S) 細胞および R T - P C R によって試験した 2 6 個全ての成体組織サンプル中の標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現：標的遺伝子の破壊を、サザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【 1 0 7 8 】

4 8 . 1 3 . 1 . 表現型解析 (破壊遺伝子：D N A 5 6 8 6 5 - 1 4 9 1 ( U N Q 5 7 2 ) )

( a ) 全体的な表現型の概要：

ヒトグリコシルトランスフェラーゼ 8 ドメイン含有 1 ( G L T 8 D 1 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、雄 ( - / - ) マウスにおいて感覚運動ゲーティング / 注意の障害がもたらされた。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

【 1 0 7 9 】

( b ) 表現型解析：C N S / 神経学

神経学の分野において、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害を含む神経性障害および精神医学的障害の処置のためのインビボにおいて有効な標的の同定についての解析に本明細書中では注目した。神経障害は、「不安障害」として定義されるカテゴリーを含む。その「不安障害」としては、以下：軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、別段特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴うパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、I 型または I I 型の双極性障害、別段特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害にあてはまることがあり、その人格障害としては、以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない。

【 1 0 8 0 】

手順：

行動スクリーニングを、4 匹の野生型マウス、4 匹のヘテロ接合体マウスおよび 8 匹のホモ接合体変異マウスのコホートにおいて実施した。生存能低下のために、より早期の試

10

20

30

40

50

験が必要とならない限り、すべての行動試験は、12～16週齢の間に実施した。これらの試験は、不安、活動性レベルおよび探索を計測するためのオープンフィールドを含んだ。

#### 【1081】

聴覚驚愕反射のプレパルス抑制

聴覚驚愕反射のプレパルス抑制は、大きな120デシベル(dB)驚愕誘発音が、より小さい(プレパルス)音に先行する場合に起こる。PPIパラダイムは、6種類の異なる試行型(70dBバックグラウンドノイズ、120dB単独、74dB+120dB-pp4、78dB+120dB-pp8、82dB+120dB-pp12、および90dB+120dB-pp20)からなり、各々、擬似ランダム順に6回、合計36回の試行が繰り返される。刺激に対する最大応答( $V_{max}$ )を、各試行型について平均する。100以下の120dB平均値を有する動物は、解析から除外する。プレパルスが動物の驚愕刺激に対する応答を抑制するパーセンテージを計算し、グラフで示す。

10

#### 【1082】

結果：

PPI：

雄(-/-)マウスは、pp8、pp12およびpp20中、その性別一致(+/-)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、阻害の減少を示し、変異型における感覚運動ゲーティング/注意の障害を示した。

20

#### 【1083】

48.14.DNA59849-1504(UNQ585)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO1155ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA59849-1504と命名)(UNQ585)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_009312 ACCESSION: NM\_009312 NID: naムス・ムスクルスムス・ムスクルスタキニン2(Tac2)；参照タンパク質：

P55099 TKNK\_MOUSE P55099 NEUROKININ B PRECURSOR NKB NEUROMEDI；参照ヒト遺伝子配列：

30

NM\_013251 ホモ・サピエンスタキニン3(ニューロメジンK、ニューロキニン)(TAC3)；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q9UHF0 TKNK\_HUMAN Q9UHF0 NEUROKININ B PRECURSOR NKB NEUROMEDI。

#### 【1084】

目的のマウス遺伝子は、ヒトTAC3(タキニン3[ニューロメジンK、ニューロキニン])のオルソログであるTac2(タキニン2)である。

別名としては、物質K、ニューロキニン2、ニューロキニンA、ニューロメジンL、神経ペプチドK、ニューロキニン、NKB、NKNB、PRO1155、ZNEUROK1、ニューロメジンK、ニューロキニン、タキニン3、およびニューロキニンB様タンパク質が挙げられる。

40

#### 【1085】

TAC3は、受容体TACR1、TACR2またはTACR3のリガンドとしての機能を果たすペプチド神経伝達物質である。TAC3は、末梢ニューロンから放出され、さまざまな組織上のそのコグネート受容体と相互作用する。

TAC3は、おそらく、胎児および胎盤における血管緊張および血圧の調節のパラクリンホルモンとしての機能を果たしている。

TAC3は、胎児血管系を拡張させ、胎児動脈血圧を減少させる。

TAC3は、TACR1と相互作用することにより胎盤の血管系を拡張させる。

TACR1の活性化およびその結果としての血圧の低下は、一酸化窒素合成もプロスタサ

50

イクリン合成のいずれも伴わない (Brownbill et al., J Clin Endocrinol Metab 88 (5): 2164 - 70 (2003); Pinto et al., Eur J Pharmacol 494 (2 - 3): 233 - 9 (2004))。

TAC3は、おそらく、正常な妊娠での高い胎盤血流の維持においてある役割を果たしており (Laliberte et al., Regul Pept 117 (2): 123 - 6 (2004))、TAC3産生は、子癇前症に関与している可能性がある (Schlembach et al., Am J Obstet Gynecol 189 (5): 1418 - 22 (2003); Page et al., Nature 405 (6788): 797 - 800 (2000))。

#### 【1086】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹 (ES) 細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

#### 【1087】

##### 【化36】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	18	39	15	72
予測値	18	36	18	72

カイ二乗値 = 1.15 有意性 = 0.56270486 (hom / n) = 0.22 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え (標準)

説明：

コードエキソン1の前の2つの非コードエキソンおよびコードエキソン1を標的化した (NCBIアクセッションNM\_009312.1)。

1. 野生型発現パネル：RT-PCRによって試験された、13のすべての成体組織サンプル (脳、脊椎、および眼) において標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【1088】

48.14.1. 表現型解析 (破壊遺伝子：DNA59849 - 1504 (UNQ585))

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒトタキニン3 (ニューロメジンK、ニューロキニン) (TAC3) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、全身大腿骨骨中無機質密度および骨塩量の減少ならびに連結密度の減少を示す (-/-) マウスがもたらされた。遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

#### 【1089】

(b) 骨代謝：放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのDEXA

・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCTを含んだ。

#### 【1090】

Dexa解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法（DEXA）を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量（BMC）、BMC/LBM比、容量測定による骨塩密度（vBMD）、全身BMD、大腿骨BMDおよび椎骨BMDを測定した。

10

#### 【1091】

Avertin（1.25%2, 2, 2, -トリプロモエタノール, 20mL/kg体重）をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンスitomーター（Lunar Inc.）のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域（ROI）[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度（BMD）および脂肪組成物（%脂肪）および総組織質量（TTM）を測定した。

#### 【1092】

骨マイクロCT分析：

手順：マイクロCTも使用して、非常に高感度のBMD測定を行った。1つの脊椎骨および1つの大腿骨を、4匹の野生型マウスおよび8匹のホモ接合体マウスのコホートから採取した。第5腰椎小柱体積、小柱の厚さ、連結密度（connectivity 密度）、大腿骨骨幹部総骨領域、および皮質の厚さの測定を行った。μCT40スキャンにより、骨量および骨構築に関する詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに入れ、自動でスキャンした。装置のソフトウェアを使用して、分析のための関心領域を選択した。16μmの分解能で第5腰椎（LV5）における骨小柱パラメータを分析し、20μmの分解能で大腿骨骨幹部における皮質骨パラメータを分析した。

20

結果：

DEXA：

雌（-/-）マウスは、全身および大腿骨骨中無機質密度ならびに骨塩量の減少を示した。

30

#### 【1093】

マイクロCT：

（-/-）マウスは、連結密度の減少を示した。

#### 【1094】

Dexaおよび骨マイクロCT解析によって解析された（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔と比較して、異常な骨障害を示唆する、骨の測定値の減少を示した。さらに、（-/-）マウスは、負の骨表現型を示し、骨の代謝障害を反映する骨測定値が異常に減少した。骨の負の表現型は、PRO1155ポリペプチドまたはそのアゴニストが、骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。さらに、PRO1155ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、PRO1155ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト（またはインヒビター）は、異常な骨代謝に関連する炎症性疾患（関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む）を含む、異常または病理学的な骨障害に導き得る。

40

#### 【1095】

48.15.DNA59820-1549（UNQ651）遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO1281ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA59820-1549と命名）（UNQ651）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに

50

対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_\_001001566 ムス・ムスクルスDNAセグメント、Chr 1、Brigham & Women's Genetics 1363 発現 (D1Bwg1363e)；参照タンパク質：

Q6IQX7 ACCESSION：Q6IQX7 NID：

ムス・ムスクルス (マウス)。

コンドロイチン重合因子、アイソフォーム a；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_\_024536 ホモ・サピエンスコンドロイチン重合因子 (CHPF)；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q8IZ52 ACCESSION：Q8IZ52 NID：

ホモ・サピエンス (ヒト)。

コンドロイチン重合因子 (硫酸コンドロイチンシンターゼ)。

#### 【1096】

目的のマウス遺伝子は、ヒトCHPF (コンドロイチン重合因子) のオルソログである D1Bwg1363e (DNAセグメント、Chr 1、Brigham & Women's Genetics 1363 発現) である。別名としては、1700028N03Rik、CSS2、FLJ22678 および硫酸コンドロイチンシンターゼ2が挙げられる。

#### 【1097】

CHPFは、細胞表面上および細胞外マトリックス内に見られるプロテオグリカンである硫酸コンドロイチンの生合成に関与する酵素または酵素サブユニットとしての機能を果たす推定II型膜タンパク質である。該タンパク質は、シグナルペプチドまたはシグナルアンカーのいずれかおよびコンドロイチンN-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼドメインを含む (PfamアクセッションPF05679)。

CHPFは、コンドロイチン上の交互のN-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc) およびD-グルクロン酸 (GlcUA) 残基の重合の触媒に関与している；しかしながら、CHPFが、この反応を単独で、または糖質 (コンドロイチン) シンターゼ1とのヘテロ二量体として触媒し得るかどうかは明らかではない。他の硫酸コンドロイチン合成酵素と同様、CHPFは、ゴルジ装置の内腔内に存在している可能性が高い (Kitagawa et al., J Biol Chem 278 (26) : 23666 - 71 (2003) ; Yada et al., J Biol Chem 278 (32) : 30235 - 47 (2003) )。

しかしながら、バイオインフォマティック解析から、CHPFは細胞外タンパク質であることが示唆される (Clark et al., Genome Res 13 (10) : 2265 - 70 (2003) )。

CHPFは、生理学的プロセス、例えば、神経回路網形成、細胞遊走、器官形成およびサイトカインシグナル伝達などにおいてある役割を果たしている (Kitagawa et al., J Biol Chem 278 (26) : 23666 - 71 (2003) ; Yada et al., J Biol Chem 278 (32) : 30235 - 47 (2003) ; Izumikawa et al., J Biol Chem 279 (51) : 53755 - 61 (2004) )。

さらに、CHPFは、他の硫酸コンドロイチン生合成酵素と同様、脊髄損傷の処置の標的であり得る (Kitagawa et al., J Biol Chem 278 (26) : 23666 - 71 (2003) )。

#### 【1098】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹 (ES) 細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マ

10

20

30

40

50

ウスを 129 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

【 1 0 9 9 】

【 化 3 7 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	15	30	18	63
予測値	15.75	31.5	15.75	63

カイ二乗値 = 0 . 6 7 有意性 = 0 . 7 1 5 3 3 8 0 5 ( h o m / n ) = 0 . 2 7 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え（標準）

説明：

コードエキソン 1 ~ 3 ならびにコードエキソン 1 の前の 2 つの非コードエキソンを標的化した ( N C B I アクセス NM \_ 0 0 1 0 0 1 5 6 5 . 1 ) 。

1 . 野生型発現パネル：R T - P C R によって試験された、胚性幹細胞 ( E S ) 細胞および 2 6 のすべての成体組織サンプル ( 骨格筋および脂肪以外 ) において標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【 1 1 0 0 】

4 8 . 1 5 . 1 . 表現型解析 ( 破壊遺伝子：D N A 5 9 8 2 0 - 1 5 4 9 ( U N Q 6 5 1 ) )

( a ) 全体的な表現型の概要：

ヒトコンドロイチン重合因子 ( C H P F ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、平均血清コレステロールおよび平均血清グルコースレベルの増加を示す ( - / - ) マウスがもたらされた。

U N Q 6 5 1 が、コンドロイチンシンターゼ ( C H S Y 1 ) 媒介性コンドロイチン重合に必要とされ、硫酸コンドロイチン生合成において機能を果たすことに注目することは興味深い。C H S Y 1 は、自然関節炎を発症させる ( b e d e v e l o p ) ようである。遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

【 1 1 0 1 】

( b ) 表現型解析：心臓学

心臓血管生物学の分野において、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠動脈疾患、異常脂肪血症 ( 例えば、高コレステロール ( 高コレステロール血症 ) および血清トリグリセリドの増加 ( 高トリグリセリド血症 ) )、糖尿病および / または肥満症の処置のための標的を本明細書中で同定した。表現型試験は、血清コレステロールおよび血清トリグリセリドの測定を含んでいた。

【 1 1 0 2 】

血中脂質

手順：4 匹の野生型マウス、4 匹のヘテロ接合性マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートを、このアッセイで試験した。高いコレステロールレベルおよび血中トリグリセリドレベルの上昇は、心血管疾患および / または糖尿病の発症における認識された危険因子である。血中脂質の測定により、血中脂質レベルを制御する生物学的スイッチの発見が容易になる。血中脂質レベルを上昇させる因子の阻害は、心血管疾患リスクの軽減に有用であり得る。これらの血液化学試験では、C O B A S I n t e g r a 4 0 0 ( m f r : R o c h e ) を使用して測定値を記録した。

【 1 1 0 3 】

結果：

10

20

30

40

50

血液化学：雄（ - / - ）マウスは、その性別一致（ + / + ）同腹仔および歴史的平均と比較して、平均血清中コレステロールレベルの上昇を示した。

#### 【 1 1 0 4 】

上でまとめられたように、（ - / - ）マウスは、その性別一致（ + / + ）同腹仔および歴史的平均と比較して、平均血清コレステロールレベルの上昇を示した。したがって、P R O 1 2 8 1 遺伝子が欠損した変異マウスは、心血管疾患のモデルとして役立ち得る。P R O 1 2 8 1 ポリペプチドまたはそのコード遺伝子は、コレステロールなどの血中脂質の制御に有用であり得る。したがって、P R O 1 2 8 1 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠状動脈疾患、高コレステロール血症、糖尿病および / または肥満症のような心血管疾患の処置に有用であり得る。

10

#### 【 1 1 0 5 】

（ c ）表現型解析：代謝 - 血液化学

代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、血糖測定を含む。マウスにおける血液化学試験を実施するために C O B A S I n t e g r a 4 0 0 ( m f r : R o c h e ) を使用した。代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的が同定され得る。

#### 【 1 1 0 6 】

結果：

雌ヘテロ接合性（ + / - ）およびホモ接合性（ - / - ）マウスの両方は、その性別一致（ + / + ）同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均血清グルコースレベルの増加を示した。

20

したがって、変異型（ + / - ）および（ - / - ）マウスは、グルコース代謝の変化または糖尿病に関連するものであり得る高血糖症を示した。

P R O 1 2 8 1 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、正常なグルコースレベル / 代謝の維持に有用であり得、おそらく糖尿病の処置に有用であり得る。

#### 【 1 1 0 7 】

4 8 . 1 6 . D N A 6 6 6 7 5 - 1 5 8 7 ( U N Q 6 9 8 ) 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、P R O 1 3 4 3 ポリペプチドをコードする遺伝子（ D N A 6 6 6 7 5 - 1 5 8 7 と命名）（ U N Q 6 9 8 ）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

30

N M \_ 1 7 2 2 0 5 A C C E S S I O N : N M \_ 1 7 2 2 0 5 N I D :  
g i 2 6 2 5 1 3 0 6 r e f N M \_ 1 7 2 2 0 5 . 1 ムス・ムスクルス s u p r a  
b a s i n ( S b s n - p e n d i n g ) ; 参照タンパク質：  
Q 8 C I T 9 A C C E S S I O N : Q 8 C I T 9 N I D :  
ムス・ムスクルス（マウス）。

基底上細胞特異的タンパク質 u p r a b a s i n ; 参照ヒト遺伝子配列：

B C 0 6 3 6 4 0 ホモ・サピエンス H L A R 6 9 8 、 m R N A ( c D N A クローン M G C : 7 5 5 3 3 I M A G E : 4 7 5 0 6 4 0 ) ; ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

40

Q 6 U W P 8 A C C E S S I O N : Q 6 U W P 8 N I D :

ホモ・サピエンス（ヒト）。

H L A R 6 9 8 ( 仮想タンパク質 ) 。

#### 【 1 1 0 8 】

目的のマウス遺伝子は、ヒト U N Q 6 9 8 ( H L A R 6 9 8 ) のオルソログである S b s n ( s u p r a b a s i n ) である。別名としては、1 1 1 0 0 0 5 D 1 9 R i k および基底上細胞特異的タンパク質が挙げられる。

#### 【 1 1 0 9 】

50



S b s n は、主に、分化中の基底上細胞ケラチノサイトにおいて発現される分泌タンパク質であり、おそらく皮膚の構造的成分としての機能を果たしている

S b s n は、シグナルペプチドおよび複雑性が低く、高パーセンテージのグリシン、グルタミン、ヒスチジンおよびアラニン残基からなる多数の領域を含む。S b s n は、組織トランスグルタミナーゼ 2 および表皮トランスグルタミナーゼ 3 の基質であり、該タンパク質は、細胞外および細胞内成分と架橋し、角化細胞外被表皮の一部となり得ることが示唆される。

S b s n は、表皮の基底上細胞上皮だけでなく、舌および胃の基底上細胞上皮においても発現される。S b s n は、おそらく、表皮の分化および高度に層化された水不透過性バリア、すなわち皮膚の形成においてある役割を果たしている (Park et al., J Biol Chem 277 (47) : 45195 - 202 (2002) ; Moffatt et al., Gene 334 : 123 - 31 (2004) )。

#### 【1110】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 129 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 (E S) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 129 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

#### 【1111】

#### 【化38】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	17	42	11	70
予測値	17.5	35	17.5	70

カイ二乗値 = 0 . 3 8 有意性 = 0 . 8 2 6 9 5 9 1 3 ( h o m / n ) = 0 . 2 5 平均同腹仔数 = 8

変異情報

変異型：相同組換え (標準)

説明：コードエクソン 1 および 2 をターゲティングした (N C B I アクセッション N M \_ 1 7 2 2 0 5 . 1)。

1 . 野生型発現パネル：R T - P C R によって試験された、胚性幹細胞 (E S) 細胞および 1 3 のすべての成体組織サンプル (肝臓、骨格筋、骨、および脂肪以外) において標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【1112】

4 8 . 1 6 . 1 . 表現型解析 (破壊遺伝子：D N A 6 6 6 7 5 - 1 5 8 7 (U N Q 6 9 8 )

( a ) 全体的な表現型の概要：

ヒト U N Q 6 9 8 ( H L A R 6 9 8 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、骨中無機質密度の測定値の減少ならびに平均血清コレステロールのレベルの上昇を示す ( - / - ) マウスがもたらされた。遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

#### 【1113】

( b ) 骨代謝および全身診断学：放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

：

10

20

30

40

50

・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのDEXA  
 ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCT  
 を含んだ。

#### 【1114】

Dexa解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量(BMC)、BMC/LBM比、容量測定による骨塩密度(vBMD)、全身BMD、大腿骨BMDおよび椎骨BMDを測定した。

10

#### 【1115】

Avertin(1.25%2,2,2-トリブromoエタノール,20mL/kg体重)をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンシトメーター(Lunar Inc.)のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域(ROI)[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度(BMD)および脂肪組成物(%脂肪)および総組織質量(TTM)を測定した。

#### 【1116】

結果：

20

Dexa：

雄(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、全身骨中無機質密度および大腿骨骨中無機質密度ならびに全身容量測定による骨塩密度の測定値の減少を示した。

#### 【1117】

Dexaによって解析された(-/-)マウスは、その(+/-)同腹仔と比較して、異常な骨障害を示唆する、骨密度の測定値の減少を示した。その(-/-)マウスは、負の骨表現型を示し、骨の代謝障害を反映する骨測定値が異常に減少した。

骨の負の表現型は、PRO1343ポリペプチドまたはそのアゴニストが、正常な成長発達に加えて骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。

30

さらに、PRO1343ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、PRO1343ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト(またはインヒビター)は、関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む異常な骨代謝に関連する炎症性疾患を含む、異常な骨障害または病理学的な骨障害に導き得る。

#### 【1118】

(c)表現型解析：心臓学

心臓血管生物学の分野において、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠動脈疾患、異常脂肪血症(例えば、高コレステロール(高コレステロール血症)および血清トリグリセリドの増加(高トリグリセリド血症))、糖尿病および/または肥満症の処置のための標的を本明細書中で同定した。表現型試験は、血清コレステロールおよび血清トリグリセリドの測定を含んでいた。

40

#### 【1119】

血中脂質

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび2匹のホモ接合性マウスのコホートを、このアッセイで試験した。高いコレステロールレベルおよび血中トリグリセリドレベルの上昇は、心血管疾患および/または糖尿病の発症における認識された危険因子である。血中脂質の測定により、血中脂質レベルを制御する生物学的スイッチの発見が容易になる。血中脂質レベルを上昇させる因子の阻害は、心血管疾患リスクの軽減に有用であり得る。これらの血液化学試験では、COBAS Integra 400(mfr:Roche)を使用して測定値を記録した。

50

## 【 1 1 2 0 】

結果：

血液化学：雌（ - / - ）マウスは、その性別一致（ + / + ）同腹仔および歴史的平均と比較して、平均血清中コレステロールレベルの増加を示した。

## 【 1 1 2 1 】

上でまとめられたように、（ - / - ）マウスは、その性別一致（ + / + ）同腹仔および歴史的平均と比較して、平均血清中コレステロールレベルの増加を示した。したがって、PRO1343 遺伝子が欠損した変異マウスは、心血管疾患のモデルとして役立ち得る。PRO1343 ポリペプチドまたはそのコード遺伝子は、コレステロールなどの血中脂質の制御に有用であり得る。したがって、PRO1343 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠状動脈疾患、高コレステロール血症、糖尿病および / または肥満症のような心血管疾患の処置に有用であり得る。

10

## 【 1 1 2 2 】

48.17. DNA59828 - 1608 ( UNQ716 ) 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO1379 ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA59828 - 1608 と命名）（UNQ716）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

20

NM\_\_133779 ACCESSION: NM\_\_133779 NID: gi\_19527005 ref NM\_\_133779.1 ムス・ムスクルスRIKEN cDNA 4930534E15 遺伝子 ( 4930534E15 Rik ) ; 参照タンパク質：

Q99JA3 ACCESSION: Q99JA3 NID: ムス・ムスクルス ( マウス ) 。

ニューロン発達関連タンパク質 ( ニューロン発達関連タンパク質7 ) ( RIKEN cDNA 4930534E15 gene ) ; 参照ヒト遺伝子配列：

NM\_\_015937 ACCESSION: NM\_\_015937 NID: gi\_23397652 ref NM\_\_015937.2 ホモ・サピエンスホスファチジルイノシトールグリカンクラスT ( PIGT ) ; ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

30

Q969N2 ACCESSION: Q969N2 NID: ホモ・サピエンス ( ヒト ) 。

ホスファチジルイノシトールグリカンクラスT前駆体 ( DJ453C12.7 ) ( 仮想タンパク質PLACE1010330 ) 。

## 【 1 1 2 3 】

目的のマウス遺伝子は、ヒトPIGTのオルソログであるPigt ( ホスファチジルイノシトールグリカン、クラスT ) である。別名としては、CGI - 06、4930534E15 Rik、MGC8909およびGPITランスアミダーゼ成分 PIG - Tが挙げられる。

40

## 【 1 1 2 4 】

PIGTは、小胞体内に存在するI型内在性膜タンパク質であり、おそらく、グリコシルホスファチジルイノシトール ( GPI ) トランスアミダーゼの非触媒性サブユニットとしての機能を果たしている。

GPIトランスアミダーゼは、5つのサブユニットからなり、タンパク質へのGPIの移動を触媒する。PIGTは、GPIトランスアミダーゼ複合体を安定化させ、活性部位への基質タンパク質の接近を調節する ( Ohishi et al. , EMBO J 20 ( 15 ) : 4088 - 98 ( 2001 ) ; Vainauskas et al. , J Biol Chem 277 ( 34 ) : 30535 - 42 ( 2002 ) ; Ohishi e

50

t al., J Biol Chem 278(16):13959-67(2003); Eisenhaber et al., Bioessays 25(4):367-85(2003)。

#### 【1125】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹(ES)細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受

10

#### 【1126】

##### 【化39】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	15	30	0	45
予測値	11.25	22.5	11.25	45

カイ二乗値 = 47.2 有意性 = 5.6318367E-11 (hom/n) = 0.0 平均同腹仔数 = 7

20

変異型：相同組換え(標準)

説明：コードエクソン1から3をターゲティングした(NCBIアクセッションNM\_133779.1)。

1. 野生型発現パネル：RT-PCRによって試験された、胚性幹細胞(ES)細胞および26のすべての成体組織サンプルにおいて標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現：QC画像：標的遺伝子の破壊を、サザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【1127】

48.17.1. 表現型解析(破壊遺伝子：DNA59828-1608(UNQ716))

30

(a) 全体的な表現型の概要：

UNQ716、DNA59828 ヒトホスファチジルイノシトールグリカン、クラスT(PIGT)のオルソログをコードする遺伝子の変異により、(-/-)マウスの致死がもたらされた。

ヘテロ接合性(+/-)マウスは、骨塩量および密度の測定値の減少を示した。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

#### 【1128】

(b) 病理学

顕微鏡的：胚性致死により試験されなかった。12.5日目に、44個の胚：27個の(+/-)胚、5個の(+++)胚、および12個の再吸収モル(resorption moles)が観察された。

40

#### 【1129】

致死性の胚の発達異常に関連する考察：

ノックアウトマウスにおける胚性致死は、通常、種々の重篤な発生上の問題(神経変性疾患、血管障害、炎症性疾患が挙げられるが、これらに限定されない)によって生じるか、または遺伝子/タンパク質が多くの細胞型において基礎的な細胞シグナル伝達プロセスで重要な役割を果たす場合に生じる。さらに、胚性致死マウスは、潜在的な癌モデルとして有用である。同様に、対応するヘテロ接合性(+/-)変異動物は、これらがノックアウトされた遺伝子の機能に関する非常に有益な手がかりを明らかにする表現型および/または病理学報告を示す場合に特に有用である。例えば、EPOノックアウト動物は胚致死

50

性を示したが、胚に関する病理学報告は、R B Cの著しい欠如を示した。

#### 【 1 1 3 0 】

( c ) 骨代謝および全身診断学 / 放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するための D E X A
- ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCTを含んだ。

10

#### 【 1 1 3 1 】

D e x a 解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウスおよび4匹のヘテロ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法 ( D E X A ) を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量 ( B M C ) 、 B M C / L B M 比、容量測定による骨塩密度 ( v B M D ) 、全身 B M D 、大腿骨 B M D および椎骨 B M D を測定した。

#### 【 1 1 3 2 】

A v e r t i n ( 1 . 2 5 % 2 , 2 , 2 , - トリプロモエタノール , 2 0 m L / k g 体重 ) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスを D E X A スキャンのために P I X I m u s T M デンシトメーター ( L u n a r I n c . ) のプラットフォーム上に腹臥位にした。L u n a r P I X I m u s ソフトウェアを使用して、目的の領域 ( R O I ) [ すなわち、全身、椎骨および両大腿骨 ] の骨塩密度 ( B M D ) および脂肪組成物 ( % 脂肪 ) および総組織質量 ( T T M ) を測定した。

20

#### 【 1 1 3 3 】

骨マイクロCT解析：

手順：マイクロCTを使用して、非常に感度の高い B M D の測定を行った。1つの椎骨および1つの大腿骨を、4匹の野生型マウスおよび8匹のヘテロ接合性マウスのコホートから取り出した。腰部の5つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。μCT 40 スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、16マイクロメートルの解像度で第5腰部椎骨 ( L V 5 ) において解析し、皮質骨パラメータを、20マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

30

#### 【 1 1 3 4 】

結果：

D e x a :

雄 ( + / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均骨塩量 ( B M C ) 、 B M C / L B M および全身骨中無機質密度 ( B M D ) の減少を示した。

#### 【 1 1 3 5 】

マイクロCT：雄 ( + / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均のものと比較して、平均脊椎小柱の体積、数、厚さ、および連結密度が減少した。

40

#### 【 1 1 3 6 】

D e x a および骨マイクロCT解析によって解析された ( + / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔と比較して、異常な骨障害を示唆する、骨の測定値の減少を示した。( + / - ) マウスはまた、負の骨表現型を示し、骨の代謝障害を反映する骨測定値が異常に減少した。骨の負の表現型は、P R O 1 3 7 9 ポリペプチドまたはそのアゴニストが、骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。さらに、P R O 1 3 7 9 ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、P R O 1 3 7 9 ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト ( またはインヒビ

50

ター)は、異常な骨代謝に関連する炎症性疾患(関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む)を含む、異常または病理学的な骨障害に導き得る。

#### 【1137】

48.18.DNA60740-1615(UNQ717)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO1380ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA60740-1615と命名)(UNQ717)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_023596 ムス・ムスクルス溶質担体ファミリー29(ヌクレオシド輸送体)、  
構成員3(Slc29a3)；参照タンパク質：

Q99P65 ACCESSION: Q99P65 NID:

ムス・ムスクルス(マウス)。

EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTER 3；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_018344 ホモ・サピエンス溶質担体ファミリー29(ヌクレオシド輸送体)、  
構成員3(SLC29A3)；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q9BZD2 ACCESSION: Q9BZD2 NID:

ホモ・サピエンス(ヒト)。

EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTER 3。

#### 【1138】

目的のマウス遺伝子は、ヒトSLC29A3のオルソログであるSlc29a3(溶質担体ファミリー29[ヌクレオシド輸送体]、構成員3)である。別名としては、Ent3、4933435C21Rik、FLJ11160および平衡的(equilibrative)ヌクレオシド輸送体3が挙げられる。

#### 【1139】

SLC29A3は、リソソーム内在性膜タンパク質であり、平衡的輸送体としての機能を果たし、ヌクレオシドの受動的流入および流出を媒介している(Baldwin et al., J Biol Chem 280(16):15880-7(2005))。

該タンパク質は、主に、腎臓および精巣のセルトリ細胞において発現される(Luet al., Drug Metab Dispos 32(12):1455-61(2004)；Kato et al., J Pharmacol Exp Ther 312(2):601-8(2005))。

SLC29A3は、リソソーム内での核酸の分解によって生成されるヌクレオシドの放出においてある役割を果たしている可能性がある。SLC29A3はまた、抗癌および抗ウイルスヌクレオシド類縁体の性質(Luet al., Drug Metab Dispos 32(12):1455-61(2004))および精子形成(Kato et al., J Pharmacol Exp Ther 312(2):601-8(2005))においてある役割を果たしている可能性がある。

#### 【1140】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹(ES)細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

#### 【1141】

## 【化 4 0】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	16	49	21	86
予測値	21.5	43	21.5	86

カイ二乗値 = 5.5 有意性 = 0.06392786 (hom / n) = 0.2 平均同腹仔数 = 10

変異型：相同組換え（標準）

説明：コードエクソン 1 および 2 をターゲティングした (NCBI アクセス番号 NM\_023596.1)。

1. 野生型発現パネル：RT-PCR によって試験された、胚性幹細胞 (ES) 細胞および 13 のすべての成体組織サンプルにおいて標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

## 【1142】

48.18.1. 表現型解析（破壊遺伝子：DNA60740-1615 (UNQ717)）

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒト溶質担体ファミリー 29 (ヌクレオシド輸送体)、構成員 3 (SLC29A3) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、慢性炎症を有する (-/-) マウスにおいて組織球増殖症、リンパ節腫脹症および肝脾腫大症がもたらされた。検死により、リンパ節腫脹症および脾腫とともに、ホモ接合性変異型マウスの小腸、脾臓およびリンパ節における組織球増殖症が明らかになった。UNQ717 遺伝子は、単球および樹状細胞上に発現され、免疫学的障害において特に重要である（自己免疫に役割を果たしている可能性がある）。また、ホモ接合性変異型マウスは、貧血性であり、その野生型同腹仔および歴史的平均のレベルと比較した場合、数多くの他の免疫学的および血液化学異常を示した。(-/-) マウスはまた、その同腹仔 (+/+) 対象と比較した場合、ストレス誘導型高体温応答の減少を示した。標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

## 【1143】

(b) 病理学

肉眼的：

(-/-) マウスは、脾腫およびリンパ節腫脹症を示した。

顕微鏡的：

解析した 6 匹の (-/-) マウスはすべて、小腸、リンパ節および脾臓において種々の程度の組織球増殖症を示した。(-/-) マウスはまた、脾臓、リンパ節および胸腺においてリンパ系枯渇 (T 細胞) を示した。疾患の初期段階では、皮質胸腺細胞のアポトーシスと関連する胸腺皮質において抗原提示細胞の空胞変性、および空腸における最小限の組織球浸潤物が見られた。より進行した場合は、脾臓は軽度に腫脹し、組織球細胞による T 細胞（細動脈周囲リンパ系鞘）の多発性置換を伴った。B 細胞領域（濾胞）は比較的正常であった。

ほとんどの変異型の赤脾髄において赤血球増殖の増大が見られた。しかしながら、散在する赤血球系細胞は、拡張した透明な細胞質に囲まれた暗色の萎縮した核を有した。リンパ節は腫脹し、髄質索および傍皮質領域にびまん性の組織球浸潤物を含んでおり、同時に、T 細胞リンパ球が減少していた。

縮小された空腸絨毛の粘膜下組織および固有層は、主に組織球からなる細胞浸潤物によって拡張された。十二指腸および回腸は類似しているがより軽度の浸潤物を有した。

胸腺皮質は、大量の高度に空胞化した細胞質を有する増大した数のマクロファージ体を含んでいた。2 つの最も重症な症例では、組織球細胞の大量の浸潤物による脾臓およびすべてのリンパ節の著しい腫脹が認められた。また、肝洞様毛細血管および小腸粘膜は、組織

10

20

30

40

50

球によってびまん的に浸潤され、小腸絨毛の著しい鈍化および融合が認められた。

この場合も、最も重症な病変は空腸におけるものであった。

組織球浸潤物は脾臓の間質内に拡張し、萎縮および腺房腺の減少がもたらされた。すべてのリンパ系組織においてT細胞の著しい全身性の減少が認められた。組織内の組織球細胞の分布から、これらがT細胞系統のものであることが示唆される。

#### 【 1 1 4 4 】

##### ( c ) 免疫表現型解析

免疫関連疾患および炎症疾患は、通常の生理学では発作または損傷に応答し、発作または損傷からの修復を開始し、外来生物に対する先天性および後天性防御を増加させるために極めて重要な非常に複雑でしばしば複数の相互関連した生物学的経路の徴候および結果である。これらの正常な生理学的経路が応答強度の直接的関連、異常な制御または過剰な刺激の結果、自己反応、またはこれらの組み合わせとしてさらなる発作または損傷を引き起こす場合、疾患または病変が起こる。

#### 【 1 1 4 5 】

これらの疾患の発症は、しばしば多段階経路およびしばしば複数の異なる生体系 / 生物学的経路に関与するが、1つまたは複数のこれらの経路における臨界点での介入が改善効果または治療効果を示し得る。有害な過程 / 経路の拮抗作用または有益な過程 / 経路の刺激のいずれかによって治療介入を行うことができる。

#### 【 1 1 4 6 】

Tリンパ球 ( T細胞 ) は、哺乳動物免疫応答の重要な構成要素である。T細胞は、主要組織適合遺伝子複合体 ( MHC ) 内の遺伝子によってコードされる自己分子に関連する抗原を認識する。抗原を、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上のMHC分子と共に提示することができる。T細胞系は、宿主哺乳動物の健康に害を及ぼすこれらの変化した細胞を排除する。T細胞には、ヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞が含まれる。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上の抗原 - MHC複合体の認識後に大規模に増殖する。ヘルパーT細胞はまた、B細胞、細胞傷害性T細胞、および免疫応答に関与する種々の他の細胞の活性化で中心的な役割を果たす種々のサイトカイン ( すなわち、リンフォカイン ) を分泌する。

#### 【 1 1 4 7 】

多くの免疫応答では、炎症細胞が損傷部位または感染部位に浸潤する。移動細胞は、罹患組織の組織学的試験によって決定することができる好中球、好酸球、単球、またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

多くの免疫関連疾患が公知であり、広く研究されている。このような疾患には、免疫介在炎症疾患 ( 関節リウマチ、免疫介在腎臓疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患 ( IBD )、乾癬、および喘息など )、非免疫介在炎症疾患、感染症、免疫不全、新形成、および移植片拒絶などが含まれる。免疫学領域では、炎症および炎症障害の治療のための標的を同定した。

#### 【 1 1 4 8 】

免疫学領域では、本明細書中で、炎症および炎症障害の治療のための標的を同定した。免疫関連障害を、ある場合において、免疫応答の抑制によって治療することができる。免疫刺激活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫介在疾患および炎症疾患の治療で有利であろう。免疫応答を阻害する分子 ( 直接または抗体作用剤の使用を介したタンパク質 ) を使用して、免疫応答を阻害し、免疫関連疾患を改善することができる。

#### 【 1 1 4 9 】

以下の試験を行った。

#### 【 1 1 5 0 】

血液学分析：

試験の説明：Abbott's Cell-Dyn 3500R ( 自動血液学分析器 )

10

20

30

40

50



によって血液試験を行う。いくつかのその特徴には、5つの白血球分類が含まれる。「患者」報告は、全部で22個のパラメータを対象とすることができる。

【1151】

結果：

血液学：（-/-）マウスは、その野生型同腹仔（+/+）マウスおよび歴史的平均と比較した場合、総白血球数および絶対単球数の増加を示した。

また、（-/-）マウスは、平均赤血球計数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリットの減少ならびに平均赤血球分布幅の増大を示した。（-/-）マウスはまた、平均血小板計数の減少および平均血小板容積の増加を示した。

【1152】

総白血球および絶対単球計数の増加は、上記の病理所見と一致する。

【1153】

（-/-）マウスは、その野生型同腹仔（+/+）マウスおよび歴史的平均と比較した場合、平均赤血球数、ヘモグロビンレベルおよびヘマトクリットの減少を示した。

【1154】

これらの結果は、貧血に関連する表現型に関係する。したがって、PRO1380ポリペプチド、そのアゴニストまたはPRO1380ポリペプチドをコードする遺伝子は、正常な赤血球産生に必須であるに違いなく、ゆえに貧血または低ヘマトクリットに関連する血液障害の処置に有用であり得る。

【1155】

さらに、（-/-）マウスは、その（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較して、平均血小板数の減少を示した。

【1156】

したがって、DNA60740-1615遺伝子が欠損した変異マウスは、凝血障害に関連する表現型を生じた。

これと関連して、PRO1380ポリペプチドまたはそのアゴニストは、異常な血液凝固に関連する障害（例えば、血友病など）の処置に有用であり得る。

【1157】

急性期反応：

試験の説明：細菌のリポ多糖（LPS）は、エンドトキシンであり、急性期反応および全身性炎症の強力な誘導物質である。レベルIのLPSマウスの腹腔内に（i.p.）、200μL滅菌食塩水中の致死量未満の用量のLPSを26ゲージ針を使用して注射した。この用量は、試験マウスの平均体重に基づき、1μg/g体重とした。注射の3時間後に100μLの血液サンプルを採取し、TNFa、MCP-1およびIL-6の存在をFACSCalibur装置で解析した。

【1158】

結果：

急性期反応：

（-/-）マウスは、その（+/+）同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均血清IL-6、TNF およびLPS攻撃に対するMCP-1応答の増加を示した。

【1159】

卵白アルブミン負荷

手順：このアッセイは、7匹の野生型および8匹のホモ接合体において行った。ニワトリ卵白アルブミン（OVA）は、T細胞依存性抗原であり、マウスにおける抗原特異的免疫応答の研究用のモデルタンパク質として一般に使用されている。OVAは無毒で不活性であり、したがって、免疫応答が誘発されない場合であっても動物に害をもたらさない。OVAに対するマウスの免疫応答は、T細胞応答を惹起させる免疫優性ペプチドが、同定されている程度まで十分に特徴付けされている。抗OVA抗体を、免疫処置の8～10日後に酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を用いて検出することができ、抗体の異なるアイソタイプの測定によって、遺伝子操作されたマウスにおいて欠損性応答をもたらし得

10

20

30

40

50

る複雑なプロセスに関するさらなる情報が得られる。

#### 【1160】

上記のように、このプロトコルでは、マウスが抗原特異的免疫応答を生じる能力が評価される。動物に50mgのニワトリ卵白アルブミン（完全フロイントアジュバント中に乳化）をIP注射し、14日後に、抗卵白アルブミン抗体（IgM、IgG1およびIgG2サブクラス）の血清力価を測定した。血清サンプル中のOVA特異的抗体の量は、96ウェルサンプルプレートのスキャンする装置によって得られる光学密度（OD）値に比例する。データは、各血清サンプルの一組の連続希釈物に対して収集した。

#### 【1161】

この負荷の結果：

10

卵白アルブミン：

（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、卵白アルブミン攻撃に対する平均血清IgG1応答の減少を示した。

#### 【1162】

要約すると、卵白アルブミン負荷試験は、PRO1380ポリペプチドをコードする遺伝子が欠失したノックアウトマウスが、その野生型同腹仔と比較すると免疫学的異常を示すことを示す。特に、変異マウスは、T細胞依存性OVA抗原で攻撃すると、免疫学的応答を生じる能力の低下を示した。

したがって、PRO1380ポリペプチドのインヒビターまたはアンタゴニストは、これらの免疫学的所見に類似した症状を呈し得る。

20

これらの結果は、脾臓、リンパ節および胸腺におけるリンパ系枯渇（T細胞）を示す病理報告と一致する。

#### 【1163】

血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイ：

Cytometric Bead Array（CBA）キットを使用して、血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイを行う。このアッセイを使用して、1つのサンプル中のマウスモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖のアイソタイプを迅速に同定する。示される値は、「相対蛍光単位」であり、軽鎖の検出に基づく。6未満のいかなる値も有意ではない。

#### 【1164】

30

結果：

血清Imm.2：

（-/-）マウスは、その（+/+）同腹仔のもの、該プロジェクトの（+/+）中央値および累積（+/+）歴史的中央値と比較した場合、平均血清IgAレベルおよびIgMの増加を示した。

#### 【1165】

変異（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔と比較して、IgA血清免疫グロブリンの上昇を示した。IgAは、細菌のトキシンおよびウイルスを中和し得る上皮細胞保護体として主に機能する。明らかでない疾患の感受性が選択的IgA欠損に関連するが、その感受性は、通常の集団よりも慢性肺疾患を有する人々においてよくあることである。このことは、IgAの欠損が、様々な病原体による肺感染症に対する素因をもたらし得、そして体表での防御におけるIgAの役割と一致することを示唆する。

40

この場合、ノックアウトマウスで観察された表現型により、PRO1380ポリペプチドのインヒビター（アンタゴニスト）がこれらの免疫学的効果を模倣し得るを示唆するIgA血清レベルの増加がもたらされた。

#### 【1166】

蛍光標識細胞分取（FACS）解析

手順

CD4、CD8およびT細胞レセプターを含む、末梢血由来の免疫細胞組成物のFACS解析を実施して、Tリンパ球、Bリンパ球に対するCD19、白血球マーカーとしての

50

C D 4 5 およびナチュラルキラー細胞に対する p a n NK を評価した。F A C S 解析は、2 匹の野生型および 6 匹のホモ接合性マウスにおいて実施し、胸腺、脾臓、骨髓およびリンパ節由来の細胞を含んだ。

#### 【 1 1 6 7 】

これらの研究において、解析される細胞を、胸腺、末梢血、脾臓、骨髓およびリンパ節から単離した。単核細胞集団内の C D 4 および C D 8 陽性の T 細胞、B 細胞、NK 細胞および単球の相対的比率を決定するようにフローサイトメトリーを設定した。B e c t o n - D i c k i n s o n F A C S C a l i b u r 3 - レーザー F A C S 装置を使用して、免疫状態を評価した。表現型アッセイおよびスクリーニングのために、この装置は、C D 4 + / C D 8 + 比に加えて、C D 4 + / C D 8 - 、C D 8 + / C D 4 - 、NK、B 細胞および単球の数を記録する。6 つの系統特異的抗体のパネル：C D 4 5 P e r C P 、抗 T C R b A P C 、C D 4 P E 、C D 8 F I T C 、p a n - N K P E および C D 1 9 F I T C を用いて、各マウス由来の溶解末梢血の単一サンプルを染色することによって単核細胞プロファイルを得た。2 種類の F I T C 標識抗体および P E 標識抗体は、相互に排他的な細胞タイプを染色する。C e l l Q u e s t ソフトウェアを備えた B e c t o n - D i c k i n s o n F A C S C a l i b u r フローサイトメーターを使用してサンプルを解析した。

10

#### 【 1 1 6 8 】

結果：

組織特異的 F A C S の全体的観察結果：

20

( - / - ) マウスは、その ( + / + ) 同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、リンパ節および脾臓における C D 4 および C D 8 細胞の平均パーセンテージの減少 ( 野生型のおよそ 1 / 3 ) ; 記憶 T 細胞の増加 ( C D 6 2 L 1 o C D 4 4 h i 細胞においておよそ 5 倍増加 ( % C D 4 または C D 8 計 ) ; ナイーブ T 細胞の減少 ( およそ 2 倍 ) ; C D 2 5 + 細胞の増加：胸腺の D N の増加、D P T 細胞の減少；ならびに脾臓における単球および D C の平均パーセンテージの増加 ( C D 1 1 b + 、C D 1 1 b + c + ( およそ 5 倍 ) および腹腔洗浄液 ( C D 1 1 b + ) ; L N における C D 1 9 + 細胞の増加；骨髓細胞における C D 1 1 7 の増加を特徴とする末梢血中の白血球サブセットの分布の変化を示した。

#### 【 1 1 6 9 】

これらの結果は、変異型 ( - / - ) マウスがリンパ系枯渇 ( T 細胞 ) 、組織球増殖症、リンパ節腫脹症および脾腫を示した病理学的観察結果と一致した。

30

#### 【 1 1 7 0 】

( d ) 骨代謝および全身診断学 / 放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するための D E X A
  - ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロ C T
- を含んだ。

40

#### 【 1 1 7 1 】

D e x a 解析 - 試験の説明：

手順：4 匹の野生型マウス、4 匹のヘテロ接合性マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギー X 線吸収測定法 ( D E X A ) を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量 ( B M C ) 、B M C / L B M 比、容量測定による骨塩密度 ( v B M D ) 、全身 B M D 、大腿骨 B M D および椎骨 B M D を測定した。

#### 【 1 1 7 2 】

A v e r t i n ( 1 . 2 5 % 2 , 2 , 2 , - トリプロモエタノール , 2 0 m L / k g 体重 ) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そ

50

のマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンスitomーター（Lunar Inc.）のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域（ROI）[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度（BMD）および脂肪組成物（%脂肪）および総組織質量（TTM）を測定した。

#### 【1173】

CATスキャンプロトコル：

CT造影剤であるOmnipaque 300（Nycomed Amersham, 300mgヨウ素/mL、0.25mL/動物または2.50~3.75gヨウ素/kg体重）をマウスの腹腔内に注射した。約10分間、ケージ内で安静にさせた後、Avertin（1.25%2,2,2-トリブロムエタノール、20mL/kg体重）を腹腔内注射することによりそのマウスを鎮静させた。麻酔動物を試験台に腹臥位にして、MicroCATスキャナー（ImTek, Inc.）を使用してCATスキャンを行った。三次元像を、ImTek 3D RECONソフトウェアを使用してワークステーションクラスタでFeldkampアルゴリズムによって再構成した。

10

#### 【1174】

結果：

Dexa：雌（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較して、平均総体脂肪パーセントおよび脂肪質量（g）の低下を示した。

PRO1380ポリペプチドをコードする遺伝子が欠失した変異型（-/-）マウスは、組織消耗性疾患（総体脂肪（%およびg）の減少）と一致する表現型を示す。

20

したがって、PRO1380ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニストまたはインヒビターは、これらの代謝関連作用および成長関連作用を模倣し得る。

他方において、PRO1380ポリペプチドまたはそのアゴニストは、異常な脂肪代謝に関連するまたは他の組織消耗性疾患の予防および/または処置に有用であり得る。

CATScan：

3匹すべての（-/-）マウス（M-95、M-103およびF-129）は中等度の脾腫を示した。

#### 【1175】

（e）表現型解析：心臓学

心臓血管生物学の分野において、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠動脈疾患、異常脂肪血症（例えば、高コレステロール（高コレステロール血症）および血清トリグリセリドの増加（高トリグリセリド血症））、糖尿病および/または肥満症の処置のための標的を本明細書中で同定した。表現型試験は、血清コレステロールおよび血清トリグリセリドの測定を含んでいた。

30

#### 【1176】

血中脂質

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートを、このアッセイで試験した。高いコレステロールレベルおよび血中トリグリセリドレベルの上昇は、心血管疾患および/または糖尿病の発症における認識された危険因子である。血中脂質の測定により、血中脂質レベルを制御する生物学的スイッチの発見が容易になる。血中脂質レベルを上昇させる因子の阻害は、心血管疾患リスクの軽減に有用であり得る。これらの血液化学試験では、COBAS Integra 400（mfr: Roche）を使用して測定値を記録した。

40

#### 【1177】

結果：

血液化学：雄および雌（-/-）マウスの両方は、その性別一致（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清コレステロールレベルが低下した。

#### 【1178】

まとめると、これらのノックアウト変異型マウスは、脂質代謝に関して正の表現型を示した。

50

したがって、PRO1380遺伝子が欠損した変異型マウスは、脂質血異常、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中と関連する心血管疾患または様々な冠動脈疾患の処置のモデルとして役立ち得る。

#### 【1179】

(f) 表現型解析：代謝 - 血液化学

代謝領域では、糖尿病の治療のための標的を同定することができる。血液化学表現型解析には、血糖値測定が含まれる。COBAS Integra 400 (mfr. Roche) を、マウスの血流化学試験のために使用した。代謝領域では、糖尿病治療のための標的を同定することができる。

#### 【1180】

結果：

雄および雌 (-/-) マウスの両方は、その性別一致 (+/+) 同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清グルコースレベルが低下した。この結果は、肝臓の変化に起因する可能性が高い。

これらの結果は、変異型 (-/-) マウスにおけるインスリン感受性の増大を示し得る。

#### 【1181】

(g) 表現型解析：CNS / 神経学

神経学領域では、本分析は、神経学的障害および精神医学的障害（抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、分裂病、認知障害、痛覚過敏、および感覚障害が含まれる）の治療のためのインビボでの有効な標的の同定に焦点を当てた。神経障害には、「不安障害」と定義されるカテゴリーが含まれ、以下が含まれるが、これらに限定されない：軽度から中等度の不安、一般的病状に起因する不安障害、詳細不明の不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖を伴うパニック障害、広場恐怖を伴わないパニック障害、外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定恐怖症、物質誘発性不安障害、急性アルコール離脱、強迫性障害、広場恐怖、双極性障害（I型またはII型）、詳細不明の双極性障害、気分循環性障害、うつ病性障害、大うつ病性障害、気分障害、物質誘発性気分障害。さらに、不安障害は、人格障害に適用することができ、人格障害には、以下の型が含まれるが、これらに限定されない：偏執傾向型、反社会型、回避性行動型、境界性人格障害型、依存型、演技型、自己陶醉型、強迫型、分裂型、および統合失調型。

#### 【1182】

手順：

4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合体変異マウス、および8匹のホモ接合体変異マウスのコホートに対して挙動スクリーニングを行った。全ての挙動試験を、生存率の低下によってより早期の試験が必要とならない限り、12週齢と16週齢との間で行った。これらの試験には、不安、活動レベル、および探索を測定するためのオープンフィールドが含まれていた。

#### 【1183】

機能観察バッテリー (FOB) 試験 - ストレス誘導過温症：

FOBは、肉眼的に感覚および運動の欠損を決定するために動物に適用される一連の状況である。肉眼的神経機能を評価するアーウィンの神経学的スクリーニング由来の試験の一部を使用する。一般に、短期間の触覚、嗅覚、および視覚に対する刺激を動物に適用して、その正常に検出および応答する能力を決定する。これらの簡潔な試験は約10分かかり、試験終了後にマウスをそのホームケージに戻す。

#### 【1184】

結果：

不安：雄 (-/-) マウスは、その性別一致 (+/+) 同腹仔および歴史的平均と比較して、ストレス誘導性高熱試験中に応答が減少し、変異体において不安様応答が減少したことが示唆される。したがって、ノックアウトマウスは、抑鬱症、全般性不安障害、認知障害、痛覚過敏および感覚障害ならびに/または双極性障害と一致する表現型を示した。したがって、PRO1380ポリペプチドおよびそのアゴニストは、抑鬱性障害に関連する

10

20

30

40

50

症状の処置または寛解に有用であり得る。

#### 【1185】

48.19. DNA 68872 - 1620 (UNQ722) 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO1387ポリペプチドをコードする遺伝子 (DNA 68872 - 1620 と命名) (UNQ722) を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_001005421 ムス・ムスクルス遺伝子モデル 638、(NCBI) (Gm 638)；参照タンパク質：

Q80UL9 ACCESSION: Q80UL9 NID:

ムス・ムスクルス (マウス)。

接着分子 AMICA；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_153206 ACCESSION: NM\_153206 NID:

gi\_23397450 ref NM\_153206.1 ホモ・サピエンス接着分子 AMICA (AMICA)；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q8N9I7 ACCESSION: Q8N9I7 NID:

ホモ・サピエンス (ヒト)。

仮想タンパク質 FLJ37080。

#### 【1186】

目的のマウス遺伝子は、ヒト AMICA1 (接着分子、CXADR 抗原 1 と相互作用する) のオルソログである AMICA (接着分子 AMICA) である。別名としては、GM 638、遺伝子モデル 638、MGC 61025、JAML、FLJ37080、連結性接着分子、および CXADR 抗原 1 と相互作用する接着分子が挙げられる。

#### 【1187】

AMICA1 は、I 型内在性原形質膜タンパク質であり、おそらく、細胞接着分子としての機能を果たしている。

該タンパク質は、シグナルペプチド、2つの細胞外免疫グロブリン様ドメイン、膜貫通セグメントおよび細胞質テールを含む。

AMICA1 は、主に、顆粒球および他の造血系細胞において発現され、おそらく白血球移動においてある役割を果たしている (Moog-Lutz et al., Blood 102(9): 3371-8 (2003))。

#### 【1188】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 129SvEv<sup>Brd</sup> 由来の胚性幹 (ES) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C57BL/6J アルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを 129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

#### 【1189】

##### 【化41】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	20	40	12	72
予測値	18	36	18	72

カイ二乗値 = 0.09 有意性 = 0.95599747 (hom/n) = 0.24 平均同腹仔数 = 8

変異情報

10

20

30

40

50

変異型：相同組換え（標準）

説明：コードエクソン 1 ～ 3 をターゲティングした（NCBI アクセッション NM\_001005421.2）。

1．野生型発現パネル：RT-PCR によって試験された、胚性幹細胞（ES）細胞および 13 のすべての成体組織サンプル（皮膚線維芽細胞骨以外）において標的遺伝子の発現を検出した。

2．QC 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【1190】

48.19.1.表現型解析（破壊遺伝子：DNA68872-1620（UNQ722）

10

（a）全体的な表現型の概要：

CXADR 抗原 1（AMICA1）と相互作用するヒト接着分子のオルソログをコードする遺伝子の変異により、（-/-）マウスにおける卵白アルブミン攻撃に対する平均血清 IgG2a 応答の減少がもたらされた。ホモ接合性（-/-）マウスはまた、ホットプレート試験の際、応答潜時の減少を示した。

変異型雌（-/-）マウスは、総体脂肪の増加を示した。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

【1191】

（b）免疫学表現型解析

20

免疫関連疾患および炎症性疾患は、正常な生理機能において、傷害または損傷に応答し、傷害または損傷からの修復を開始し、そして外来生物体に対する先天的および後天的な防御を開始することによって重大な意味を有する、かなり複雑で、複雑に相互連結していることが多い生物学的経路の症状または結果である。これらの正常な生理学的経路が、応答の強度に直接関連してか、異常な制御もしくは過度の刺激の結果としてか、自己に対する応答としてか、またはこれらの組み合わせのいずれかとして、さらなる傷害または損傷を引き起こすときに、疾患または病態が生じる。

【1192】

これらの疾患の起源が、多段階の経路および複数の異なる生物学的系 / 経路に関連することが多いが、これらの経路の 1 個以上の重大な点における介入は、寛解性または治療的な効果を有し得る。治療的な介入は、有害なプロセス / 経路の拮抗作用または有益なプロセス / 経路の刺激のいずれかによって生じ得る。

30

【1193】

T リンパ球（T 細胞）は、哺乳動物の免疫応答の重要な成分である。T 細胞は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）内の遺伝子によってコードされる自己の分子に関連する抗原を認識する。この抗原は、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上に MHC 分子とともに提示され得る。T 細胞系は、宿主哺乳動物に対して健康への脅威をもたらすこれらの改変細胞を排除する。T 細胞としては、ヘルパー T 細胞および細胞傷害性 T 細胞が挙げられる。ヘルパー T 細胞は、抗原提示細胞上の抗原 - MHC 複合体を認識した後、広範囲に増殖する。ヘルパー T 細胞はまた、種々のサイトカイン、すなわち、リンフォカインを分泌する。リンフォカインは、B 細胞、細胞傷害性 T 細胞および免疫応答に関与する他の種々の細胞の活性化において中心的な役割を果たす。

40

【1194】

多くの免疫応答において、炎症細胞は、損傷または感染の部位を浸潤する。遊走細胞は、罹患組織の組織学的検査によって決定され得るような、好中球、好酸球、単球またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

多くの免疫関連疾患が知られており、広く研究されている。このような疾患としては、免疫媒介性炎症性疾患（例えば、関節リウマチ、免疫媒介性腎疾患、肝胆疾患、炎症性腸

50

疾患（IBD）、乾癬および喘息）、非免疫媒介性炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全疾患、新形成および移植片拒絶などが挙げられる。免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を同定した。

#### 【1195】

免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を本明細書中で同定した。免疫関連疾患は、1つの場合において、免疫応答を抑制することによって処置され得る。免疫刺激性活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫媒介性疾患および炎症性疾患の処置に有益であり得る。免疫応答を阻害する分子は、免疫応答を阻害するために（タンパク質を直接または抗体アゴニストの使用を介して）利用され得、その結果、免疫関連疾患を寛解させ得る。

10

#### 【1196】

以下の試験を実施した：

##### 卵白アルブミン攻撃

手順：このアッセイは、7匹の野生型および8匹のホモ接合体マウスにおいて行った。ニワトリ卵白アルブミン（OVA）は、T細胞依存性抗原であり、マウスにおける抗原特異的免疫応答の研究用のモデルタンパク質として一般に使用されている。OVAは無毒で不活性であり、したがって、免疫応答が誘発されない場合であっても動物に害をもたらさない。OVAに対するマウスの免疫応答は、T細胞応答を惹起させる免疫優性ペプチドが同定されている程度まで十分に特徴付けされている。抗OVA抗体を、免疫処置の8～10日後に酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）を用いて検出することができ、抗体の異なるアイソタイプの測定によって、遺伝子操作されたマウスにおいて欠陥性応答をもたらし得る複雑なプロセスに関するさらなる情報が得られる。

20

#### 【1197】

上記のように、このプロトコルは、マウスが抗原特異的免疫応答を生じる能力を評価する。動物に50mgのニワトリ卵白アルブミン（完全フロイントアジュバント中に乳化）をIP注射し、14日後に、抗卵白アルブミン抗体（IgM、IgG1およびIgG2サブクラス）の血清力価を測定した。血清試料中のOVA特異的抗体の量は、96ウェル試料プレートをスキャンする装置によって得られる光学密度（OD）値に比例する。データは、各血清試料の一組の連続希釈物に対して収集した。

#### 【1198】

この攻撃の結果：

卵白アルブミン：（-/-）マウスは、その（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清IgG2a応答の低下を示した。

30

#### 【1199】

まとめると、卵白アルブミン攻撃研究は、PRO1387ポリペプチドをコードする遺伝子が欠失したノックアウトマウスが、その野生型同腹仔と比較した場合、免疫学的異常を示すことを示す。特に、変異マウスは、T細胞依存性OVA抗原で攻撃した場合、免疫学的応答を誘発する能力の低下を示した。したがって、PRO1387ポリペプチドまたはそのアゴニストは、免疫系の刺激（例えば、T細胞増殖など）に有用であり得、この効果が白血病、他の癌型、および免疫不全患者（AIDS患者など）などの場合の個体に有利である場合に使用されるであろうということが示唆される。したがって、PRO1387ポリペプチドのインヒビター（アンタゴニスト）は、免疫応答の阻害で有用であり、例えば、移植片拒絶または移植片対宿主疾患の場合の有害な免疫応答の抑制のための有用な候補であろう。

40

#### 【1200】

##### （c）骨代謝および放射線表現型解析

骨代謝領域では、本明細書中で、標的を、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症、および大理石骨病の治療、ならびに骨治癒を促進する標的の同定のために同定した。試験は、以下を含んでいた。

・大腿骨および脊椎骨における骨中無機質密度の測定のためのDEXA

50



・骨小柱および皮質骨の骨中無機質密度の非常に高分解能且つ非常に高感度の測定のためのマイクロCT。

#### 【1201】

Dexa解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型、4匹のヘテロ接合体、および8匹のホモ接合体のコホートを、このアッセイで使用した。二重エネルギーX線吸収測定法（DEXA）を使用して、骨の変化を首尾よく同定した。麻酔した動物を試験し、骨塩量（BMC）、BMC/LBM比、容積測定骨中無機質密度（vBMD）、全身BMD、大腿骨BMD、および脊椎骨BMDを測定した。

#### 【1202】

マウスを、アベルチン（1.25%2, 2, 2-トリプロモエタノール、20mL/kg体重）の腹腔内注射によって麻酔し、体長および体重を測定し、DEXAスキャンのために、マウスをPIXImusTMデンスitometa（Lunar Inc.）のプラットフォーム上に腹臥位で配置した。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、関心領域（ROI）（すなわち、全身、脊椎、および両大腿骨）中の骨中無機質密度（BMD）、脂肪組成（%脂肪）、および総組織マス（TTM）を決定した。

#### 【1203】

結果：

雌（-/-）マウスは、その性別一致野生型（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較した場合、総体脂肪（%およびg）の増加を示した。

#### 【1204】

これらの研究により、変異（-/-）非ヒトトランスジェニック動物が肥満に関連し得る負の表現型を示すことが示唆される。したがって、PRO1387ポリペプチドまたはその作用剤は、正常な成長および代謝過程に不可欠であり、肥満の予防および/または治療で特に重要であろう。

#### 【1205】

（d）表現型解析：CNS / 神経学

神経学の分野において、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害を含む神経性障害および精神医学的障害の処置のためのインピボにおいて有効な標的の同定についての解析に本明細書中では注目した。神経障害は、「不安障害」として定義されるカテゴリーを含む。その「不安障害」としては、以下：軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、別段特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴うパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、I型またはII型の双極性障害、別段特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害にあてはまることもあり、その人格障害としては、以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【1206】

手順：

行動スクリーニングを、4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性変異マウスのコホートにおいて実施した。生存能低下のために、より早期の試験が必要とならない限り、すべての行動試験は、12～16週齢の間に実施した。これらの試験は、不安、活動性レベルおよび探索を計測するためのオープンフィールドを含んだ。

機能観察バッテリー（FOB）試験 - ホットプレート試験：

FOBは、肉眼的に感覚および運動の欠損を決定するために動物に適用される一連の状況である。肉眼的神経機能を評価するアーウィンの神経学的スクリーニング由来の試験の

10

20

30

40

50

一部を使用する。一般に、短期間の触覚、嗅覚、および視覚に対する刺激を動物に適用して、その正常に検出および応答する能力を決定する。これらの簡潔な試験は約10分かかり、試験終了後にマウスをそのホームケージに戻す。

#### 【1207】

##### ホットプレート試験

試験の説明：侵害受容についてのホットプレート試験を、各マウスを小型の閉鎖系である55のホットプレートに置くことによって実施する。ホットプレート上での最大時間を30秒として、後肢応答（なめる、振るまたは跳ねる）までの時間を記録する。各動物を1回試験する。

#### 【1208】

##### 結果：

ホットプレート試験での応答までの時間が、性別一致野生型同腹仔および歴史的平均と比較して、（-/-）マウスでは短かったことから、疼痛に対する感度が増加していることが示唆される。

#### 【1209】

48.20.DNA71290-1630（UNQ733）遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO1149ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA71290-1630と命名）（UNQ733）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

BC037156ムス・ムスクルス cDNA 配列 BC037156；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_152997ホモ・サピエンス染色体4オープンリーディングフレーム7（C4orf7）；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q8NFU4 ACCESSION：Q8NFU4 NID：

ホモ・サピエンス（ヒト）。

濾胞性樹状細胞分泌ペプチド前駆体（FDC-SP）（FDC分泌タンパク質）。

#### 【1210】

目的のマウス遺伝子は、ヒトC4orf7（染色体4オープンリーディングフレーム7）のオルソログである cDNA 配列 BC037156 である。別名としては、MGC71894、FDC-SP、FDCSP および濾胞性樹状細胞分泌ペプチドが挙げられる。

#### 【1211】

C4orf7 は、主に扁桃腺の濾胞性樹状細胞によって発現される 84 - アミノ酸分泌タンパク質であり、おそらく、シグナル伝達リガンドとしての機能を果たしている。

C4orf7 発現は、濾胞性樹状細胞内の腫瘍壊死因子 - および血中白血球内のリボ多糖によって刺激され得る。さらに、C4orf7 は、非常に高いレベルで炎症扁桃陰窩において発現される。

扁桃腺に加え、C4orf7 はまた、いくつかの他の組織、例えば、リンパ節、気管、前立腺、甲状腺、胃、結腸、脾臓、末梢血白血球および骨髄においても発現される。

該タンパク質は活性化 B 細胞に結合し得、C4orf7 が免疫機能においてある役割を果たしていることを示唆する（Marshall et al., J Immunol 169 (5) : 2381 - 9 (2002)）。

#### 【1212】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 129SvEv<sup>Brd</sup> 由来の胚性幹（ES）細胞において生じさせる。キメラマウスを C57BL/6J アルビノマウスと交雑させ、F1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1 ヘテロ接合性マウスを 129SvEv<sup>Brd</sup> / C57 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受

10

20

30

40

50

精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

【1213】

【化42】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	26	43	17	86
予測値	21.5	43	21.5	86

カイ二乗値 = 0.81 有意性 = 0.6669768 (hom/n) = 0.23 平均同腹仔数 = 10

変異情報

変異型：相同組換え（標準）

説明：コードエクソン1および2をターゲティングした(NCBIアクセッションBC037156)。

1. 野生型発現パネル：RT-PCRによって試験された、13のすべての成体組織サンプル（眼および胸腺のみ）において標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【1214】

48.20.1.表現型解析（破壊遺伝子：DNA71290-1630(UNQ733)

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒト染色体4オープンリーディングフレーム7(Corf7)のオルソログをコードする遺伝子の変異により、卵白アルブミン攻撃に対するIgG2a応答の増大を示す変異型(-/-)マウスがもたらされた。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

【1215】

(b) 免疫学表現型解析

免疫関連疾患および炎症性疾患は、正常な生理機能において、傷害または損傷にตอบสนอง、傷害または損傷からの修復を開始し、そして外来生物体に対する先天的および後天的な防御を開始することによって重大な意味を有する、かなり複雑で、複雑に相互連結していることが多い生物学的経路の症状または結果である。これらの正常な生理学的経路が、応答の強度に直接関連してか、異常な制御もしくは過度の刺激の結果としてか、自己に対する応答としてか、またはこれらの組み合わせのいずれかとして、さらなる傷害または損傷を引き起こすときに、疾患または病態が生じる。

【1216】

これらの疾患の起源が、多段階の経路および複数の異なる生物学的系/経路に関連することが多いが、これらの経路の1個以上の重大な点における介入は、寛解性または治療的な効果を有し得る。治療的な介入は、有害なプロセス/経路の拮抗作用または有益なプロセス/経路の刺激のいずれかによって生じ得る。

【1217】

Tリンパ球(T細胞)は、哺乳動物の免疫応答の重要な成分である。T細胞は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)内の遺伝子によってコードされる自己の分子に関連する抗原を認識する。この抗原は、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上にMHC分子とともに提示され得る。T細胞系は、宿主哺乳動物に対して健康への脅威をもたらすこれらの改変細胞を排除する。T細胞としては、ヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞が挙げられる。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上の抗原-MHC複合体を認識した後、広範囲に増殖する。ヘルパーT細胞はまた、種々のサイトカイン、すなわち、リンフォカインを分泌する。リンフォカインは、B細胞、細胞傷害性T細胞および免疫応答に関与する他の種々の細胞の活性化において中心的な役割を果たす。

10

20

30

40

50

## 【1218】

多くの免疫応答において、炎症細胞は、損傷または感染の部位を浸潤する。遊走細胞は、罹患組織の組織学的検査によって決定され得るような、好中球、好酸球、単球またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

多くの免疫関連疾患が知られており、広く研究されている。このような疾患としては、免疫媒介性炎症性疾患（例えば、関節リウマチ、免疫媒介性腎疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患（IBD）、乾癬および喘息）、非免疫媒介性炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全疾患、新形成および移植片拒絶などが挙げられる。免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を同定した。

10

## 【1219】

免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を本明細書中で同定した。免疫関連疾患は、1つの場合において、免疫応答を抑制することによって処置され得る。免疫刺激性活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫媒介性疾患および炎症性疾患の処置に有益であり得る。免疫応答を阻害する分子は、免疫応答を阻害するために（タンパク質を直接または抗体アゴニストの使用を介して）利用され得、その結果、免疫関連疾患を寛解させ得る。

## 【1220】

以下の試験を実施した：

20

卵白アルブミン攻撃

手順：このアッセイは、7匹の野生型および8匹のホモ接合体マウスにおいて行った。ニワトリ卵白アルブミン（OVA）は、T細胞依存性抗原であり、マウスにおける抗原特異的免疫応答の研究用のモデルタンパク質として一般に使用されている。OVAは無毒で不活性であり、したがって、免疫応答が誘発されない場合であっても動物に害をもたらさない。OVAに対するマウスの免疫応答は、T細胞応答を惹起させる免疫優性ペプチドが同定されている程度まで十分に特徴付けされている。抗OVA抗体を、免疫処置の8～10日後に酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）を用いて検出することができ、抗体の異なるアイソタイプの測定によって、遺伝子操作されたマウスにおいて欠陥性応答をもたらし得る複雑なプロセスに関するさらなる情報が得られる。

30

## 【1221】

上記のように、このプロトコルは、マウスが抗原特異的免疫応答を生じる能力を評価する。動物に50mgのニワトリ卵白アルブミン（完全フロイントアジュバント中に乳化）をIP注射し、14日後に、抗卵白アルブミン抗体（IgM、IgG1およびIgG2サブクラス）の血清力価を測定した。血清試料中のOVA特異的抗体の量は、96ウェル試料プレートをスキャンする装置によって得られる光学密度（OD）値に比例する。データは、各血清試料の一組の連続希釈物に対して収集した。

## 【1222】

この攻撃の結果：

卵白アルブミン：（-/-）マウスは、その（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清IgG2a応答の増加を示した。

40

## 【1223】

まとめると、卵白アルブミン攻撃研究は、PRO1419ポリペプチドをコードする遺伝子が欠失したノックアウトマウスが、その野生型同腹仔と比較した場合、免疫学的異常を示すことを示す。

UNQ733は濾胞性樹状細胞によって分泌され、B細胞（これは、TNFによって誘導され得る）に特異的に結合するため、UNQ733は炎症性障害においてある役割を果たしている可能性がある。アデノイドおよび扁桃腺の過形成もまた観察された。

特に、変異マウスは、T細胞依存性OVA抗原で攻撃すると、免疫学的応答を生じる能力の低下を示した。したがって、PRO1419ポリペプチドのインヒビター（アンタゴニ

50

スト)は、免疫系の刺激(例えば、T細胞増殖など)に有用であり得、この効果が個体に有益であり得る場合(例えば、白血病および他のタイプの癌の場合などにおいて、ならびに免疫無防備状態の患者(例えば、AIDS罹患者))において有用性が見出され得る。したがって、PRO1419ポリペプチドまたはそのアゴニストは、免疫応答の阻害に有用であり得、このため、例えば、移植片拒絶または移植片対宿主病の場合において有害な免疫応答を抑制するための有用な候補であり得る。

#### 【1224】

48.21.DNA71184-1634(UNQ738)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO1433ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA71184-1634と命名)(UNQ738)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_026384 ムス・ムスクルスジアシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼ2(Dgat2)；参照タンパク質：

Q9DCV3 ACCESSION: Q9DCV3 NID:

ムス・ムスクルス(マウス)。

0610010B06Rik タンパク質(ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ2)；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_032564 ACCESSION: NM\_032564 NID:

gi\_26024196 ref NM\_032564.2 ホモ・サピエンスジアシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼホモログ2(マウス)(DGAT2)；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q96PD7 ACCESSION: Q96PD7 NID:

ホモ・サピエンス(ヒト)。

ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ2(仮想タンパク質)(GS1999完全タンパク質)。

#### 【1225】

目的のマウス遺伝子は、ヒトDGAT2(ジアシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼホモログ2 [マウス])のオルソログであるDgat2(ジアシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼ2)である。

別名としては、DGAT-2、0610010B06Rik、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ2、HMFN1045およびGS1999完全体が挙げられる。

DGAT2は小胞体上に存在する内在性膜タンパク質であり、長鎖アシル-CoAとジアシルグリセロールからのトリグリセリドの形成を触媒する酵素としての機能を果たす。

#### 【1226】

DGAT2の発現は遍在性であるが、肝臓、白色脂肪、乳腺、小腸および皮膚の脂腺において非常に多いようである。

DGAT2は、エネルギー代謝および皮膚バリア機能においてある役割を果たしている(Cases et al., J Biol Chem 276(42):38870-6(2001); Wakimoto et al., Biochem Biophys Res Commun 310(2):296-302(2003); Stone et al., J Biol Chem 279(12):11767-76(2004))。

さらに、DGAT2は糖尿病および乾癬と関連している可能性がある(WatermanおよびZammit, Int J Obes Relat Metab Disord 26(5):742-3(2002); Meegalla et al., Biochem Biophys Res Commun 298(3):317-23(2002); Wakimoto et al., Biochem Biophys Res Commun 310(2):296-302(2003))。

#### 【1227】

Scott Stone および同僚 (2004) により、ノックアウトマウスを用いて DGAT2 の生理学的役割が調査された。彼らにより、DGAT2 (-/-) マウスは脂肪減少性であり、生後、早期に死亡することが示された。組織トリグリセリドおよびエネルギー基質含量は、(+ / +) マウスよりも DGAT2 (-/-) マウスにおいてかなり低かった。さらに、皮膚の異常およびバリア維持機能は、DGAT2 (-/-) マウスにおいて明白であったが、(+ / +) マウスではそうでなく、DGAT2 (-/-) マウスの早期の生後致死に寄与するエネルギー恒常性異常および脱水が示唆される。Scott および同僚により、マウスにおけるトリグリセリド生合成の大部分では DGAT2 が関与し、治療目的のための DGAT2 の阻害は、DGAT2 機能が生存に不可欠なようであるため、注意して取り組むべきであると結論付けられた。

10

## 【1228】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 129 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 (ES) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C57BL / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1 ヘテロ接合性マウスを 129 S v E v <sup>B r d</sup> / C57 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

20

## 【1229】

## 【化43】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	20	36	14	70
予測値	17.5	35	17.5	70

カイ二乗値 = 2.62 有意性 = 0.26982006 (hom / n) = 0.18 平均同腹仔数 = 8

変異情報

変異型：相同組換え (標準)

説明：コードエクソン 1 をターゲティングした (NCBI アクセッション NM\_026384.2)。

30

1. 野生型発現パネル：RT-PCR によって試験された、13 のすべての成体組織サンプル (脂肪以外) において標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

## 【1230】

48.21.1. 表現型解析 (破壊遺伝子：DNA71184-1634 (UNQ738))

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒトジアシルグリセロール O - アシルトランスフェラーゼホモログ 2 (マウス) (DGAT2) のオルソログをコードする UNQ738 遺伝子の変異により、(-/-) 変異型の周産期致死がもたらされた。

40

遺伝子情報により、この変異によってホモ接合性変異型の周産期致死がもたらされたことが示される。ホモ接合性変異型マウスは小型で虚弱であり、生後 5 日以内に死亡した。

検死により、変異型は脱水しており、皮下脂肪貯蔵の減少 (異常な脂質代謝を示唆) ならびに脾臓および胸腺におけるリンパ球の減少を伴うことが明らかになった。標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

## 【1231】

(b) 病理学

肉眼的：

50

( - / - ) マウスは小型で脱水しており、皮下脂肪貯蔵の減少を示した。

#### 【 1 2 3 2 】

顕微鏡的：

周産期死亡が ( - / - ) マウスにおいて認められた。

( - / - ) マウスは、胸腺および脾臓におけるリンパ球の減少を示した。

外部ノックアウトマウスは、報告によると脂肪減少性であり、明らかに、エネルギー代謝のための基質の著しい低減および皮膚における透過性バリア機能障害のために生後すぐに死亡した。

遺伝子発現：L a c Z 活性は、免疫組織化学によって分析された組織パネルのうちで精巢および精巢上体中に検出された。

#### 【 1 2 3 3 】

致死性の胚の発達異常に関連する考察：

ノックアウトマウスにおける胚性致死は、通常、種々の重篤な発生上の問題（神経変性疾患、血管障害、炎症性疾患が挙げられるが、これらに限定されない）によって生じるか、または遺伝子 / タンパク質が多く細胞型において基礎的な細胞シグナル伝達プロセスで重要な役割を果たす場合に生じる。さらに、胚性致死は、潜在的な癌モデルとして有用である。同様に、対応するヘテロ接合性 ( + / - ) 変異動物は、これらがノックアウトされた遺伝子の機能に関する非常に有益な手がかりを明らかにする表現型および / または病理学報告を示す場合に特に有用である。例えば、E P O ノックアウト動物は胚致死性を示したが、胚に関する病理学報告は、R B C の著しい欠如を示した。

#### 【 1 2 3 4 】

( c ) 骨代謝および全身診断学 / 放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するための D E X A
  - ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロ C T
- を含んだ。

#### 【 1 2 3 5 】

D e x a 解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウスおよび4匹のヘテロ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギー X 線吸収測定法 ( D E X A ) を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量 ( B M C ) 、 B M C / L B M 比、容量測定による骨塩密度 ( v B M D ) 、全身 B M D 、大腿骨 B M D および椎骨 B M D を測定した。

#### 【 1 2 3 6 】

A v e r t i n ( 1 . 2 5 % 2 , 2 , 2 , - トリプロモエタノール , 2 0 m L / k g 体重 ) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスを D E X A スキャンのために P I X I m u s T M デンシトメーター ( L u n a r I n c . ) のプラットフォーム上に腹臥位にした。L u n a r P I X I m u s ソフトウェアを使用して、目的の領域 ( R O I ) [ すなわち、全身、椎骨および両大腿骨 ] の骨塩密度 ( B M D ) および脂肪組成物 ( % 脂肪 ) および総組織質量 ( T T M ) を測定した。

#### 【 1 2 3 7 】

骨マイクロ C T 解析：

手順：マイクロ C T を使用して、非常に感度の高い B M D の測定を行った。1つの椎骨および1つの大腿骨を、4匹の野生型マウスおよび4匹のヘテロ接合性マウスのコホートから取り出した。腰部の5つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。μ C T 4 0 スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメ

10

20

30

40

50

ータを、16マイクロメートルの解像度で第5腰部椎骨(LV5)において解析し、皮質骨パラメータを、20マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

【1238】

結果：

マイクロCT：

雄ヘテロ接合性(+/-)マウスは、その性別一致野生型同腹仔および歴史的平均と比較した場合、小柱数および連結密度の増加を示した。

【1239】

まとめると、(+/-)マウスは、その性別一致(+/+)同腹仔と比較した場合、小柱数および連結密度の増加を示した。

これらの結果から、ロックアウト変異表現型が、大理石骨病のような骨の異常に関連し得ることが示唆される。大理石骨病は、骨の異常な肥厚および硬化ならびに骨の異常な脆弱性を特徴とする状態である。そのため、PRO1433ポリペプチドまたはそのアゴニストは、大理石骨病および他の骨関連障害の処置に有益であり得る。

【1240】

48.22.DNA73739-1645(UNQ745)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのロックアウト実験において、PRO1474ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA73739-1645と命名)(UNQ745)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_001001803 ムス・ムスクルス食道癌調節遺伝子-2(Ecg2)；参照タンパク質：

Q6IE32 ACCESSION: Q6IE32 NID:

ムス・ムスクルス(マウス)。

食道癌調節遺伝子-2前駆体；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_032566 ホモ・サピエンス食道癌調節遺伝子-2(ECG2)；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

P58062 食道癌調節遺伝子-2タンパク質前駆体(ECRG-2)(UNQ745/PRO1474)。

【1241】

目的のマウス遺伝子は、ヒトECG2のオルソログであるEcg2(食道癌調節遺伝子-2)である。別名としては、ECRG2が挙げられる。

【1242】

ECG2は、おそらくプロテアーゼンヒビターとしての機能を果たしている推定分泌タンパク質である(PuenteおよびLopez-Otin, Genome Res 14(4):609-22(2004))。

該タンパク質は、シグナルペプチドおよびKazal型セリンプロテアーゼインヒビタードメインを含む(SMARTアクセッションSM00280)。

また、ECG2は、メタロチオネイン2Aと関連し得る腫瘍抑制因子候補である。食道癌細胞において異所性発現されたECG2は、核および細胞質内でメタロチオネインと共局在し、細胞増殖を阻害し、アポトーシスを誘導する。

ECG2遺伝子における変異は、食道の扁平上皮癌に関与していた(Yue et al., Int J Cancer 108(2):232-6(2004)；Cui et al., Biochem Biophys Res Commun 302(4):904-15(2003))。

【1243】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹(ES)細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精する

10

20

30

40

50



ことにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

【 1 2 4 4 】

【 化 4 4 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	16	42	22	80
予測値	20	40	20	80

10

カイ二乗値 = 1 . 3 8 有意性 = 0 . 5 0 1 5 7 6 0 7 ( h o m / n ) = 0 . 2 8 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え（標準）

説明：コードエクソン 1 ~ 3 をターゲティングした（NCBIアクセッションNM\_\_001001803.1）。

1 . 野生型発現パネル：RT - PCR によって試験された 1 3 の成体組織サンプルのうち眼のみににおいて標的遺伝子の発現を検出した。

2 . QC 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

20

【 1 2 4 5 】

4 8 . 2 2 . 1 . 表現型解析（破壊遺伝子：DNA 7 3 7 3 9 - 1 6 4 5 ( U N Q 7 4 5 )

（ a ）全体的な表現型の概要：

ヒト食道癌調節遺伝子 - 2 ( E C G 2 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、総組織マスの減少および骨中無機質密度の測定値の減少を示すホモ接合性 ( - / - ) マウスがもたらされた。一部の雌 ( - / - ) マウスは肥満であり、総体脂肪の増加および高いトリグリセリドレベルを示した。遺伝子破壊を、サザンプロットによって確認した。

【 1 2 4 6 】

30

（ b ）骨代謝および全身診断学 / 放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治療を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するための D E X A
- ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCT

を含んだ。

【 1 2 4 7 】

D e x a 解析 - 試験の説明：

40

手順：4 匹の野生型マウス、4 匹のヘテロ接合性マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギー X 線吸収測定法 ( D E X A ) を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量 ( B M C ) 、 B M C / L B M 比、容量測定による骨塩密度 ( v B M D ) 、全身 B M D 、大腿骨 B M D および椎骨 B M D を測定した。

【 1 2 4 8 】

A v e r t i n ( 1 . 2 5 % 2 , 2 , 2 , - トリプロモエタノール , 2 0 m L / k g 体重 ) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスを D E X A スキャンのために P I X I m u s T M デンシトメーター ( L u n a r I n c . ) のプラットフォーム上に腹臥位にした。L u n a r P I X I m u s ソフト

50

ウェアを使用して、目的の領域 (ROI) [すなわち、全身、椎骨および両大腿骨] の骨塩密度 (BMD) および脂肪組成物 (%脂肪) および総組織質量 (TTM) を測定した。

#### 【1249】

骨マイクロCT解析：

手順：マイクロCTを使用して、非常に感度の高いBMDの測定を行った。1つの椎骨および1つの大腿骨を、4匹の野生型マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートから取り出した。腰部の5つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。 $\mu$ CT40スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、16マイクロメートルの解像度で第5腰部椎骨 (LV5) において解析し、皮質骨パラメータを、20マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

10

#### 【1250】

結果：

Dexa：

雄 (-/-) マウスは、その性別一致 (+/+) 同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均全身および大腿骨骨中無機質密度 (BMD) の減少ならびに総組織マスの減少を示した。また、数匹の雌 (-/-) マウスは、高い総体脂肪を示した [1~2匹の雌 (-/-) マウスは肥満であり、総体脂肪の増加を伴い、高い平均血清トリグリセリドレベルを示した]。

20

集団は全体的に、肥満/2型糖尿病の特徴を示さなかった。

#### 【1251】

Dexa解析によって解析された (-/-) マウスは、その (+/+) 同腹仔と比較して、異常な骨障害を示唆する、骨の測定値の減少を示した。さらに、この (-/-) マウスは、骨代謝障害を反映する骨測定値が異常に減少した負の骨表現型を示した。骨の負の表現型は、PRO1474ポリペプチドまたはそのアゴニストが、骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。さらに、PRO1474ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、PRO1474ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト (またはインヒビター) は、異常な骨代謝に関連する炎症性疾患 (関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む) を含む、異常または病理学的な骨障害に導き得る。

30

#### 【1252】

48.23.DNA76393-1664 (UNQ762) 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO1550ポリペプチドをコードする遺伝子 (DNA76393-1664と命名) (UNQ762) を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

AK003674ムス・ムスクルス18日胚完全体cDNA、RIKEN完全長高含有ライブラリー、クローン：1110014B07産物：仮想コラーゲン三重らせん反復配列含有タンパク質、完全挿入物配列；参照タンパク質：

40

Q9D1D6 ACCESSION: Q9D1D6 NID: ムス・ムスクルス (マウス)。

1110014B07Rik タンパク質；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_138455 ACCESSION: NM\_138455 NID:

gi\_34147546 ref NM\_138455.2ホモ・サピエンスコラーゲン三重らせん反復配列含有1 (CTHRC1)；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q96CG8 ACCESSION: Q96CG8 NID:

ホモ・サピエンス (ヒト)。

50

R I K E N c D N A 1 1 1 0 0 1 4 B 0 7 遺伝子 ( コラーゲン三重らせん反復配列含有タンパク質 1 ) と類似。

【 1 2 5 3 】

目的のマウス遺伝子は、ヒト C T H R C 1 のオルソログである C t h r c 1 ( コラーゲン三重らせん反復配列含有 1 ) である。別名としては、1 1 1 0 0 1 4 B 0 7 R i k が挙げられる。

【 1 2 5 4 】

C T H R C 1 は、シグナルペプチドおよびコラーゲン三重らせん反復配列を含む分泌タンパク質である。

C T H R C 1 は、再形成中の外膜の線維芽細胞およびバルーン型損傷血管組織の新生内膜の平滑筋細胞において発現され、また、石灰化中のヒト動脈硬化性プラークマトリックスにおいても見られる。

C T H R C 1 は、正常な動脈内では発現されない。

C T H R C 1 の発現は、トランスフォーミング増殖因子 - および骨形成タンパク質 - 4 に応答して上方調節される。C T H R C 1 は、I 型コラーゲンの発現および分泌を阻害し、細胞遊走を増強する。

したがって、C T H R C 1 は、コラーゲンの沈着を阻害し、脈細胞の遊走を促進することにより血管再形成においてある役割を果たしているようである ( P y a g a y e t a l . , C i r c R e s 9 6 ( 2 ) : 2 6 1 - 8 ( 2 0 0 5 ) ) 。

【 1 2 5 5 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

【 1 2 5 6 】

【 化 4 5 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	16	33	17	66
予測値	16.5	33	16.5	66

カイ二乗値 = 3 . 4 3 有意性 = 0 . 1 7 9 9 6 3 7 1 ( h o m / n ) = 0 . 2 7 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え ( 標準 )

説明：コードエクソン 1 および 2 をターゲティングした ( N C B I アクセッション A K 0 7 6 4 9 8 ) 。

1 . 野生型発現パネル：R T - P C R によって試験された、1 3 のすべての成体組織サンプル ( 肝臓および骨以外 ) において標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【 1 2 5 7 】

4 3 . 2 3 . 1 . 表現型解析 ( 破壊遺伝子：D N A 7 6 3 9 3 - 1 6 6 4 ( U N Q 7 6 2 )

( a ) 全体的な表現型の概要：

ヒトコラーゲン三重らせん反復配列含有 1 ( C T H R C 1 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、( + / - ) および ( - / - ) マウスの両方において、血清アルカリ

10

20

30

40

50

ホスファターゼレベルの増加がもたらされた。雌（-/-）マウスはまた、皮膚増殖割合の顕著な減少を示した。遺伝子破壊をサザンブロットによって確認した。

【1258】

（b）発現パターン：

GeneLogic解析により、UNQ762は皮膚および乳房組織において特異的に発現されることが示される。

[プロトコルの実施例54および55を参照]

（c）成体皮膚細胞の増殖：

手順：16週齢の動物（2匹の野生型および4匹のホモ接合体）から皮膚細胞を単離した。これらを、初代線維芽細胞培養物中で成長させ、線維芽細胞の増殖速度を厳格に規制したプロトコルで測定した。このアッセイが高増殖表現型および低増殖表現型を検出する能力を、p53およびKu80を使用して証明した。BrdU組み込みを使用して、増殖を測定した。

10

【1259】

詳細には、これらの研究では、皮膚線維芽細胞増殖アッセイを使用した。標準化培養物中での細胞数の増加を、相対増殖能の基準として使用した。初代線維芽細胞を、野生型マウスおよび変異マウスから採取した皮膚生検から確立した。5万個の細胞の2連または3連の培養物をプレートし、6日間成長させた。培養終了後、培養物中に存在する細胞数を、電子粒子計数器を使用して決定した。

20

【1260】

結果：

雌（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔と比較した場合、平均皮膚線維芽細胞増殖速度が減少した。

【1261】

したがって、ホモ接合体変異マウスは、低増殖表現型を示した。これらの所見によって示唆されるように、PRO1550ポリペプチドのアンタゴニストまたはインヒビターは、この低増殖表現型を模倣し、腫瘍抑制因子として機能することができ、異常な細胞増殖の減少に有用であろう。

したがって、UNQ762は、線維芽細胞の活性化および遊走においてある役割を果たしている。

30

【1262】

（d）表現型解析：代謝 - 血液化学

代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、血糖測定を含む。マウスにおける血液化学試験を実施するためにCOBAS Integra 400（mfr：Roche）を使用した。血糖値の測定に加えて、以下の血液化学試験もまた日常的に行う：アルカリホスファターゼ；アラニンアミノ - トランスフェラーゼ；アルブミン；ビリルビン；亜リン酸；クレアチニン；BUN = 血中尿素窒素；カルシウム；尿酸；ナトリウム；カリウム；および塩化物。代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、インスリン感度およびグルコース代謝の変化を測定する耐糖能試験を含む。異常な耐糖能試験結果は、以下の障害または状態：1型糖尿病および2型糖尿病、シンドロームX、様々な循環器疾患および/または肥満症を示唆し得るが、これらに限定されない。

40

【1263】

結果：

雄および雌（-/-）マウスの両方は、その性別一致（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清アルカリホスファターゼレベルが顕著に増加した。

また、ヘテロ接合体（+/-）動物、特に雄においてアルカリホスファターゼの上昇が認められる。

【1264】

48.24.DNA73730-1679（UNQ777）遺伝子が破壊されたマウス

50

## の作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO1571ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA73730-1679と命名）（UNQ777）を破壊したこれらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：

NM\_019500 ムス・ムスクルスクラウジン14（CLDN14）；参照タンパク質：

Q9Z0S3 ACCESSION: Q9Z0S3 NID:

ムス・ムスクルス（マウス）。

クラウジン - 14；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_144492 ACCESSION: NM\_144492 NID:

gi\_21536293 ref NM\_144492.1 ホモ・サピエンスクラウジン14（CLDN14）、転写物改変体1；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

O95500 ACCESSION: O95500 NID:

ホモ・サピエンス（ヒト）。

クラウジン - 14。

### 【1265】

目的のマウス遺伝子は、CLDN14（クラウジン（claudin）14）（ヒトCLDN14のオーソログ）である。

別名としては、DFNB29が挙げられる。

### 【1266】

CLDN14は、おそらく、接着分子として、および上皮細胞または内皮細胞周囲の物理的バリアを形成する強固な連結部、構造の成分としての機能を果たしている内在性原形質膜タンパク質である。CLDN14は、隣接細胞上の相補的タンパク質および自身と相互作用し、側方共重合体を形成する。

強固な連結部により、傍細胞空間を介する水および溶質の移動ならびに上皮細胞または内皮細胞の先端表面と側底または管腔外（ab l u m i n a l）表面間の原形質膜タンパク質の移動の移動が抑制される。また、強固な連結部は、細胞骨格タンパク質およびシグナル伝達分子を漸増させ、おそらく、シグナル伝達プロセスに関与している（Gonzalez - Mariscal et al., Prog Biophys Mol Biol 81(1): 1 - 44 (2003); Tsukita et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2(4): 285 - 93 (2001); Heiskala et al., Traffic 2(2): 93 - 8 (2001)）。

強固な連結部の一成分として、CLDN14は、おそらく、傍細胞輸送および細胞非対称性においてある役割を果たしている。

CLDN14の発現は、蝸牛内部および外有毛細胞および支持細胞内、腎臓の集合管内、ならびに肝臓の小葉周囲において明白である（Yosef et al., Hum Mol Genet 12(16): 2049 - 61 (2003)）。

CLDN14における変異により、ヒトでは難聴が引き起こされる（Wilcox et al., Cell 104(1): 165 - 72 (2001)）。

### 【1267】

Ben - Yosef および同僚（2003）により、ノックアウトマウスを用いてCLDN14の生理学的役割が調査された。彼らにより、CLDN14（-/-）マウスは、蝸牛外有毛細胞の急速な変性、内有毛細胞の低速変性、およびカチオンの傍細胞透過性の減少を示し、難聴がもたらされることが示された。

また、彼らにより、CLDN14は、有毛細胞と支持細胞の強固な連結部において発現されることが示された。

Ben - Yosef および同僚により、CLDN14は、カチオンの傍細胞輸送を制限するのに必要とされ、これは、外有毛細胞の側底表面周囲の流体の適正なイオン組成の維持に重要であると結論付けられた。

10

20

30

40

50

## 【 1 2 6 8 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

## 【 1 2 6 9 】

10

## 【 化 4 6 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	16	40	26	82
予測値	20.5	41	20.5	82

カイ二乗値 = 0 . 6 7 有意性 = 0 . 7 1 5 3 3 8 0 5 ( h o m / n ) = 0 . 2 7 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え ( 標準 )

説明：コードエクソン 1 をターゲティングした ( N C B I アクセッション N M \_ 0 1 9 5 0 0 . 3 ) 。

20

1 . 野生型発現パネル：R T - P C R によって試験された、1 3 のすべての成体組織サンプル ( 脳、脊椎および眼 ) において標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

## 【 1 2 7 0 】

4 8 . 2 4 . 1 . 表現型解析 ( 破壊遺伝子：D N A 7 3 7 3 0 - 1 6 7 9 ( U N Q 7 7 7 )

( a ) 全体的な表現型の概要：

ヒトクラウジン 1 4 ( C L D N 1 4 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、蝸牛有毛細胞変性を示す聴力障害 ( - / - ) マウスがもたらされた。顕微解析により、ホモ接合性変異型マウスの内耳内の蝸牛有毛感覚細胞の変性および減損が明らかになり、プレパルス抑制試験の際に認められた聴力障害が確認された。

30

また、変異型は、その野生型同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均血小板計数の増加ならびに C D 4 および C D 8 細胞のサブセットの増加を示した。

変異型 ( - / - ) マウスはまた、椎骨容積、数および連結密度の減少とともに骨関連測定値の減少を示した。変異型 ( - / - ) マウスは、平均血清コレステロールおよびトリグリセリドレベルの増加を示した。

標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

## 【 1 2 7 1 】

40

( b ) 発現：

クラウジン 1 4 は、蝸牛でのその発現のための聴力機能に関与する強固な連結タンパク質である。

クラウジン 1 4 の発現の増加はまた、関節リウマチにおける滑膜マクロファージと関連し、したがって、免疫システムに重要な役割を果たす。

## 【 1 2 7 2 】

( c ) 病理学

顕微鏡的：

( - / - ) マウスは、基底膜上の内外両方の蝸牛有毛細胞の完全な消失を特徴とする内耳内の蝸牛有毛感覚細胞のびまん性の著しい変性を示した。

50

遺伝子発現：L a c Z 活性は、免疫組織化学によって組織パネルにおいて検出されなかった。

【 1 2 7 3 】

( d ) 免疫表現型解析

免疫関連疾患および炎症疾患は、通常の生理学では発作または損傷に応答し、発作または損傷からの修復を開始し、外来生物に対する先天性および後天性防御を増加させるために極めて重要な非常に複雑でしばしば複数の相互関連した生物学的経路の徴候および結果である。これらの正常な生理学的経路が応答強度の直接的関連、異常な制御または過剰な刺激の結果、自己反応、またはこれらの組み合わせとしてさらなる発作または損傷を引き起こす場合、疾患または病変が起こる。

10

【 1 2 7 4 】

これらの疾患の発症は、しばしば多段階経路およびしばしば複数の異なる生体系 / 生物学的経路に関与するが、1つまたは複数のこれらの経路における臨界点での介入が改善効果または治療効果を示し得る。有害な過程 / 経路の拮抗作用または有益な過程 / 経路の刺激のいずれかによって治療介入を行うことができる。

【 1 2 7 5 】

T リンパ球 ( T 細胞 ) は、哺乳動物免疫応答の重要な構成要素である。T 細胞は、主要組織適合遺伝子複合体 ( M H C ) 内の遺伝子によってコードされる自己分子に関連する抗原を認識する。抗原を、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上の M H C 分子と共に提示することができる。T 細胞系は、宿主哺乳動物の健康に害を及ぼすこれらの変化した細胞を排除する。T 細胞には、ヘルパー T 細胞および細胞傷害性 T 細胞が含まれる。ヘルパー T 細胞は、抗原提示細胞上の抗原 - M H C 複合体の認識後に大規模に増殖する。ヘルパー T 細胞はまた、B 細胞、細胞傷害性 T 細胞、および免疫応答に関与する種々の他の細胞の活性化で中心的な役割を果たす種々のサイトカイン ( すなわち、リンフォカイン ) を分泌する。

20

【 1 2 7 6 】

多くの免疫応答では、炎症細胞が損傷部位または感染部位に浸潤する。移動細胞は、罹患組織の組織学的試験によって決定することができる好中球、好酸球、単球、またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology , ed . John E . Coligan , 1994 , John Wiley & Sons , Inc .

30

多くの免疫関連疾患が公知であり、広く研究されている。このような疾患には、免疫介在炎症疾患 ( 関節リウマチ、免疫介在腎臓疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患 ( I B D ) 、乾癬、および喘息など ) 、非免疫介在炎症疾患、感染症、免疫不全、新形成、および移植片拒絶などが含まれる。免疫学領域では、炎症および炎症障害の治療のための標的を同定した。

【 1 2 7 7 】

免疫学領域では、本明細書中で、炎症および炎症障害の治療のための標的を同定した。免疫関連障害を、ある場合において、免疫応答の抑制によって治療することができる。免疫刺激活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫介在疾患および炎症疾患の治療で有利であろう。免疫応答を阻害する分子 ( 直接または抗体作用剤の使用を介したタンパク質 ) を使用して、免疫応答を阻害し、免疫関連疾患を改善することができる。

40

【 1 2 7 8 】

以下の試験を行った。

【 1 2 7 9 】

血液学解析：

試験の説明：血液試験は、A b b o t t 社の C e l l - D y n 3 5 0 0 R 自動血液学分析装置によって行う。その特徴の一部としては、5 種類の白血球分画が挙げられる。「患者」レポートには、全部で 2 2 を超えるパラメータが含まれ得る。

【 1 2 8 0 】

50

結果：

血液学：（＋／－）マウスは、その（＋／＋）同腹仔および歴史的平均におけるレベルと比較して、平均血小板数の増加を示した。

#### 【1281】

したがって、DNA73730-1679遺伝子が欠損した変異マウスは、凝血障害に関連する表現型を生じた。したがって、PRO1571ポリペプチドのインヒビターまたはアンタゴニストは、血友病などの異常な血液凝固に関連する障害の治療で有用であろう。

#### 【1282】

蛍光標識細胞分取（FACS）解析

10

手順：

CD4、CD8およびT細胞レセプターを含む、末梢血由来の免疫細胞組成物のFACS解析を実施して、Tリンパ球、Bリンパ球に対するCD19、白血球マーカーとしてのCD45およびナチュラルキラー細胞に対するpan-NKを評価した。FACS解析は、2匹の野生型および6匹のホモ接合性マウスにおいて実施し、胸腺、脾臓、骨髄およびリンパ節由来の細胞を含んだ。

#### 【1283】

これらの研究において、解析される細胞を、胸腺、末梢血、脾臓、骨髄およびリンパ節から単離した。単核細胞集団内のCD4およびCD8陽性のT細胞、B細胞、NK細胞および単球の相対的比率を決定するようにフローサイトメトリーを設定した。Beckton-Dickinson FACSCalibur 3-レーザーFACS装置を使用して、免疫状態を評価した。表現型アッセイおよびスクリーニングのために、この装置は、CD4＋／CD8＋比に加えて、CD4＋／CD8－、CD8＋／CD4－、NK、B細胞および単球の数を記録する。6つの系統特異的抗体のパネル：CD45 PerCP、抗TCRβ APC、CD4 PE、CD8 FITC、pan-NK PEおよびCD19 FITCを用いて、各マウス由来の溶解末梢血の単一サンプルを染色することによって単核細胞プロファイルを得た。2種類のFITC標識抗体およびPE標識抗体は、相互に排他的な細胞タイプを染色する。CellQuestソフトウェアを備えたBeckton-Dickinson FACSCaliburフローサイトメーターを使用してサンプルを解析した。

20

30

#### 【1284】

結果：

（－／－）マウスは、その（＋／＋）同腹仔および歴史的平均と比較した場合、細胞集団におけるCD62hi、CD44int（CD4およびCD8のサブセット）細胞の平均パーセンテージの増加を特徴とする末梢血中の白血球サブセットの分布の変化を示した。

#### 【1285】

したがって、PRO1571ポリペプチドをコードする遺伝子をノックアウトすることにより、T細胞集団の増加が引き起こされる。これらの観察結果から、PRO1571ポリペプチドまたはPRO1571をコードする遺伝子が、T細胞増殖の負の制御因子として作用するようである。

40

したがって、PRO1571ポリペプチドのアンタゴニストまたはインヒビターは、T細胞増殖の増強に有益であり得る。

#### 【1286】

（e）骨代謝および全身診断学／放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治療を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのDEXA
- ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測

50



定するためのマイクロCT  
を含んだ。

#### 【1287】

D e x a 解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法（DEXA）を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量（BMC）、BMC/LBM比、容量測定による骨塩密度（vBMD）、全身BMD、大腿骨BMDおよび椎骨BMDを測定した。

#### 【1288】

A v e r t i n（1.25%2, 2, 2, -トリプロモエタノール, 20mL/kg体重）をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンスitomーター（Lunar Inc.）のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域（ROI）[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度（BMD）および脂肪組成物（%脂肪）および総組織質量（TTM）を測定した。

#### 【1289】

骨マイクロCT解析：

手順：マイクロCTを使用して、非常に感度の高いBMDの測定を行った。1つの椎骨および1つの大腿骨を、4匹の野生型マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートから取り出した。腰部の5つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。μCT40スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、16マイクロメートルの解像度で第5腰部椎骨（LV5）において解析し、皮質骨パラメータを、20マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

#### 【1290】

結果：

マイクロCT：雄（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較して、平均脊椎小柱の体積、数および結合性密度の減少を示した。

#### 【1291】

マイクロCT解析によって解析された（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔と比較して、異常な骨障害を示唆する、骨の測定値の減少を示した。骨の負の表現型は、PRO1571ポリペプチドまたはそのアゴニストが、骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。さらに、PRO1571ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、PRO1571ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト（またはインヒビター）は、異常な骨代謝に関連する炎症性疾患（関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む）を含む、異常または病理学的な骨障害に導き得る。

#### 【1292】

（f）表現型解析：CNS/神経学

神経学の分野において、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害を含む神経性障害および精神医学的障害の処置のためのインビボにおいて有効な標的の同定についての解析に本明細書中では注目した。神経障害は、「不安障害」として定義されるカテゴリーを含む。その「不安障害」としては、以下：軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、別段特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴うパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、I型またはII型の双極性障害、別段特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物

10

20

30

40

50

質誘導性気分障害が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害にあてはまることがあり、その人格障害としては、以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【1293】

手順：

行動スクリーニングを、4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性変異マウスおよび8匹のホモ接合性変異マウスのコホートにおいて実施した。生存能低下のために、より早期の試験が必要とならない限り、すべての行動試験は、12～16週齢の間に実施した。これらの試験は、不安、活動性レベルおよび探索を計測するためのオープンフィールドを含んだ。

10

#### 【1294】

聴覚驚愕反射のプレパルス抑制

聴覚驚愕反射のプレパルス抑制は、大きな120デシベル(dB)驚愕誘発音が、より小さい(プレパルス)音に先行する場合に起こる。PPIパラダイムは、6種類の異なる試行型(70dBバックグラウンドノイズ、120dB単独、74dB+120dB-pp4、78dB+120dB-pp8、82dB+120dB-pp12、および90dB+120dB-pp20)からなり、各々、擬似ランダム順に6回、合計36回の試行が繰り返される。刺激に対する最大応答( $V_{max}$ )を、各試行型について平均する。100以下の120dB平均値を有する動物は、解析から除外する。プレパルスが動物の驚愕刺激に対する応答を抑制するパーセンテージを計算し、グラフで示す。

20

#### 【1295】

結果：

PPI：

8匹の(-/-)マウスはすべて驚愕応答を示さず、変異型における聴力障害を示した。したがって、プレパルス抑制は評価され得なかった。これらの結果は、(-/-)マウスが、基底膜上の内外両方の蝸牛有毛細胞の完全な消失を特徴とする内耳内の蝸牛有毛感覚細胞のびまん性の著しい変性を示したという観察結果と一致する。

30

#### 【1296】

(g)表現型解析：心臓学

心臓血管生物学の分野において、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠動脈疾患、異常脂肪血症(例えば、高コレステロール(高コレステロール血症)および血清トリグリセリドの増加(高トリグリセリド血症))、糖尿病および/または肥満症の処置のための標的を本明細書中で同定した。表現型試験は、血清コレステロールおよび血清トリグリセリドの測定を含んでいた。

#### 【1297】

血中脂質

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートを、このアッセイで試験した。高いコレステロールレベルおよび血中トリグリセリドレベルの上昇は、心血管疾患および/または糖尿病の発症における認識された危険因子である。血中脂質の測定により、血中脂質レベルを制御する生物学的スイッチの発見が容易になる。血中脂質レベルを上昇させる因子の阻害は、心血管疾患リスクの軽減に有用であり得る。これらの血液化学試験では、COBAS Integra 400(mfr:Roche)を使用して測定値を記録した。

40

#### 【1298】

結果：

血液化学：雄(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較して、平均血清中コレステロールレベルおよび平均血清中トリグリセリドレベルの上昇を示した。

50

## 【1299】

上記に概要を示したように、( - / - )マウスは、その性別一致( + / + )同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清コレステロールおよびトリグリセリドレベルの増加を示した。

したがって、PRO1571遺伝子が欠損した変異マウスは、心血管疾患のモデルとして役立ち得る。PRO1571ポリペプチドまたはそのコード遺伝子は、コレステロールおよびトリグリセリドなどの血中脂質の制御に有用であり得る。したがって、PRO1571ポリペプチドまたはそのアゴニストは、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠状動脈疾患、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、糖尿病および/または肥満症のような心血管疾患の処置に有用であり得る。

10

## 【1300】

48,25, DNA73734-1680 (UNQ778) 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO1572ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA73734-1680と命名)(UNQ778)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_019815 ACCESSION: NM\_019815 NID: gi\_9790074 ref NM\_019815.1 ムス・ムスクルスクラウジン18 (Cl dn 18) ; 参照タンパク質：

20

P56857 ACCESSION: P56857 NID:

ムス・ムスクルス(マウス)。

クラウジン-18 ; 参照ヒト遺伝子配列：

NM\_016369 ホモ・サピエンスクラウジン18 (CLDN18)、転写物改変体1 ; ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

P56856 ACCESSION: P56856 NID:

ホモ・サピエンス(ヒト)。

クラウジン-18。

## 【1301】

目的のマウス遺伝子は、ヒトCLDN18のオルソログであるCl dn 18 (クロードイン18)である。CLDN18は、主に肺および胃上皮細胞において発現される内在性原形質膜タンパク質であり、強固な連結部の一成分としての機能を果たす。CLDN18は、おそらく、傍細胞輸送および細胞極性においてある役割を果たしている(Niimi et al., Mol Cell Biol 21(21):7380-90(2001); Heiskala et al., Traffic 2(2):93-8(2001); Gonzalez-Mariscal et al., Prog Biophys Mol Biol 81(1):1-44(2003))。

30

## 【1302】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹(ES)細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

40

## 【1303】

## 【化 4 7】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	24	37	23	84
予測値	21	42	21	84

カイ二乗値 = 0 . 3 3 有意性 = 0 . 8 4 7 8 9 3 7 ( h o m / n ) = 0 . 2 4 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え（標準）

説明：コードエクソン 2 から 4 をターゲティングした（NCBIアクセッションNM\_\_019815.1）。 10

1. 野生型発現パネル：

標的遺伝子の発現は、RT-PCRによって試験した26の成体組織試料のうち、脊髄；肺；腎臓；胃、小腸および結腸；および喘息肺において検出された。

2. QC発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

## 【1304】

48.25.1. 表現型解析（破壊遺伝子：DNA73734-1680（UNQ778）

（a）全体的な表現型の概要：

ヒトクラウジン18（CLDN18）のオルソログをコードする遺伝子の変異により、（-/-）マウスにおいて骨塩量および密度の測定値の減少がもたらされた。雄および雌ホモ接合性変異型マウスの両方は、その性別一致野生型同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、骨塩量および密度の測定値の顕著な減少を示した。また、ホモ接合性変異型は、数多くの免疫学的異常、例えば、白血球計数の増加およびLPS攻撃に対するIL-6応答の増加を示した。検死により、ホモ接合性変異型マウスにおいて胃腺上皮の異常な分化および慢性炎症を伴う胃粘膜の肥厚が明らかになった。標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。 20

## 【1305】

（b）発現：

クラウジン18は、肺および胃に大きく限定された特有の発現パターンを有し、他の組織での発現は比較的低い。発現は関節リウマチと関連し、滑膜線維芽細胞、マクロファージおよびT細胞では発現は増加している。 30

## 【1306】

（c）病理学

肉眼的：

（-/-）マウスは、著しく肥厚した胃粘膜を示した。

## 【1307】

顕微鏡的：

（-/-）マウスは、胃の主要細胞および傍細胞の数の減少ならびに粘液様細胞の数の増加を伴う胃腺上皮の正常な分化の著しい低下を特徴とする胃粘膜の変化を示した。多数の分岐を有する異常な腺が存在し、また、中等度の炎症浸潤物が粘膜および固有層内に存在し、腺性粘膜の上部に拡張していた。

これらの観察結果は、胃での特異的発現と一致する。

GeneLogicデータは、ヒト胃腺癌におけるUNQ778の発現の減少を示す。多くの領域で、胃腺は、傍細胞および主要細胞と置き換わった数多くの粘液様細胞を含んだ。

また、2/3匹の雄（-/-）マウスで下顎唾液腺の線条導管において好酸球細胞質顆粒 50

の著しい減少が認められた。( - / - )マウスはまた、( + / + )同腹仔と比較した場合、胃の重量の増加を示した。

遺伝子発現：L a c Z 活性は、免疫組織化学によって組織パネルにおいて検出されなかった。

#### 【 1 3 0 8 】

##### ( d ) 免疫表現型解析

免疫関連疾患および炎症疾患は、通常の生理学では発作または損傷に応答し、発作または損傷からの修復を開始し、外来生物に対する先天性および後天性防御を増加させるために極めて重要な非常に複雑でしばしば複数の相互関連した生物学的経路の徴候および結果である。これらの正常な生理学的経路が応答強度の直接的関連、異常な制御または過剰な刺激の結果、自己反応、またはこれらの組み合わせとしてさらなる発作または損傷を引き起こす場合、疾患または病変が起こる。

#### 【 1 3 0 9 】

これらの疾患の発症は、しばしば多段階経路およびしばしば複数の異なる生体系 / 生物学的経路に關与するが、1つまたは複数のこれらの経路における臨界点での介入が改善効果または治療効果を示し得る。有害な過程 / 経路の拮抗作用または有益な過程 / 経路の刺激のいずれかによって治療介入を行うことができる。

#### 【 1 3 1 0 】

T リンパ球 ( T 細胞 ) は、哺乳動物免疫応答の重要な構成要素である。T 細胞は、主要組織適合遺伝子複合体 ( M H C ) 内の遺伝子によってコードされる自己分子に関連する抗原を認識する。抗原を、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上の M H C 分子と共に提示することができる。T 細胞系は、宿主哺乳動物の健康に害を及ぼすこれらの変化した細胞を排除する。T 細胞には、ヘルパー T 細胞および細胞傷害性 T 細胞が含まれる。ヘルパー T 細胞は、抗原提示細胞上の抗原 - M H C 複合体の認識後に大規模に増殖する。ヘルパー T 細胞はまた、B 細胞、細胞傷害性 T 細胞、および免疫応答に關与する種々の他の細胞の活性化で中心的な役割を果たす種々のサイトカイン ( すなわち、リンフォカイン ) を分泌する。

#### 【 1 3 1 1 】

多くの免疫応答では、炎症細胞が損傷部位または感染部位に浸潤する。移動細胞は、罹患組織の組織学的試験によって決定することができる好中球、好酸球、単球、またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology , ed . John E . Coligan , 1994 , John Wiley & Sons , Inc .

多くの免疫関連疾患が公知であり、広く研究されている。このような疾患には、免疫介在炎症疾患 ( 関節リウマチ、免疫介在腎臓疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患 ( I B D ) 、乾癬、および喘息など ) 、非免疫介在炎症疾患、感染症、免疫不全、新形成、および移植片拒絶などが含まれる。免疫学領域では、炎症および炎症障害の治療のための標的を同定した。

#### 【 1 3 1 2 】

免疫学領域では、本明細書中で、炎症および炎症障害の治療のための標的を同定した。免疫関連障害を、ある場合において、免疫応答の抑制によって治療することができる。免疫刺激活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫介在疾患および炎症疾患の治療で有利であろう。免疫応答を阻害する分子 ( 直接または抗体作用剤の使用を介したタンパク質 ) を使用して、免疫応答を阻害し、免疫関連疾患を改善することができる。

#### 【 1 3 1 3 】

以下の試験を行った。

#### 【 1 3 1 4 】

血液学解析：

試験の説明：血液試験は、A b b o t t 社の C e l l - D y n 3 5 0 0 R 自動血液学分析装置によって行う。その特徴の一部としては、5 種類の白血球分画が挙げられる。「患

10

20

30

40

50

者」レポートには、全部で22を超えるパラメータが含まれ得る。

#### 【1315】

結果：

血液学：

(-/-)マウスは、その(+/+ )同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均白血球、絶対好中球、絶対リンパ球および血小板計数の増加を示した。

#### 【1316】

これらの結果は、変異(-/-)マウスが、その野生型同腹仔と比較して、いくつかの免疫学的異常を示すことを示す。まとめると、血液学の結果は、ホモ接合体変異マウスがその同腹仔コントロールと比較して白血球数、好中球数およびリンパ球数の増加を示し、これは、細胞外病原体を飲み込むか死滅させる食細胞活性または能力が増加したマクロファージ前駆体レベルの上昇を示す。

したがって、PRO1572ポリペプチドは、正常な免疫学的プロファイルの維持、特に、適応免疫に必須であるはずである。また、変異型(-/-)マウスは、血小板計数の増加を示した。

したがって、DNA73734-1680遺伝子が欠損した変異マウスは、凝血障害に関連する表現型を生じた。これに関して、PRO1572ポリペプチドのインヒビターまたはアンタゴニストは、血友病などの異常な血液凝固に関連する障害の治療で有用であろう。

#### 【1317】

蛍光標識細胞分取(FACS)解析

手順：

CD4、CD8およびT細胞レセプターを含む、末梢血由来の免疫細胞組成物のFACS解析を実施して、Tリンパ球、Bリンパ球に対するCD19、白血球マーカーとしてのCD45およびナチュラルキラー細胞に対するpan-NKを評価した。FACS解析は、2匹の野生型および6匹のホモ接合性マウスにおいて実施し、胸腺、脾臓、骨髓およびリンパ節由来の細胞を含んだ。

#### 【1318】

これらの研究において、解析される細胞を、胸腺、末梢血、脾臓、骨髓およびリンパ節から単離した。単核細胞集団内のCD4およびCD8陽性のT細胞、B細胞、NK細胞および単球の相対的比率を決定するようにフローサイトメトリーを設定した。Becton-Dickinson FACSCalibur 3-レーザーFACS装置を使用して、免疫状態を評価した。表現型アッセイおよびスクリーニングのために、この装置は、CD4+/CD8+比に加えて、CD4+/CD8-、CD8+/CD4-、NK、B細胞および単球の数を記録する。6つの系統特異的抗体のパネル：CD45-PerCP、抗TCRb-APC、CD4-PE、CD8-FITC、pan-NK-PEおよびCD19-FITCを用いて、各マウス由来の溶解末梢血の単一サンプルを染色することによって単核細胞プロファイルを得た。2種類のFITC標識抗体およびPE標識抗体は、相互に排他的な細胞タイプを染色する。CellQuestソフトウェアを備えたBecton-Dickinson FACSCaliburフローサイトメーターを使用してサン

#### 【1319】

結果：

CD117細胞の有意な減少が、野生型(+ / +)同腹仔と比較して変異型(- / -)マウスで腹腔洗浄液中において観察された。したがって、造血系前駆細胞は、これらのノックアウトマウスにおいて減少している。

したがって、PRO1572ポリペプチドをコードする遺伝子は、造血系前駆細胞の発達および/または生成に必須であるはずである。

#### 【1320】

急性期応答：

試験の説明：細菌リポ多糖（LPS）は内毒素であり、そのようなものとして、急性期応答および全身性炎症の強い誘導因子である。レベルI LPSマウスに、26ゲージの針を使用して、垂致死量のLPSを含む200μL滅菌生理食塩水を腹腔内（i.p.）注射した。この用量は、注射から3時間後に1μg/g体重で試験したマウスの平均体重に基づいた。次いで、100μLの血液サンプルを採取し、FACSCalibur装置でTNFα、MCP-1、およびIL-6の存在について分析した。

#### 【1321】

結果：

急性期応答：

（-/-）マウスは、その（+/+）同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、LPS攻撃に対するIL-6応答の増加を示した。

10

#### 【1322】

まとめると、LPS内毒素攻撃は、PRO1572ポリペプチドをコードする遺伝子が欠損したノックアウトマウスは、その野生型同腹仔と比較した場合、免疫学的異常を示すことを示した。特に、変異マウスは、LPS内毒素で攻撃した場合、免疫応答（IL-6産生）を誘発する能力が増加し、炎症誘発応答を示す。IL-6は、より後期のB細胞活性化に寄与する。さらに、IL-6は、急性期応答および全身性炎症の誘導で極めて重要な役割を果たす。このことは、PRO1572ポリペプチドに対するインヒビターまたはアンタゴニストが、免疫系を刺激し得、この作用が白血病および他のタイプの癌の場合の個体ならびにAIDS罹患者などの免疫無防備状態の患者にとって有益であり得る場合に有用性が見出されることが示唆される。したがって、PRO1572ポリペプチドまたはそのアゴニストは、免疫応答の阻害に有用であり得、例えば、移植片拒絶または移植片対宿主病の場合における有害な免疫応答を抑制するための有用な候補であり得る。

20

#### 【1323】

（e）骨代謝および全身診断学/放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのDEXA
- ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCTを含んだ。

30

#### 【1324】

Dexa解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法（DEXA）を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量（BMC）、BMC/LBM比、容量測定による骨塩密度（vBMD）、全身BMD、大腿骨BMDおよび椎骨BMDを測定した。

40

#### 【1325】

Avertin（1.25%2,2,2-トリブロモエタノール,20mL/kg体重）をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンシトメーター（Lunar Inc.）のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域（ROI）[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度（BMD）および脂肪組成物（%脂肪）および総組織質量（TTM）を測定した。

#### 【1326】

骨マイクロCT解析：

手順：マイクロCTを使用して、非常に感度の高いBMDの測定を行った。1つの椎骨および1つの大腿骨を、4匹の野生型マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートが

50

ら取り出した。腰部の5つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。 $\mu$ CT40スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、16マイクロメートルの解像度で第5腰部椎骨(LV5)において解析し、皮質骨パラメータを、20マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

【1327】

結果：

Dexa：

(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均骨塩量および密度の測定値の顕著な減少を示した。

10

【1328】

マイクロCT：

雄(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均大腿骨中軸皮質の厚さ、骨梁容積および骨梁厚さの顕著な減少を示した。

【1329】

Dexaおよび骨マイクロCT解析によって解析された(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔と比較して、異常な骨障害を示唆する、骨の測定値の減少を示した。(-/-)マウスはまた、負の骨表現型を示し、骨の代謝障害を反映する骨測定値が異常に減少した。骨の負の表現型は、PRO1572ポリペプチドまたはそのアゴニストが、骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。さらに、PRO1572ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、PRO1572ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト(またはインヒビター)は、異常な骨代謝に関連する炎症性疾患(関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む)を含む、異常または病理学的な骨障害に導き得る。

20

【1330】

48.26.DNA76531-1701(UNQ832)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO1759ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA76531-1701と命名)(UNQ832)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

30

NM\_134100 ムス・ムスクルスDNAセグメント、Chr 15、マウスGenome Informatics 27(D15Mgi27)；参照タンパク質：

Q921Y4 ACCESSION：Q921Y4 NID：

ムス・ムスクルス(マウス)。

D15Mgi27 タンパク質(ムス・ムスクルスNOD由来CD11c ve 樹状細胞cDNA、RIKEN完全長高含有ライブラリー、クローン：F630109H06産物：仮想一般基質輸送体含有タンパク質、完全挿入物配列)；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_032889 ホモ・サピエンス仮想タンパク質MGC11308(MGC11308)；ヒトタンパク質配列は、次の参照に対応する：

40

Q96IA5 ACCESSION：Q96IA5 NID：

ホモ・サピエンス(ヒト)。

UNKNOWN(PROTEIN FOR MGC：11308)。

【1331】

目的のマウス遺伝子は、ヒト仮想タンパク質MGC11308のオルソログであるD15Mgi27(DNAセグメント、Chr 15、マウスGenome Informatics 27)である。

【1332】

仮想タンパク質MGC11308は、推定内在性原形質膜タンパク質(Clark e

50



t al., Genome Res 13(10):2265-70(2003))で「主要促進(facilitator)スーパーファミリー」(MFS)構成員であり、おそらく輸送体としての機能を果たしている(Pao et al., Microbiol Mol Biol Rev 62(1):1-34(1998))。

該タンパク質は、主に、DUF791(「未知機能のタンパク質」)ドメイン内のシグナルペプチドおよび10回膜貫通セグメントからなる(PfamアクセッションPF05631)。

#### 【1333】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹(ES)細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

#### 【1334】

##### 【化48】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	18	32	18	68
予測値	17	34	17	68

カイ二乗値 = 1.14 有意性 = 0.5655255 (hom/n) = 0.26 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え(標準)

説明：コードエクソン1をターゲティングした(NCBIアクセッションNM\_134100.2)。

1. 野生型発現パネル：RT-PCRによって試験された、胚性幹細胞(ES)細胞および26のすべての成体組織サンプル(骨以外)において標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【1335】

48.26.1. 表現型解析(破壊遺伝子：DNA76531-1701(UNQ832))

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒト仮想タンパク質MGC11308のオルソログをコードする遺伝子の変異により、(-/-)マウスにおいて鬱様応答の減少がもたらされた。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

#### 【1336】

(b) 表現型解析：CNS/神経学

神経学の分野において、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害を含む神経性障害および精神医学的障害の処置のためのインビボにおいて有効な標的の同定についての解析に本明細書中では注目した。神経障害は、「不安障害」として定義されるカテゴリーを含む。その「不安障害」としては、以下：軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、別段特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴うパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、I型またはII型の双極性障害、別段特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物

質誘導性気分障害が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害にあてはまることがあり、その人格障害としては、以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【 1 3 3 7 】

手順：

行動スクリーニングを、4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性変異マウスのコホートにおいて実施した。生存能低下のために、より早期の試験が必要とならない限り、すべての行動試験は、12～16週齢の間に実施した。これらの試験は、不安、活動性レベルおよび探索を計測するためのオープンフィールドを含んだ。

10

#### 【 1 3 3 8 】

機能観察バッテリー（F O B）試験 - 尾部懸垂試験：

F O Bは、肉眼的に感覚および運動の欠損を決定するために動物に適用される一連の状況である。肉眼的神経機能を評価するアーウィンの神経学的スクリーニング由来の試験の一部を使用する。一般に、短期間の触覚、嗅覚、および視覚に対する刺激を動物に適用して、その正常に検出および応答する能力を決定する。これらの簡潔な試験は約10分かかり、試験終了後にマウスをそのホームケージに戻す。

#### 【 1 3 3 9 】

尾部懸垂試験：

20

尾部懸垂試験は、げっ歯類の抑鬱症様挙動モデルとして開発された手順である。この特定の準備では、マウスの尾部を6分間懸垂し、それに応じてマウスがこの位置から逃れるためにもがく。一定時間後、マウスのもがきは減少し、これは、どうすることもできないパラダイムの学習型と解釈される。無効なデータ（すなわち、試験中にその尾部を登る）を有する動物を、この分析から排除する。

#### 【 1 3 4 0 】

結果：

尾部懸垂2：

（ - / - ）マウスは、その（ + / + ）同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、不動時間中央値の減少を示し、変異型における鬱様応答の減少が示唆された。

30

まとめると、尾部懸垂試験により、軽度～中等度の不安、一般病状による不安および/または双極性障害；多動性；感覚障害；強迫性障害、統合失調症もしくは偏執性人格と関連するものであり得る不安の増大と関連する表現型が明らかになった。

したがって、P R O 1 7 5 9 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、かかる神経学的障害の処置に有用であり得る。

#### 【 1 3 4 1 】

4 8 . 2 7 . D N A 8 2 3 7 2 （ U N Q 8 8 6 ） 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのロックアウト実験において、P R O 1 9 0 4 ポリペプチドをコードする遺伝子（D N A 8 2 3 7 2 と命名）（U N Q 8 8 6）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

40

M I S \_ \_ U N Q 8 8 6 L G I D : 1 5 2 0 8 ; 参照タンパク質：

M I S \_ \_ U N Q 8 8 6 O R F ( L G I D : 1 5 2 0 8 ) ; 参照ヒト遺伝子配列：

N M \_ 0 0 4 5 9 0 ホモ・サピエンスケモカイン（C - Cモチーフ）リガンド16（C C L 1 6）；ヒトタンパク質配列は、次の参照に対応する：

O 1 5 4 6 7 A C C E S S I O N : O 1 5 4 6 7 N I D :

ホモ・サピエンス（ヒト）。

小さい誘導サイトカインA16前駆体（C C L 1 6）（I L - 1 0 誘導ケモカイン）（ケモカインL E C）（肝臓発現ケモカイン）（モノタクチン - 1）（M T N - 1）（ケモカ

50

インCC-4)(HCC-4)(NCC-4)(リンパ球および単球化学誘引物質)(LMC)(LCC-1)。

#### 【1342】

目的のマウス遺伝子は、ヒトCCL16(ケモカイン[C-Cモチーフ]リガンド16)のオルソログである推定転写物(Lexiconアクセッション: MISC\_UNQ886)である。別名としては、LEC、LMC、NCC4、CKb12、HCC-4、LCC-1、Mtn-1、NCC-4、SCYL4、ILINCK、SCYA16、モノタクチン-1、ケモカインLEC、ケモカインCC-4、新たなCCケモカイン4、IL-10誘導ケモカイン、肝臓発現ケモカイン、肝臓CCケモカイン-1前駆体、ならびにリンパ球および単球化学誘引物質が挙げられる。

10

#### 【1343】

CCL16は、サイトカイン受容体CCR1、CCR2、CCR5およびCCR8の低親和性リガンドとして(Howard et al., Blood 96(3): 840-5(2000); Nomiyama et al., Int Immunol 13(8): 1021-9(2001))および好酸球上に発現されるヒスタミン受容体H4の高親和性リガンドとして(Nakayama et al., J Immunol 173(3): 2078-83(2004))の機能を果たす分泌タンパク質である。

CCL16は、肝細胞によって構成的に発現され(Nomiyama et al., Int Immunol 13(8): 1021-9(2001); Shoudai et al., Biochim Biophys Acta 1396(3): 273-7(1998))、CCL16発現は、活性化単球においてインターロイキン-10によって上方調節される(Hedrick et al., Blood 91(11): 4242-7(1998))。

20

CCL16は、免疫細胞機能の調節因子である。CCL16は、好酸球、単球、T細胞および樹状細胞の走化性を刺激し、マクロファージの機能を増強し、T細胞溶解活性を増大させる(Nakayama et al., J Immunol 173(3): 2078-83(2004); Guiducci et al., J Immunol 172(7): 4026-36(2004); Cappello et al., J Leukoc Biol 75(1): 135-42(2004))。

CCL16は、内皮細胞において血管形成活性を誘発することにより血管形成においてある役割を果たしている可能性がある(Strasly et al., Blood 103(1): 40-9(2004))。

30

CCL16は、腫瘍成長を遅延させ、転移を抑制し得、該サイトカインは、ある種の型の癌の処置に有用であり得ることが示唆される(Li et al., Cancer Res 63(23): 8384-92(2003); Guiducci et al., J Immunol 172(7): 4026-36(2004))。

#### 【1344】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹(ES)細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

40

#### 【1345】

## 【化 4 9】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	27	30	22	79
予測値	19.75	39.5	19.75	79

カイ二乗値 = 0.5 有意性 = 0.7788008 (hom/n) = 0.26 平均同腹  
仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え（標準）

説明：コードエクソン 1 から 3 をターゲティングした。

10

1. 野生型発現パネル：

標的遺伝子の発現は、RT-PCR によって試験した 13 の成体組織試料のうち、胚性幹（ES）細胞ならびに脳、脊髄および目において検出された。

2. QC 発現：QC 画像：標的遺伝子の破壊を、サザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

## 【1346】

48.27.1. 表現型解析（破壊遺伝子：DNA 82372（UNQ886））

（a）全体的な表現型の概要：

ヒトケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド 16（CCL16）のオルソログをコードする遺伝子の変異により、雌（-/-）マウスにおいて平均総組織マスおよび総体脂肪の増加がもたらされた。

20

変異型（-/-）マウスはまた、腹腔 CD117 細胞およびパイエル班の TCRb/CD38 細胞の増加を示した。該マウスは、LPS 攻撃に対する IL-6 応答の増加ならびに平均血清 IgG3 レベルの低下を示した。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

## 【1347】

（b）発現

HCC-4（CCL-16 としても知られる）は、主に肝臓において産生されるケモカインである。

これは、単球およびリンパ球のケモカインであることが知られているが、血管内皮細胞での血管形成プログラムにおいても機能を有する。

30

HCC-4 は、潰瘍性大腸炎において上方調節され、H4 ヒスタミン受容体への結合を介した好酸球輸送に関与している。

## 【1348】

（c）免疫学表現型解析

免疫関連疾患および炎症性疾患は、正常な生理機能において、傷害または損傷にตอบสนองし、傷害または損傷からの修復を開始し、そして外来生物体に対する先天的および後天的な防御を開始することによって重大な意味を有する、かなり複雑で、複雑に相互連結していることが多い生物学的経路の症状または結果である。これらの正常な生理学的経路が、応答の強度に直接関連してか、異常な制御もしくは過度の刺激の結果としてか、自己に対する応答としてか、またはこれらの組み合わせのいずれかとして、さらなる傷害または損傷を引き起こすときに、疾患または病態が生じる

40

これらの疾患の起源が、多段階の経路および複数の異なる生物学的系/経路に関連することが多いが、これらの経路の 1 個以上の重大な点における介入は、寛解性または治療的な効果を有し得る。治療的な介入は、有害なプロセス/経路の拮抗作用または有益なプロセス/経路の刺激のいずれかによって生じ得る。

## 【1349】

T リンパ球（T 細胞）は、哺乳動物の免疫応答の重要な成分である。T 細胞は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）内の遺伝子によってコードされる自己の分子に関連する抗原を認識する。この抗原は、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表

50

面上にMHC分子とともに提示され得る。T細胞系は、宿主哺乳動物に対して健康への脅威をもたらすこれらの改変細胞を排除する。T細胞としては、ヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞が挙げられる。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上の抗原-MHC複合体を認識した後、広範囲に増殖する。ヘルパーT細胞はまた、種々のサイトカイン、すなわち、リンフォカインを分泌する。リンフォカインは、B細胞、細胞傷害性T細胞および免疫応答に關与する他の種々の細胞の活性化において中心的な役割を果たす。

#### 【1350】

多くの免疫応答において、炎症細胞は、損傷または感染の部位を浸潤する。遊走細胞は、罹患組織の組織学的検査によって決定され得るような、好中球、好酸球、単球またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

多くの免疫関連疾患が知られており、広く研究されている。このような疾患としては、免疫媒介性炎症性疾患（例えば、関節リウマチ、免疫媒介性腎疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患（IBD）、乾癬および喘息）、非免疫媒介性炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全疾患、新形成および移植片拒絶などが挙げられる。免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を同定した。

#### 【1351】

免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を本明細書中で同定した。免疫関連疾患は、1つの場合において、免疫応答を抑制することによって処置され得る。免疫刺激性活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫媒介性疾患および炎症性疾患の処置に有益であり得る。免疫応答を阻害する分子は、免疫応答を阻害するために（タンパク質を直接または抗体アゴニストの使用を介して）利用され得、その結果、免疫関連疾患を寛解させ得る。

#### 【1352】

以下の試験を実施した：

（1）蛍光標識細胞分取（FACS）解析

手順：

CD4、CD8およびT細胞レセプターを含む、末梢血由来の免疫細胞組成物のFACS解析を実施して、Tリンパ球、Bリンパ球に対するCD19、白血球マーカーとしてのCD45およびナチュラルキラー細胞に対するpan NKを評価した。FACS解析は、2匹の野生型および6匹のホモ接合性マウスにおいて実施し、胸腺、脾臓、骨髓およびリンパ節由来の細胞を含んだ。

#### 【1353】

これらの研究において、解析される細胞を、胸腺、末梢血、脾臓、骨髓およびリンパ節から単離した。単核細胞集団内のCD4およびCD8陽性のT細胞、B細胞、NK細胞および単球の相対的比率を決定するようにフローサイトメトリーを設定した。Becton-Dickinson FACSCalibur 3-レーザーFACS装置を使用して、免疫状態を評価した。表現型アッセイおよびスクリーニングのために、この装置は、CD4+/CD8+比に加えて、CD4+/CD8-、CD8+/CD4-、NK、B細胞および単球の数を記録する。6つの系統特異的抗体のパネル：CD45 PerCP、抗TCRβ APC、CD4 PE、CD8 FITC、pan-NK PEおよびCD19 FITCを用いて、各マウス由来の溶解末梢血の単一サンプルを染色することによって単核細胞プロファイルを得た。2種類のFITC標識抗体およびPE標識抗体は、相互に排他的な細胞タイプを染色する。Cell Questソフトウェアを備えたBecton Dickinson FACSCaliburフローサイトメーターを使用してサンプルを解析した。

#### 【1354】

結果：

組織特異的FACS-プロジェクト：

( - / - ) マウスは、腹腔 C D 1 1 7 細胞 ( 増加 ) およびパイエル班における T C R b / C D 3 8 細胞における表現型を示した。したがって、 P R O 1 9 0 4 ポリペプチドまたは P R O 1 9 0 4 タンパク質をコードする遺伝子は、造血系前駆細胞 発達および / または生成の負の調節因子としての機能を果たすようである。

#### 【 1 3 5 5 】

急性期応答：

試験の説明：細菌リポ多糖 ( L P S ) は内毒素であり、そのようなものとして、急性期応答および全身性炎症の強い誘導因子である。レベル I L P S マウスに、26 ゲージの針を使用して、垂致死量の L P S を含む 2 0 0  $\mu$  L 滅菌生理食塩水を腹腔内 ( i . p . ) 注射した。この用量は、注射から 3 時間後に 1  $\mu$  g / g 体重で試験したマウスの平均体重に基づいた。次いで、1 0 0  $\mu$  L の血液サンプルを採取し、F A C S C a l i b u r 装置で T N F  $\alpha$ 、M C P - 1、および I L - 6 の存在について分析した。

10

#### 【 1 3 5 6 】

結果：

急性期応答：

( - / - ) マウスは、その ( + / + ) 同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、L P S 攻撃に対する I L - 6 応答の増加を示した。

#### 【 1 3 5 7 】

まとめると、L P S 内毒素攻撃は、P R O 1 9 0 4 ポリペプチドをコードする遺伝子が欠損したノックアウトマウスは、その野生型同腹仔と比較した場合、免疫学的異常を示すことを示した。特に、変異マウスは、L P S 内毒素で攻撃した場合、免疫応答 ( I L - 6 産生 ) を誘発する能力が増加し、炎症誘発応答を示す。I L - 6 は、より後期の B 細胞活性化に寄与する。さらに、I L - 6 は、急性期反応および全身性炎症の誘導に重要な役割を果たす。これにより、P R O 1 9 0 4 ポリペプチドのインヒビターまたはアンタゴニストが免疫系を刺激し、この効果が白血病、他の癌型、および免疫不全患者 ( A I D S 患者など ) などの場合の個体に有利である場合に使用されるであろうということが示唆される。したがって、P R O 1 9 0 4 ポリペプチドまたはその作用剤は、免疫応答の障害で有用であり、例えば、移植片拒絶または移植片対宿主疾患の場合の有害な免疫応答の抑制のための有用な候補であろう。

20

#### 【 1 3 5 8 】

血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイ：

C y t o m e t r i c B e a d A r r a y ( C B A ) キットを使用して、血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイを行う。このアッセイを使用して、1 つのサンプル中のマウスモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖のアイソタイプを迅速に同定する。示される値は、「相対蛍光単位」であり、軽鎖の検出に基づく。6 未満のいかなる値も有意ではない。

30

#### 【 1 3 5 9 】

結果：

血清 I m m . 2 ；

( - / - ) マウスは、その ( + / + ) 同腹仔、計画実行用の ( + / + ) マウスおよび歴史的中央値と比較して平均血清中 I g G 3 レベルの低下を示した。

40

#### 【 1 3 6 0 】

血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイは、その性別一致同腹仔 ( + / + ) コントロールと比較して、ホモ接合体 ( - / - ) マウスにおける平均血清 I g G 3 のレベルの低下または減少を示した。

#### 【 1 3 6 1 】

血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイにより、ホモ接合性成体が、血清 I g G 3 レベルの低下を示したことが明らかになった。したがって、ホモ接合体は、( + / + ) 同腹仔と比較して異常に低い血清免疫グロブリンを示した。したがって、P R O 1 9 0 4 ポリペプチドをコードする遺伝子は、免疫グロブリン ( またはガンマグロブリン ) を生成

50

するのに必須である。別で、IgG3免疫グロブリンは、中和作用を有し、それほどではないにせよ、補体系の活性化に重要である。

#### 【1362】

(d) 骨代謝および全身診断学 / 放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのDEXA
  - ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCT
- を含んだ。

10

#### 【1363】

Dexa解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量(BMC)、BMC/LBM比、容量測定による骨塩密度(vBMD)、全身BMD、大腿骨BMDおよび椎骨BMDを測定した。

#### 【1364】

Avertin(1.25%2, 2, 2, -トリプロモエタノール, 20mL/kg体重)をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンスitomーター(Lunar Inc.)のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域(ROI)[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度(BMD)および脂肪組成物(%脂肪)および総組織質量(TTM)を測定した。

20

#### 【1365】

骨マイクロCT解析：

手順：マイクロCTを使用して、非常に感度の高いBMDの測定を行った。1つの椎骨および1つの大腿骨を、4匹の野生型マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートから取り出した。腰部の5つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。μCT40スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、16マイクロメートルの解像度で第5腰部椎骨(LV5)において解析し、皮質骨パラメータを、20マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

30

#### 【1366】

結果：

Dexa：

雌(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均総組織マス、総体脂肪パーセントおよび総脂肪質量の顕著な増加を示した。

40

雌(-/-)マウスはまた、平均全身骨塩量、骨塩量指数BMC/LBMおよび椎骨骨中無機質密度(BMD)の減少を示した。

骨関連測定値の減少を伴う総組織マスおよび総体脂肪の増加は、脂肪および骨細胞が共通の前駆細胞から生じるため、有意である。

#### 【1367】

これらの結果から、変異(-/-)非ヒトトランスジェニック動物が、肥満に関する負の表現型を示すことが示唆される。したがって、PRO1904ポリペプチドまたはそのアゴニストは、正常な成長および代謝プロセスに必須であり、特に肥満症の予防および/または処置に重要であり得る。

#### 【1368】

50

また、骨密度および含量の測定値の減少は異常な骨障害を示唆する。

( - / - ) マウスは、骨代謝障害を反映する異常な骨測定値の減少を含む負の骨表現型を示した。その負の骨表現型は、PRO1904ポリペプチドまたはそのアゴニストが、骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。さらに、PRO1904ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、PRO1904ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト（またはインヒビター）は、関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む異常な骨代謝に関連する炎症性疾患を含む異常な骨障害または病理学的な骨障害に導き得る。

#### 【1369】

48.28.DNA225681(UNQ983)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO35193ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA225681と命名)(UNQ093)を破壊した。

NM\_019447 ACCESSION: NM\_019447 NID: 950677  
8 ムス・ムスクルスムス・ムスクルス肝細胞増殖因子アクチベーター(Hgf ac); 参照タンパク質:

Q9R098 ACCESSION: Q9R098 NID:

ムス・ムスクルス(マウス)。

HEPATOCTE GROWTH FACTOR ACTIVATOR PRECURSOR( EC 3.4.21.- ) (HGF ACTIVATOR) (HGF A); 参照ヒト遺伝子配列:

NM\_001528 ホモ・サピエンスHGFアクチベーター(HGFAC); ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する:

Q04756 ACCESSION: Q04756 NID:

ホモ・サピエンス(ヒト)。

HEPATOCTE GROWTH FACTOR ACTIVATOR PRECURSOR( EC 3.4.21.- ) (HGF ACTIVATOR) (HGF A)。

#### 【1370】

目的のマウス遺伝子は、ヒトHGFACのオルソログであるHgf ac(肝細胞増殖因子アクチベーター)である。別名としては、HGF Aが挙げられる。

#### 【1371】

HGFACは、主に肝臓において発現される分泌タンパク質であり、セリンプロテアーゼとしての機能を果たし、肝細胞増殖因子を切断および活性化する。

該タンパク質は、トロンピンによって切断および活性化され得る不活性チモーゲンとして発現される。HGFACは、肝臓だけでなく、発達中の腎臓の尿管芽および多数の骨髄腫細胞においても発現される。HGFACは、肝臓、腎臓、胎盤、肺および乳腺の発達、腸粘膜の修復、ならびに多数の骨髄腫細胞の増殖および生存に関与しているHGFシグナル伝達に重要な役割を果たす(Ito et al., Biochim Biophys

Acta 1491(1-3):295-302(2000); Miyazawa et al., J Biol Chem 268(14):10024-8(1992); Shimomura et al., J Biol Chem 268(30):22927-32(1993); van Adelsberg et al., J Biol Chem 276(18):15099-106(2001); Ito et al., Gastroenterology 127(5):1423-35(2004); Tjin et al., Blood 104(7):2172-5(2004)。

#### 【1372】

Itoおよび同僚(2004)により、ノックアウトマウスにおいてHGFACの生理学的役割が調査された。彼らにより、デキストラン硫酸ナトリウムの経口投与による胃腸の損傷に起因する死亡は、HGFACホモ接合性ヌルマウスにおいて野生型マウスよりも高いことが示された。さらに、彼らにより、ことが示された。HGF活性化および上皮

10

20

30

40

50



再生による損傷粘膜の修復は、ホモ接合性ヌルマウスでは障害されたが、野生型マウスでは障害されなかった。

I t o h および同僚により、H G F A C は、損傷超粘膜の修復に必要とされるが、正常な発達には必須ではないと結論付けられた。

#### 【 1 3 7 3 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。さらに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

#### 【 1 3 7 4 】

##### 【 化 5 0 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	24	44	20	88
予測値	22	44	22	88

カイ二乗値 = 0 . 0 3 有意性 = 0 . 9 8 5 1 1 1 9 5 ( h o m / n ) = 0 . 2 5 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え ( 標準 )

説明：コードエクソン 1 から 9 をターゲティングした ( N C B I アクセッション N M \_ 0 1 9 4 4 7 . 1 ) 。

1 . 野生型発現パネル：R T - P C R によって試験された、胚性幹細胞 ( E S ) 細胞および 1 3 のすべての成体組織サンプル ( 骨格筋および骨以外 ) において標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【 1 3 7 5 】

4 8 . 2 8 . 1 . 表現型解析 ( 破壊遺伝子：D N A 2 2 5 6 8 1 ( U N Q 9 8 3 )

( a ) 全体的な表現型の概要：

ヒト肝細胞増殖因子アクチベーター ( H G F A C ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、平均血清グルコースレベルの増加を示す ( - / - ) マウスがもたらされた。遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

#### 【 1 3 7 6 】

( b ) 表現型解析：代謝 - 血液化学

代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、血糖測定を含む。マウスにおける血液化学試験を実施するために C O B A S I n t e g r a 4 0 0 ( m f r : R o c h e ) を使用した。代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。

#### 【 1 3 7 7 】

結果：

雌 ( - / - ) マウスは、異常なグルコース代謝および / または糖尿病に関連するものであり得る平均血清グルコースレベルの増加を示した。

#### 【 1 3 7 8 】

したがって、変異型 ( - / - ) マウスは、グルコース代謝の変化または糖尿病と関連するものであり得る高血糖症を示した。

P R O 3 5 1 9 3 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、正常なグルコースレベル / 代謝

10

20

30

40

50

の維持に有用であり得、おそらく糖尿病の処置に有用であり得る。

#### 【1379】

48.29. DNA 81761 - 2583 (UNQ1895) 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO4341ポリペプチドをコードする遺伝子 (DNA 81761 - 2583 と命名) (UNQ1895) を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_019454 ACCESSION: NM\_019454 NID: 950654  
6 ムス・ムスクルス・ムス・ムスクルス 様4 (Drosophila) (D114)；参照タンパク質：

Q9DBU9 ACCESSION: Q9DBU9 NID：  
ムス・ムスクルス (マウス)。

DELTA-LIKE 4 HOMOLOG (DROSOPHILA)；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_019074 ホモ・サピエンス 様4 (Drosophila) (DLL4)；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q9NR61 ACCESSION: Q9NR61 NID：  
ホモ・サピエンス (ヒト)。

DELTA-LIKE PROTEIN 4 PRECURSOR (DROSOPHILA DELTA HOMOLOG 4)。

#### 【1380】

目的のマウス遺伝子は、ヒトDLL4のオルソログであるD114 (様4 [Drosophila]) である。別名としては、Delta4、様4タンパク質、4前駆体、リガンド4前駆体、ノッチリガンドDLL4前駆体、ノッチリガンド - 2前駆体、様4ホモログ (Drosophila)、およびh 2が挙げられる。

#### 【1381】

DLL4は、ノッチリガンドのファミリーに属するI型原形質膜タンパク質である。DLL4は、シグナルペプチド、鋸歯状 (serrate) リガンド (DSL) ドメイン、少なくとも7つの上皮細胞増殖因子 (EGF) 様反復配列、膜貫通セグメント、および細胞質C末端を含む。DLL4は、受容体NOTCH1およびNOTCH4を活性化し得る (Shutter et al., Genes Dev 14 (11): 1313 - 8 (2000))、which play an 重要な役割 in 血管形成 (Krebs et al., Genes Dev 14 (11): 1343 - 52 (2000))。

DLL4は、主に、発達中のマウス胚の動脈の血管内皮、成体マウス、および腫瘍モデルにおいて発現される (Shutter et al., Genes Dev 14 (11): 1313 - 8 (2000)；Mailhos et al., Differentiation 69 (2-3): 135 - 44 (2001))。

DLL4は、造血系および血管系の発達においてある役割を果たしており (Dorsch et al., Blood 100 (6): 2046 - 55 (2002)；Lauret et al., Leukemia 18 (4): 788 - 97 (2004))、ある種の型の癌の処置のための治療潜在性を有し得る (Tohda et al., Int J Oncol 22 (5): 1073 - 9 (2003))。

#### 【1382】

数名の研究者により、ノックアウトマウスを用いてDLL4の生理学的役割が研究された。Krebsおよび共働者 [Genes Dev 18 (20): 2469 - 73 (2004)] ならびにGaleおよび同僚 [Proc Natl Acad Sci U S A 101 (45): 15949 - 54 (2004)] により、DLL4ヘテロ接合性胚では血管再形成が欠損し、ハプロ不全致死がもたらされることが示された。彼らに

10

20

30

40

50

より、血管再形成は、D L L 4 遺伝子量に感受性であると結論付けられた。

D u a r t e および同僚 [ G e n e s D e v 1 8 ( 2 0 ) : 2 4 7 4 - 8 ( 2 0 0 4 ) ] によって、生殖細胞系伝達キメラを I C R 雌マウスと交配させることにより D L L 4 ヘテロ接合性マウスが成功裏に作製された。D L L 4 ヘテロ接合性マウスは、I C R 背景では 2 7 % 頻度で生成されたが、1 2 9 / S v - C P 背景では D L L 4 ヘテロ接合性マウスは生成されなかった。動脈血管の発達における欠陥は、すべての D L L 4 ヘテロ接合性胚において、種々の程度で明白であった。生存している雄および雌 D L L 4 ヘテロ接合性マウスは、見かけ上、正常で生殖能を有した。

胚致死性は、1 0 . 5 日の D L L 4 ホモ接合性ヌルマウスで観察され、主に動脈血管の発達における重症な欠陥が示された。

D u a r t e および同僚により、胚の血管発達は、系統依存的ハプロ不全によって一部示されるように、D L L 4 レベル非常に感受性であると結論付けられた。彼らにより、D L L 4 は、成体の血管新生における介入のための治療的有用性を有し得ることが示された。

【 1 3 8 3 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

【 1 3 8 4 】

【 化 5 1 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	0	0	0	0
予測値	0	0	0	0

カイ二乗値 = 0 . 0      有意性 = 0 . 0 ( h o m / n ) = 0 . 0      平均同腹仔数 = 0

変異情報

変異型：相同組換え ( 標準 )

説明：コードエクソン 1 ~ 8 をターゲティングした ( N C B I アクセッション N M \_ 0 1 9 4 5 4 . 1 ) 。

1 . 野生型発現パネル：

標的遺伝子の発現は、骨格筋、喘息肺、L P S 肝臓、血液、皮膚線維芽細胞、M G 1 2 D P C および離乳 ( 授乳 ) 後第 3 日の M G を除く R T - P C R によって試験した 2 6 の成体組織試料のすべてにおいて検出された。

2 . Q C 発現：Q C 画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【 1 3 8 5 】

4 8 . 2 9 . 1 . 表現型解析 ( 破壊遺伝子：D N A 8 1 7 6 1 - 1 5 8 3 ( U N Q 1 8 9 5 ) )

( a ) 全体的な表現型の概要：

ヒト様 4 ( D r o s o p h i l a ) ( D L L 4 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、( + / - ) および ( - / - ) 変異型の致死がもたらされた。

遺伝子情報により、この変異によって、ヘテロ接合性およびホモ接合性変異型の両方の致死がもたらされたことが示される。1 1 . 5 日および 1 2 . 5 日に調べたヘテロ接合性胚では、構造的発達異常は検出されなかった。ホモ接合性変異型胚は観察しなかった。

標的遺伝子の破壊を、サザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【 1 3 8 6 】

10

20

30

40

50

## (b) 病理学

顕微鏡的：

胚致死性。

( - / - ) 胚は観察しなかった。

11.5日または12.5日( + / - ) 胚では、構造的発達異常は検出されなかった。

死亡率についての胚発達異常に関する考察：

ノックアウトマウスにおける胚性致死は、通常、種々の重篤な発達上の問題（神経変性疾患、血管障害、炎症性疾患が含まれるが、これらに限定されない）または遺伝子/タンパク質が多く細胞型において基礎的な細胞シグナル伝達過程で重要な役割を果たすことに起因する。さらに、胚性致死は、潜在的な癌モデルとして有用である。同様に、対応するヘテロ接合体( + / - ) 変異動物は、これらがノックアウト遺伝子の機能に関する非常に有益な手がかりが明らかとなる表現型および/または病理学報告を示す場合に特に有用である。例えば、EPOノックアウト動物は胚致死性を示すが、胚に関する病理学報告は、RBCの著しい欠如を示した。

10

## 【1387】

48.30.DNA92232-2589(UNQ1902)遺伝子破壊を含むマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験では、PRO4348ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA92232-2589と示す)(UNQ1902)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報を以下に示す：変異マウス遺伝子は、以下に対応する：参照ヌクレオチド：

20

NM\_027334 ACCESSION: NM\_027334 NID: gi\_33563289 ref NM\_027334.2 ムス・ムスクルスRIKEN cDNA 3300001H21 遺伝子(3300001H21Rik); 参照タンパク質：

Q8C6B0 ACCESSION: Q8C6B0 NID:

ムス・ムスクルス(マウス)。

ムス・ムスクルス17日胚 head cDNA、RIKEN完全長高含有ライブラリー、クローン：3300001H21産物：仮想S-アデノシル-L-メチオニン依存性メチルトランスフェラーゼ構造含有タンパク質、完全挿入物配列(DKFZP586A0522タンパク質)；参照ヒト遺伝子配列：

30

NM\_014033ホモ・サピエンスDKFZP586A0522 タンパク質(DKFZP586A0522)；ヒトタンパク質配列は、以下に対応する：

Q9H8H3 ACCESSION: Q9H8H3 NID:

ホモ・サピエンス(ヒト)。

CDNA FLJ13631 FIS、CLONE PLACE1011090、HIGHLY SIMILAR TO HOMO SAPIENS MRNA；CDNA DKFZP586A0522(FROM CLONE DKFZP586A0522)(UNKNOWN)(PROTEIN FOR MGC:11081)(DKFZP586A0522 PROTEIN)。

40

## 【1388】

目的のマウス遺伝子は、遺伝子(DKFZP586A0522タンパク質のオーソログ)である。

別名としては、2210414H16Rik、UbiE、Aam-B、およびAAM-Bタンパク質が挙げられる。

## 【1389】

DKFZP586A0522タンパク質は、メチルトランスフェラーゼ酵素として機能している可能性がある推定II型内在性膜タンパク質である。

該タンパク質は、シグナルアンカーおよびS-アデノシル-L-メチオニン依存性メチルトランスフェラーゼスーパーファミリドメインを含む(SCOPアクセッションd1f

50

p2a2; InterProアクセッションIPR000051およびIPR001601)。

このドメインを有するタンパク質は、S-アデノシル-L-メチオニンをメチル供与体として用いて特定のDNA、RNA、タンパク質または低分子基質のメチル化を触媒する。DKFZP586A0522タンパク質は細胞外タンパク質であり得る(Clark et al., Genome Res 13(10):2265-70(2003))。

【1390】

ターゲティングされたか遺伝子トラップされた変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹(ES)細胞で行った。キメラマウスを、C57BL/6Jアルビノマウスと交配してF1ヘテロ接合体動物を作製する。これらの子孫を交雑受精してF2野生型子孫、ヘテロ接合体変異子孫、およびホモ接合体変異子孫を作製する。稀に、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合、F1ヘテロ接合体マウスを、129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑してさらなるヘテロ接合体動物を作製し、これを交雑受精してF2マウスを作製する。この世代由来のマウスに対してレベルI表現型解析を行う。

10

【1391】

【化52】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	24	40	19	83
予測値	20.75	41.5	20.75	83

20

カイ二乗 = 2.3 有意性 = 0.31663677 (hom/n) = 0.23 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え(標準)

説明：コードエクソン1をターゲティングした(NCBIアクセッションNM\_027334)。

1. 野生型発現パネル：胚性幹(ES)細胞およびRT-PCRによって試験した26個の成体組織サンプル中の標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現：QC画像：標的遺伝子の破壊を、サザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

30

【1392】

48.30.1. 表現型解析(破壊遺伝子：DNA92232-2589(UNQ1902))

(a) 全体的な表現型の概要：

推定ヒトII型内在性膜タンパク質(DKFZP586A0522)のオルソログをコードする遺伝子の変異により、骨塩量および骨中無機質密度の測定値の減少を示す変異型(-/-)マウスがもたらされた。

遺伝子破壊を、サザンプロットによって確認した。

【1393】

40

(b) 骨代謝および身体診断/放射線表現型解析

骨代謝領域では、本明細書中で、標的を、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症、および大理石骨病の治療、ならびに骨治癒を促進する標的の同定のために同定した。試験は、以下を含んでいた。

- ・大腿骨および脊椎骨における骨中無機質密度の測定のためのDEXA
- ・骨小柱および皮質骨の骨中無機質密度の非常に高分解能且つ非常に高感度の測定のためのマイクロCT。

【1394】

Dexa解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型、4匹のヘテロ接合体、および8匹のホモ接合体のコホートを、こ

50

のアッセイで使用した。二重エネルギー X 線吸収測定法 (DEXA) を使用して、骨の変化を首尾よく同定した。麻酔した動物を試験し、骨塩量 (BMC)、BMC/LBM 比、容積測定骨中無機質密度 (vBMD)、全身 BMD、大腿骨 BMD、および脊椎骨 BMD を測定した。

#### 【1395】

マウスを、アベルチン (1.25% 2, 2, 2-トリプロモエタノール、20 mL/kg 体重) の腹腔内注射によって麻酔し、体長および体重を測定し、DEXA スキャンのために、マウスを PIXImus TM デンシトメータ (Lunar Inc.) のプラットフォーム上に腹臥位で配置した。Lunar PIXImus ソフトウェアを使用して、関心領域 (ROI) (すなわち、全身、脊椎、および両大腿骨) 中の骨中無機質密度 (BMD)、脂肪組成 (% 脂肪)、および総組織マス (TTM) を決定した。

10

#### 【1396】

骨マイクロ CT 解析：

手順：マイクロ CT を使用して、非常に感度の高い BMD の測定を行った。1 つの椎骨および 1 つの大腿骨を、4 匹の野生型マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートから取り出した。腰部の 5 つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。μCT 40 スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、16 マイクロメートルの解像度で第 5 腰部椎骨 (LV5) において解析し、皮質骨パラメータを、20 マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

20

#### 【1397】

結果：

Dexa：

雌 (-/-) マウスは、その性別一致 (+/+) 同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均骨塩量、全身骨塩密度および椎骨骨中無機質密度の測定値の減少を示した。骨密度および含量の測定値の減少は異常な骨障害を示唆する。

#### 【1398】

(-/-) マウスは、負の骨表現型を示し、骨の代謝障害を反映する骨測定値が異常に減少した。骨の負の表現型は、PRO4348 ポリペプチドまたはそのアゴニストが、骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。さらに、PRO4348 ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、PRO4348 ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト (またはインヒビター) は、異常な骨代謝に関連する炎症性疾患 (関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む) を含む、異常または病理学的な骨障害に導き得る。

30

#### 【1399】

48.31.DNA92289-2598 (UNQ1911) 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO4369 ポリペプチドをコードする遺伝子 (DNA92289-2598 と命名) (UNQ1911) を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

40

NM\_023403 ACCESSION: NM\_023403 NID:

gi\_12963664 ref NM\_023403.1 ムス・ムスクルス中胚葉発達候補 2 (Mesdc2)；参照タンパク質：

Q9ERE7 ACCESSION: Q9ERE7 NID:

ムス・ムスクルス (マウス)。

中胚葉発達候補 2；参照ヒト遺伝子配列：

BC009210 ACCESSION: BC009210 NID: 14327971

ホモ・サピエンスホモ・サピエンス、中胚葉発達候補 2 と類似、クローン MGC: 161

50

85 IMAGE: 3637449; ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する:  
 Q14696 ACCESSION: Q14696 NID:  
 ホモ・サピエンス(ヒト)。  
 中胚葉発達候補2。

#### 【1400】

目的のマウス遺伝子は、ヒトMESDC2のオルソログであるMesdc2(中胚葉発達候補2)である。別名としては、MGC25959、mKIAA0081、2210015011Rik、BOCA、MESD、およびKIAA0081が挙げられる。

#### 【1401】

MESDC2は、小胞体上に存在するタンパク質であり、おそらく、Wntシグナル伝達共受容体LRP5およびLRP6のシャペロンタンパク質または他の低密度リポタンパク質受容体ファミリー構成員のシャペロンタンパク質としての機能を果たしている。MESDC2は、カーゴ輸送またはWntシグナル伝達を伴うプロセス、例えば、発達および骨形成中の胚極性および中胚葉誘導などにおいてある役割を果たしている可能性がある(Wines et al., Genomics 72(1): 88-98(2001); Hsieh et al., Cell 112(3): 355-67(2003); Culi and Mann, Cell 112(3): 343-54(2003); Herz and Marschang, Cell 112(3): 289-92(2003); Zhang et al., Mol Cell Biol 24(11): 4677-84(2004))。

#### 【1402】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹(ES)細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

#### 【1403】

##### 【化53】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	21	32	0	53
予測値	13.25	26.5	13.25	53

カイ二乗値 = 42.69 有意性 = 5.370127E-10 (hom/n) = 0.0 平均同腹仔数 = 8

変異情報

変異型: 相同組換え(標準)

説明: コードエクソン1をターゲティングした(NCBIアクセッションNM\_023403.2)。

1. 野生型発現パネル: RT-PCRによって試験された、胚性幹細胞(ES)細胞および13のすべての成体組織サンプルにおいて標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現: 標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【1404】

48.31.1.DNA92289-2598(UNQ1911)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

(a) 全体的な表現型の概要:

ヒト中胚葉発達候補2(MESDC2)のオルソログをコードするUNQ1911遺伝

10

20

30

40

50

子の変異により、( - / - ) 変異型の致死がもたらされた。遺伝子情報により、この変異によってホモ接合性変異型の致死がもたらされたことが示される。ヘテロ接合性マウスは、その野生型同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均血清 I g G 1 および卵白アルブミン攻撃に対する I g G 2 a 応答の増加を示した。平均血清 I g M レベルの増加もまた、( + / - ) マウスにおいて観察された。

標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【 1 4 0 5 】

##### ( b ) 病理学

##### 顕微鏡的：

胚致死性により、顕微鏡解析は行なわなかった。

1 2 . 5 日目に、4 7 個の胚：2 7 個の ( + / - ) 胚、4 個の ( + / + ) 胚、1 4 個の再吸収モル ( r e s o r p t i o n m o l e s ) および 1 個の未定胚が観察された。

U N Q 1 9 1 1 は、中胚葉の分化に不可欠な染色体領域内に存在する未知機能のタンパク質である。U N Q 1 9 1 1 は、おそらく中胚葉分化調節に重要な役割を果たしており、これは、ホモ接合性マウスにおいて生じた胚致死性によって説明され得る。

遺伝子発現：L a c Z 活性は、免疫組織化学によって組織パネルにおいて検出されなかった。

#### 【 1 4 0 6 】

##### 致死性の胚の発達異常に関連する考察：

ノックアウトマウスにおける胚性致死は、通常、種々の重篤な発生上の問題（神経変性疾患、血管障害、炎症性疾患が挙げられるが、これらに限定されない）によって生じるか、または遺伝子 / タンパク質が多く細胞型において基礎的な細胞シグナル伝達プロセスで重要な役割を果たす場合に生じる。さらに、胚性致死は、潜在的な癌モデルとして有用である。同様に、対応するヘテロ接合性 ( + / - ) 変異動物は、これらがノックアウトされた遺伝子の機能に関する非常に有益な手がかりを明らかにする表現型および / または病理学報告を示す場合に特に有用である。例えば、E P O ノックアウト動物は胚致死性を示したが、胚に関する病理学報告は、R B C の著しい欠如を示した。

#### 【 1 4 0 7 】

##### ( c ) 免疫学表現型解析

免疫関連疾患および炎症性疾患は、正常な生理機能において、傷害または損傷にตอบสนองし、傷害または損傷からの修復を開始し、そして外来生物体に対する先天的および後天的な防御を開始することによって重大な意味を有する、かなり複雑で、複雑に相互連結していることが多い生物学的経路の症状または結果である。これらの正常な生理学的経路が、応答の強度に直接関連してか、異常な制御もしくは過度の刺激の結果としてか、自己に対する応答としてか、またはこれらの組み合わせのいずれかとして、さらなる傷害または損傷を引き起こすときに、疾患または病態が生じる。

#### 【 1 4 0 8 】

これらの疾患の起源が、多段階の経路および複数の異なる生物学的系 / 経路に関連することが多いが、これらの経路の 1 個以上の重大な点における介入は、寛解性または治療的な効果を有し得る。治療的な介入は、有害なプロセス / 経路の拮抗作用または有益なプロセス / 経路の刺激のいずれかによって生じ得る。

#### 【 1 4 0 9 】

T リンパ球 ( T 細胞 ) は、哺乳動物の免疫応答の重要な成分である。T 細胞は、主要組織適合遺伝子複合体 ( M H C ) 内の遺伝子によってコードされる自己の分子に関連する抗原を認識する。この抗原は、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上に M H C 分子とともに提示され得る。T 細胞系は、宿主哺乳動物に対して健康への脅威をもたらすこれらの改変細胞を排除する。T 細胞としては、ヘルパー T 細胞および細胞傷害性 T 細胞が挙げられる。ヘルパー T 細胞は、抗原提示細胞上の抗原 - M H C 複合体を認識した後、広範囲に増殖する。ヘルパー T 細胞はまた、種々のサイトカイン、すなわち、リンフォカインを分泌する。リンフォカインは、B 細胞、細胞傷害性 T 細胞および免疫

10

20

30

40

50



応答に關与する他の種々の細胞の活性化において中心的な役割を果たす。

【1410】

多くの免疫応答において、炎症細胞は、損傷または感染の部位を浸潤する。遊走細胞は、罹患組織の組織学的検査によって決定され得るような、好中球、好酸球、単球またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

多くの免疫関連疾患が知られており、広く研究されている。このような疾患としては、免疫媒介性炎症性疾患（例えば、関節リウマチ、免疫媒介性腎疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患（IBD）、乾癬および喘息）、非免疫媒介性炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全疾患、新形成および移植片拒絶などが挙げられる。免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を同定した。

10

【1411】

免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を本明細書中で同定した。免疫関連疾患は、1つの場合において、免疫応答を抑制することによって処置され得る。免疫刺激性活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫媒介性疾患および炎症性疾患の処置に有益であり得る。免疫応答を阻害する分子は、免疫応答を阻害するために（タンパク質を直接または抗体アゴニストの使用を介して）利用され得、その結果、免疫関連疾患を寛解させ得る。

20

【1412】

以下の試験を実施した：

卵白アルブミン攻撃

手順：このアッセイは、7匹の野生型および8匹のホモ接合体マウスにおいて行った。ニワトリ卵白アルブミン（OVA）は、T細胞依存性抗原であり、マウスにおける抗原特異的免疫応答の研究用のモデルタンパク質として一般に使用されている。OVAは無毒で不活性であり、したがって、免疫応答が誘発されない場合であっても動物に害をもたらさない。OVAに対するマウスの免疫応答は、T細胞応答を惹起させる免疫優性ペプチドが同定されている程度まで充分に特徴付けされている。抗OVA抗体を、免疫処置の8～10日後に酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）を用いて検出することができ、抗体の異なるアイソタイプの測定によって、遺伝子操作されたマウスにおいて欠陥性応答をもたらし得る複雑なプロセスに関するさらなる情報が得られる。

30

【1413】

上記のように、このプロトコルは、マウスが抗原特異的免疫応答を生じる能力を評価する。動物に50mgのニワトリ卵白アルブミン（完全フロイントアジュバント中に乳化）をIP注射し、14日後に、抗卵白アルブミン抗体（IgM、IgG1およびIgG2サブクラス）の血清力価を測定した。血清試料中のOVA特異的抗体の量は、96ウェル試料プレートを読み取る装置によって得られる光学密度（OD）値に比例する。データは、各血清試料の1組の連続希釈物に対して収集した。

【1414】

この攻撃の結果：

40

卵白アルブミン：（+/-）マウスは、その（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較した場合、卵白アルブミン攻撃に対する平均血清IgG1およびIgG2a応答の増加を示した。

【1415】

まとめると、卵白アルブミン攻撃研究は、PRO4343ポリペプチドをコードする遺伝子が欠失したノックアウトヘテロ接合性マウスが、その野生型同腹仔と比較した場合、免疫学的異常を示すことを示す。特に、変異（+/-）マウスは、T細胞依存性OVA抗原で攻撃した場合、免疫学的応答を誘発する能力の増加を示した。したがって、PRO4348ポリペプチドのアнтаゴニスト（インヒビター）は、免疫系の刺激に有用であり、この効果が白血病、他の癌型、および免疫不全患者（AIDS患者など）などの場合の個

50

体に有利である場合に使用されるであろうということが示唆される。したがって、PRO4348ポリペプチドまたはその作用剤は、免疫応答の阻害で有用であり、例えば、移植片拒絶、移植片対宿主疾患、または自己免疫疾患の場合の有害な免疫応答の抑制のための有用な候補であろう。

#### 【1416】

血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイ：

Cytometric Bead Array (CBA) キットを使用して、血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイを行う。このアッセイを使用して、1つのサンプル中のマウスモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖のアイソタイプを迅速に同定する。示される値は、「相対蛍光単位」であり、軽鎖の検出に基づく。6未満のいかなる値も有意ではない。

10

#### 【1417】

結果：

血清 IgM . 2 :

(+/-) マウスは、その(+/+)同腹仔、計画実行用の(+/+)マウスおよび歴史的中央値と比較して平均血清中IgMレベルの上昇を示した。

#### 【1418】

変異体(+/-)マウスは、その性別一致(+/+)同腹仔と比較して平均血清IgM免疫グロブリンレベルの上昇を示した。IgM免疫グロブリンは、細菌のトキシンの中和に対する体液性免疫応答において最初に産生され、補体系を活性化する際に特に重要である。観察された表現型から、PRO4348ポリペプチドが、炎症性応答の負の制御因子であることが示唆される。これらの免疫学的異常から、PRO4348ポリペプチドのインヒビター(アンタゴニスト)が、免疫系(例えば、T細胞増殖)を刺激し得る重要な物質であり得、この作用が白血病および他のタイプの癌の場合の個体ならびにAIDS罹患患者などの免疫無防備状態の患者にとって有益であり得る場合に有用性が見出され得ることが示唆される。したがって、PRO4348ポリペプチドまたはそのアゴニストは、免疫応答を阻害に有用であり得、例えば、移植片拒絶または移植片対宿主病の場合における有害な免疫応答を抑制するための有用な候補であり得る。

20

#### 【1419】

48.32.DNA92225-2603(UNQ1916)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

30

これらのノックアウト実験において、PRO4381ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA92225-2603と命名)(UNQ1916)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_178066 ムス・ムスクルスRIKEN cDNA 1110012D08 遺伝子(1110012D08Rik)；参照タンパク質：

Q8CFU0 ACCESSION: Q8CFU0 NID:

ムス・ムスクルス(マウス)。

RIKEN cDNA 1110012D08；参照ヒト遺伝子配列：

40

AK057179 ACCESSION: AK057179 NID: 16552774  
ホモ・サピエンスホモ・サピエンスcDNA FLJ32617 fis、クローンSTOMA2000257。

#### 【1420】

目的のマウス遺伝子は、「ホモ・サピエンスcDNA FLJ32617 fis、クローンSTOMA2000257」で表されるヒト遺伝子のオルソログであるRIKEN cDNA 1110012D08遺伝子である。

#### 【1421】

該仮想タンパク質は、おそらく、7回膜貫通ドメインからなる内在性膜タンパク質である。

50

バイオインフォマティク解析から、該仮想タンパク質は原形質膜上に存在することが示唆される。

#### 【 1 4 2 2 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

10

#### 【 1 4 2 3 】

##### 【 化 5 4 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	20	41	20	81
予測値	20.25	40.5	20.25	81

カイ二乗値 = 0 . 8 3 有意性 = 0 . 6 6 0 3 4 0 3 ( h o m / n ) = 0 . 2 7 平均同腹仔数 = 9

変異情報

20

変異型：相同組換え ( 標準 )

説明：

コードエキソン 1 の前の非コードエキソンならびにコードエキソン 1 および 2 を標的化した ( N C B I アクセッション N M \_ 1 7 8 0 6 6 . 2 ) 。

1 . 野生型発現パネル：R T - P C R によって試験された、胚性幹細胞 ( E S ) 細胞および 1 3 のすべての成体組織サンプル ( 骨以外 ) において標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現：Q C 画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【 1 4 2 4 】

4 8 . 3 2 . 1 . 表現型解析 ( 破壊遺伝子：D N A 9 2 2 2 5 - 2 6 0 3 ( U N Q 1 9 1 6 )

30

( a ) 全体的な表現型の概要：

ヒト仮想膜タンパク質のオルソログをコードする遺伝子の変異により、( - / - ) マウスにおいて感覚運動ゲーティング / 注意の障害がもたらされた。

雄 ( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較して、平均体重の増加を示した。

また、ホモ接合性マウスは、その ( + / + ) 同腹仔対照と比較した場合、血小板計数の増加および C D 8 細胞の平均パーセンテージの減少を示したため、免疫学的異常も ( - / - ) マウスにおいて観察された。遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

#### 【 1 4 2 5 】

40

( b ) 免疫表現型解析

免疫関連疾患および炎症疾患は、通常の生理学では発作または損傷に応答し、発作または損傷からの修復を開始し、外来生物に対する先天性および後天性防御を増加させるために極めて重要な非常に複雑でしばしば複数の相互関連した生物学的経路の徴候および結果である。これらの正常な生理学的経路が応答強度の直接的関連、異常な制御または過剰な刺激の結果、自己反応、またはこれらの組み合わせとしてさらなる発作または損傷を引き起こす場合、疾患または病変が起こる。

#### 【 1 4 2 6 】

これらの疾患の発症は、しばしば多段階経路およびしばしば複数の異なる生体系 / 生物学的経路に関与するが、1 つまたは複数のこれらの経路における臨界点での介入が改善効

50

果または治療効果を示し得る。有害な過程／経路の拮抗作用または有益な過程／経路の刺激のいずれかによって治療介入を行うことができる。

#### 【 1 4 2 7 】

Tリンパ球（T細胞）は、哺乳動物免疫応答の重要な構成要素である。T細胞は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）内の遺伝子によってコードされる自己分子に関連する抗原を認識する。抗原を、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上のMHC分子と共に提示することができる。T細胞系は、宿主哺乳動物の健康に害を及ぼすこれらの変化した細胞を排除する。T細胞には、ヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞が含まれる。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上の抗原-MHC複合体の認識後に大規模に増殖する。ヘルパーT細胞はまた、B細胞、細胞傷害性T細胞、および免疫応答に関与する種々の他の細胞の活性化で中心的な役割を果たす種々のサイトカイン（すなわち、リンフォカイン）を分泌する。

10

#### 【 1 4 2 8 】

多くの免疫応答では、炎症細胞が損傷部位または感染部位に浸潤する。移動細胞は、罹患組織の組織学的試験によって決定することができる好中球、好酸球、単球、またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

多くの免疫関連疾患が公知であり、広く研究されている。このような疾患には、免疫介在炎症疾患（関節リウマチ、免疫介在腎臓疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患（IBD）、乾癬、および喘息など）、非免疫介在炎症疾患、感染症、免疫不全、新形成、および移植片拒絶などが含まれる。免疫学領域では、炎症および炎症障害の治療のための標的を同定した。

20

#### 【 1 4 2 9 】

免疫学領域では、本明細書中で、炎症および炎症障害の治療のための標的を同定した。免疫関連障害を、ある場合において、免疫応答の抑制によって治療することができる。免疫刺激活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫介在疾患および炎症疾患の治療で有利であろう。免疫応答を阻害する分子（直接または抗体作用剤の使用を介したタンパク質）を使用して、免疫応答を阻害し、免疫関連疾患を改善することができる。

30

#### 【 1 4 3 0 】

以下の試験を行った。

#### 【 1 4 3 1 】

蛍光活性化細胞分取（FACS）解析

手順：

末梢血由来の免疫細胞組成物（Tリンパ球を評価するためのCD4、CD8、およびT細胞受容体、Bリンパ球のためのCD19、白血球マーカーとしてのCD45、およびナチュラルキラー細胞のためのpanNKが含まれる）のFACS解析を行った。2匹の野生型マウスおよび6匹のホモ接合体マウスに対してFACS解析を行い、マウスは、胸腺、脾臓、骨髄、およびリンパ節由来の細胞を含んでいた。

40

#### 【 1 4 3 2 】

これらの研究では、分析細胞を、胸腺、末梢血、脾臓、骨髄、およびリンパ節から単離した。単核細胞集団中のCD4およびCD8陽性T細胞、B細胞、NK細胞、および単球の相対的比率が決定されるようにフローサイトメトリーをデザインした。Becton-Dickinson FACSCalibur 3-レーザーFACS装置を使用して、免疫状態を評価した。表現型アッセイおよびスクリーニングのために、この機械は、CD4+/CD8+比に加えて、CD4+/CD8-、CD8+/CD4-、NK、B細胞、および単球の数を記録する。単核細胞プロファイルを、6系統特異的抗体のパネル（CD45 PerCP、抗TCRb APC、CD4 PE、CD8 FITC、pan-NK PE、およびCD19 FITC）を使用した各マウス由来の溶解末梢血の単一サンプルの染色によって導いた。2つのFITCおよびPE標識抗体は、相互排除する細胞

50

型を染色する。CellQuestソフトウェアを備えたBecton Dickinson FACS Caliburフローサイトメーターを使用して、サンプルを分析した。

【1433】

結果：

FACS3：

(-/-)マウスは、その(+/+)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、CD8細胞の平均パーセンテージの減少を特徴とする末梢血中の白血球サブセットの分布の変化を示した。

【1434】

したがって、PRO4381ポリペプチドをコードする遺伝子のノックアウトは、T細胞集団の減少を引き起こす。これらの観察結果から、PRO4381ポリペプチドまたはPRO4381をコードする遺伝子は、T細胞増殖の負の制御因子として作用するようだ

。したがって、PRO4381ポリペプチドは、T細胞増殖の増強に有益であり得る。

【1435】

血液学解析：

試験の説明：血液試験は、Abbott社のCell-Dyn3500R自動血液学分析装置によって行う。その特徴の一部としては、5種類の白血球分画が挙げられる。「患者」レポートには、全部で22を超えるパラメータが含まれ得る。

【1436】

結果：

血液学：(-/-)マウスは、その(+/+)同腹仔および歴史的平均と比較して、平均血小板数の増加を示した。

【1437】

したがって、DNA92225-2603遺伝子が欠損した変異マウスは、凝血障害に関連する表現型を生じた。これに関して、PRO4381ポリペプチドのインヒビターまたはアンタゴニストは、血友病などの異常な血液凝固に関連する障害の治療で有用であろう。

【1438】

(c)表現型解析：CNS/神経学

神経学の分野において、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害を含む神経性障害および精神医学的障害の処置のためのインビボにおいて有効な標的の同定についての解析に本明細書中では注目した。神経障害は、「不安障害」として定義されるカテゴリーを含む。その「不安障害」としては、以下：軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、別段特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴うパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、I型またはII型の双極性障害、別段特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害にあてはまることもあり、その人格障害としては、以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない。

【1439】

手順：

行動スクリーニングを、4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性変異マウスのコホートにおいて実施した。生存能低下のために、より早期の試験が必要とならない限り、すべての行動試験は、12～16週齢の間に実施した。これらの試験には、不安、活動レベル、および探索を測定するためのオープンフィールドが含まれていた。

10

20

30

40

50

## 【 1 4 4 0 】

聴覚驚愕反射のプレパルス抑制

聴覚驚愕反射のプレパルス抑制は、大きな 1 2 0 デシベル ( d B ) 驚愕誘発音が、より小さい ( プレパルス ) 音に先行する場合に起こる。 P P I パラダイムは、6 種類の異なる試行型 ( 7 0 d B バックグラウンドノイズ、1 2 0 d B 単独、7 4 d B + 1 2 0 d B - p p 4、7 8 d B + 1 2 0 d B - p p 8、8 2 d B + 1 2 0 d B - p p 1 2、および 9 0 d B + 1 2 0 d B - p p 2 0 ) からなり、各々、擬似ランダム順に 6 回、合計 3 6 回の試行が繰り返される。刺激に対する最大応答 ( V m a x ) を、各試行型について平均する。1 0 0 以下の 1 2 0 d B 平均値を有する動物は、解析から除外する。プレパルスが動物の驚愕刺激に対する応答を抑制するパーセンテージを計算し、グラフで示す。

10

## 【 1 4 4 1 】

結果：

P P I：

( - / - ) マウスは、その ( + / + ) 同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、p p 8、p p 1 2 および p p 2 0 中、阻害の減少を示し、変異型における感覚運動ゲーティング / 注意の障害を示した。

## 【 1 4 4 2 】

4 8 . 3 3 . D N A 9 2 2 6 4 - 2 6 1 6 ( U N Q 1 9 3 2 ) 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、P R O 4 4 0 7 ポリペプチドをコードする遺伝子 ( D N A 9 2 2 6 4 - 2 6 1 6 と命名 ) ( U N Q 1 9 3 2 ) を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

N M \_ 1 7 5 4 0 8 A C C E S S I O N : N M \_ 1 7 5 4 0 8 N I D :  
g i 3 1 3 4 1 8 2 2 r e f N M \_ 1 7 5 4 0 8 . 2 ムス・ムスクルス R I K E N  
c D N A A 9 3 0 0 2 7 H 0 6 遺伝子 ( A 9 3 0 0 2 7 H 0 6 R i k ) ; 参照タンパク質：

Q 8 C 6 T 0 A C C E S S I O N : Q 8 C 6 T 0 N I D :  
ムス・ムスクルス ( マウス ) 。

仮説タンパク質；参照ヒト遺伝子配列：

N M \_ 1 5 3 3 4 5 A C C E S S I O N : N M \_ 1 5 3 3 4 5 N I D :  
g i 2 3 5 0 3 2 7 0 r e f N M \_ 1 5 3 3 4 5 . 1 ホモ・サピエンス仮想タンパク質 F L J 9 0 5 8 6 ( F L J 9 0 5 8 6 ) ; ヒトタンパク質配列は、次の参照に対応する：

Q 8 I V 3 1 A C C E S S I O N : Q 8 I V 3 1 N I D :  
ホモ・サピエンス ( ヒト ) 。

仮説タンパク質。

## 【 1 4 4 3 】

目的のマウス遺伝子は、ヒト仮説タンパク質 F L J 9 0 5 8 6 のオルソログである R I K E N c D N A A 9 3 0 0 2 7 H 0 6 遺伝子である。

40

## 【 1 4 4 4 】

仮想タンパク質 F L J 9 0 5 8 6 は、弱い推定シグナルペプチドおよび重複膜貫通セグメントを含む。該仮想タンパク質は、原形質膜から分泌され得るか、または原形質膜上に位置し得る ( C l a r k e t a l . , G e n o m e R e s 1 3 ( 1 0 ) : 2 2 6 5 - 7 0 ( 2 0 0 3 ) ) 。

## 【 1 4 4 5 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。ま

50

れに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

【 1 4 4 6 】

【 化 5 5 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	26	40	13	79
予測値	19.75	39.5	19.75	79

カイ二乗値 = 4 . 2 1 有意性 = 0 . 1 2 1 8 4 5 6 7 ( h o m / n ) = 0 . 2 1 平均同腹  
仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え（標準）

説明：

コードエキソン 1 および 2 を標的化した（ N C B I アクセッション B Y 0 3 2 7 9 3 および N M \_ 1 7 5 4 0 8 . 2 ）。

1 . 野生型発現パネル：R T - P C R によって試験された、1 3 のすべての成体組織サンプル（脊髄、骨格筋、脂肪以外）において標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現：Q C 画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【 1 4 4 7 】

4 8 . 3 3 . 1 . 表現型解析（破壊遺伝子：D N A 9 2 2 6 4 - 2 6 1 6 ( U N Q 1 9 3 2 )

（ a ）全体的な表現型の概要：

ヒト仮想タンパク質 F L J 9 0 5 8 6 のオルソログをコードする遺伝子の変異により、平均血清グルコースレベルの増加を示すヘテロ接合性（ + / - ）およびホモ接合性（ - / - ）マウスの両方がもたらされた。また、変異型マウスにおいて免疫学的異常も観察され、腹腔洗浄液中では B 細胞サブセットのパーセンテージが減少した。

遺伝子破壊をサザンブロットによって確認した。

【 1 4 4 8 】

（ b ）免疫学表現型解析

免疫関連疾患および炎症性疾患は、正常な生理機能において、傷害または損傷に応答し、傷害または損傷からの修復を開始し、そして外来生物体に対する先天的および後天的な防御を開始することによって重大な意味を有する、かなり複雑で、複雑に相互連結していることが多い生物学的経路の症状または結果である。これらの正常な生理学的経路が、応答の強度に直接関連してか、異常な制御もしくは過度の刺激の結果としてか、自己に対する応答としてか、またはこれらの組み合わせのいずれかとして、さらなる傷害または損傷を引き起こすときに、疾患または病態が生じる。

【 1 4 4 9 】

これらの疾患の起源が、多段階の経路および複数の異なる生物学的系 / 経路に関連することが多いが、これらの経路の 1 個以上の重大な点における介入は、寛解性または治療的な効果を有し得る。治療的な介入は、有害なプロセス / 経路の拮抗作用または有益なプロセス / 経路の刺激のいずれかによって生じ得る。

【 1 4 5 0 】

T リンパ球（ T 細胞 ）は、哺乳動物の免疫応答の重要な成分である。 T 細胞は、主要組織適合遺伝子複合体（ M H C ）内の遺伝子によってコードされる自己の分子に関連する抗原を認識する。この抗原は、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上に M H C 分子とともに提示され得る。 T 細胞系は、宿主哺乳動物に対して健康への脅威をもたらすこれらの改変細胞を排除する。 T 細胞としては、ヘルパー T 細胞および細胞傷害性 T 細胞が挙げられる。ヘルパー T 細胞は、抗原提示細胞上の抗原 - M H C 複合体を

10

20

30

40

50

認識した後、広範囲に増殖する。ヘルパーT細胞はまた、種々のサイトカイン、すなわち、リンフォカインを分泌する。リンフォカインは、B細胞、細胞傷害性T細胞および免疫応答に関与する他の種々の細胞の活性化において中心的な役割を果たす。

#### 【1451】

多くの免疫応答において、炎症細胞は、損傷または感染の部位を浸潤する。遊走細胞は、罹患組織の組織学的検査によって決定され得るような、好中球、好酸球、単球またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

多くの免疫関連疾患が知られており、広く研究されている。このような疾患としては、免疫媒介性炎症性疾患（例えば、関節リウマチ、免疫媒介性腎疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患（IBD）、乾癬および喘息）、非免疫媒介性炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全疾患、新形成および移植片拒絶などが挙げられる。免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を同定した。

#### 【1452】

免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を本明細書中で同定した。免疫関連疾患は、1つの場合において、免疫応答を抑制することによって処置され得る。免疫刺激性活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫媒介性疾患および炎症性疾患の処置に有益であり得る。免疫応答を阻害する分子は、免疫応答を阻害するために（タンパク質を直接または抗体アゴニストの使用を介して）利用され得、その結果、免疫関連疾患を寛解させ得る。

#### 【1453】

以下の試験を実施した：

蛍光標識細胞分取（FACS）解析

手順：

CD4、CD8およびT細胞レセプターを含む、末梢血由来の免疫細胞組成物のFACS解析を実施して、Tリンパ球、Bリンパ球に対するCD19、白血球マーカーとしてのCD45およびナチュラルキラー細胞に対するpan-NKを評価した。FACS解析は、2匹の野生型および6匹のホモ接合性マウスにおいて実施し、胸腺、脾臓、骨髄およびリンパ節由来の細胞を含んだ。

#### 【1454】

これらの研究において、解析される細胞を、胸腺、末梢血、脾臓、骨髄およびリンパ節から単離した。単核細胞集団内のCD4およびCD8陽性のT細胞、B細胞、NK細胞および単球の相対的比率を決定するようにフローサイトメトリーを設定した。Becton-Dickinson FACSCalibur 3-レーザーFACS装置を使用して、免疫状態を評価した。表現型アッセイおよびスクリーニングのために、この装置は、CD4+/CD8+比に加えて、CD4+/CD8-、CD8+/CD4-、NK、B細胞および単球の数を記録する。6つの系統特異的抗体のパネル：CD45 PerCP、抗TCRβ APC、CD4 PE、CD8 FITC、pan-NK PEおよびCD19 FITCを用いて、各マウス由来の溶解末梢血の単一サンプルを染色することによって単核細胞プロファイルを得る。2種類のFITC標識抗体およびPE標識抗体は、相互に排他的な細胞タイプを染色する。CellQuestソフトウェアを備えたBecton-Dickinson FACSCaliburフローサイトメーターを使用してサンプルを解析する。

#### 【1455】

結果：

組織特異的FACS-プロジェクト：

（-/-）マウスは、その（+/+）同腹仔のものと比較した場合、腹腔洗浄液中においてB220 Med CD23-細胞のパーセンテージの減少を示した。

#### 【1456】



これらの結果は、該ノックアウトマウスがB細胞サブセットの減少を示したことを示す。  
したがって、変異型ホモ接合性マウスは、B細胞前駆細胞レベルの減少と関連する免疫学的異常を示した。

#### 【1457】

これらの結果は、ノックアウト(-/-)マウスがその野生型(+/-)同腹仔と比較した場合、免疫学的異常を示すことを示す。PRO4407ポリペプチドのアンタゴニスト(インヒビター)は、この表現型を模倣することが予測され得る。  
PRO4407ポリペプチドまたはそのアゴニストは、B細胞発達の陽性調節因子としての機能を果たすようであり、B細胞の発達または成熟に有用であり得、これは、次いで、速やかな免疫応答に関与し得る。

10

#### 【1458】

(c)表現型解析：代謝 - 血液化学

代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、血糖測定を含む。マウスにおける血液化学試験を実施するためにCOBAS Integra 400(mfr:Roche)を使用した。代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。

#### 【1459】

結果：

血液化学：

20

雌ヘテロ接合性(+/-)およびホモ接合性(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均血清グルコースレベルの増加(同腹仔野生型マウスより約2SD上)を示した。したがって、ヘテロ接合性およびホモ接合性(-/-)マウスの両方は、異常なグルコース代謝に関連する負の表現型を示した。  
しかしながら、雌血清インスリンおよび尿中グルコースレベルは正常であった。

#### 【1460】

48.34.DNA93011-2637(UNQ1942)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO4425ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA93011-2637と命名)(UNQ1942)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

30

XM\_132070 ACCESSION: XM\_132070 NID:

gi\_51710957 ref XM\_132070.3 PREDICTED:

ムス・ムスクルスRIKEN cDNA4930443F05遺伝子(4930443F05Rik); 参照タンパク質:

サイトカイン様タンパク質C17前駆体(UNQ1942/PRO4425)[ムス・ムスクルス]と類似するXP\_132070; 参照ヒト遺伝子配列:

NM\_018659ホモ・サピエンスサイトカイン様タンパク質C17(C17); ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する:

40

Q9NRR1 ACCESSION: Q9NRR1 NID:

ホモ・サピエンス(ヒト)。

サイトカイン様タンパク質C17前駆体(UNQ1942/PRO4425)。

#### 【1461】

目的のマウス遺伝子は、ヒトC17(サイトカイン様タンパク質C17)のオルソログであるRIKEN cDNA 4930443F05遺伝子である。別名としては、Gm147が挙げられる。

#### 【1462】

C17は、CD34単核幹細胞によって分泌されるタンパク質であり、おそらくシグナル伝達リガンドとしての機能を果たしている。

50

該タンパク質は、シグナルペプチドを含み、一般的に、他のサイトカインと構造的類似性を共有している。

C 1 7 の発現は、幹細胞を維持するサイトカインによって上方調節され、幹細胞の分化を刺激する造血系コロニー刺激因子によって下方調節される ( L i u e t a l . , G e n o m i c s 6 5 ( 3 ) : 2 8 3 - 9 2 ( 2 0 0 0 ) ) 。

C 1 7 は、造血または免疫においてある役割を果たしている可能性がある。

#### 【 1 4 6 3 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

#### 【 1 4 6 4 】

##### 【 化 5 6 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	19	47	22	88
予測値	22	44	22	88

カイ二乗値 = 3 . 4 3 有意性 = 0 . 1 7 9 9 6 3 7 1 ( h o m / n ) = 0 . 2 3 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え ( 標準

説明：コードエクソン 2 から 4 をターゲティングした ( N C B I アクセッション B C 0 6 3 1 0 3 . 1 ) 。

1 . 野生型発現パネル：R T - P C R によって試験された、胚性幹細胞 ( E S ) 細胞および骨格筋以外の 1 3 のすべての成体組織サンプルにおいて標的遺伝子の発現を検出した

2 . Q C 発現：Q C 画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【 1 4 6 5 】

4 8 . 3 4 . 1 . 表現型解析 ( 破壊遺伝子：D N A 9 3 0 1 1 - 2 6 3 7 ( U N Q 1 9 4 2 )

( a ) 全体的な表現型の概要：

ヒトサイトカイン様タンパク質 C 1 7 ( C 1 7 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、( - / - ) マウスで、末梢血中の C D 4 細胞のパーセンテージの増加、胸腺における T C R <sup>+</sup> の増加、リンパ節における C D 1 1 b + C D 1 1 c + の増加およびナチュラルキラー細胞の増加、ならびに腹腔洗浄液中の C D 1 1 7 + 細胞のパーセンテージの増加 がもたらされた。

I g G 2 a の減少および I g A 平均血清レベルの増加もまた ( - / - ) マウスにおいて示された。

( - / - ) マウスはまた、網膜の動脈対静脈比の増加を示した。

変異型 ( - / - ) マウスはまた、小柱数および連結密度の増加を示した。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

#### 【 1 4 6 6 】

( b ) 発現

C 1 7 は、I S H 試験によって示されるように、動脈内皮において発現される。

C h r 4 付近は、骨発達に關与する遺伝子を多く含む。

[ プロトコルの実施例 5 7 参照 ]

## (c) 免疫学表現型解析

免疫関連疾患および炎症性疾患は、正常な生理機能において、傷害または損傷に応答し、傷害または損傷からの修復を開始し、そして外来生物体に対する先天的および後天的な防御を開始することによって重大な意味を有する、かなり複雑で、複雑に相互連結していることが多い生物学的経路の症状または結果である。これらの正常な生理学的経路が、応答の強度に直接関連してか、異常な制御もしくは過度の刺激の結果としてか、自己に対する応答としてか、またはこれらの組み合わせのいずれかとして、さらなる傷害または損傷を引き起こすときに、疾患または病態が生じる。

## 【1467】

これらの疾患の起源が、多段階の経路および複数の異なる生物学的系/経路に関連することが多いが、これらの経路の1個以上の重大な点における介入は、寛解性または治療的な効果を有し得る。治療的な介入は、有害なプロセス/経路の拮抗作用または有益なプロセス/経路の刺激のいずれかによって生じ得る。

## 【1468】

Tリンパ球(T細胞)は、哺乳動物の免疫応答の重要な成分である。T細胞は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)内の遺伝子によってコードされる自己の分子に関連する抗原を認識する。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上の抗原-MHC複合体を認識した後、広範囲に増殖する。ヘルパーT細胞はまた、種々のサイトカイン、すなわち、リンフォカインを分泌する。リンフォカインは、B細胞、細胞傷害性T細胞および免疫応答に關与する他の種々の細胞の活性化において中心的な役割を果たす。

## 【1469】

多くの免疫応答において、炎症細胞は、損傷または感染の部位を浸潤する。遊走細胞は、罹患組織の組織学的検査によって決定され得るような、好中球、好酸球、単球またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

多くの免疫関連疾患が知られており、広く研究されている。このような疾患としては、免疫媒介性炎症性疾患(例えば、関節リウマチ、免疫媒介性腎疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患(IBD)、乾癬および喘息)、非免疫媒介性炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全疾患、新形成および移植片拒絶などが挙げられる。免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を同定した。

## 【1470】

免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を本明細書中で同定した。免疫関連疾患は、1つの場合において、免疫応答を抑制することによって処置され得る。免疫刺激性活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫媒介性疾患および炎症性疾患の処置に有益であり得る。免疫応答を阻害する分子は、免疫応答を阻害するために(タンパク質を直接または抗体アゴニストの使用を介して)利用され得、その結果、免疫関連疾患を寛解させ得る。

## 【1471】

以下の試験を実施した：

蛍光標識細胞分取(FACS)解析

手順：

CD4、CD8およびT細胞レセプターを含む、末梢血由来の免疫細胞組成物のFACS解析を実施して、Tリンパ球、Bリンパ球に対するCD19、白血球マーカーとしてのCD45およびナチュラルキラー細胞に対するpan NKを評価した。FACS解析は、2匹の野生型および6匹のホモ接合性マウスにおいて実施し、胸腺、脾臓、骨髓およびリンパ節由来の細胞を含んだ。

## 【1472】

これらの研究において、解析される細胞を、胸腺、末梢血、脾臓、骨髓およびリンパ節から単離した。単核細胞集団内のCD4およびCD8陽性のT細胞、B細胞、NK細胞お

10

20

30

40

50

よび単球の相対的比率を決定するようにフローサイトメトリーを設定した。Becton-Dickinson FACS Calibur 3-レーザーFACS装置を使用して、免疫状態を評価した。表現型アッセイおよびスクリーニングのために、この装置は、CD4+/CD8+比に加えて、CD4+/CD8-、CD8+/CD4-、NK、B細胞および単球の数を記録する。6つの系統特異的抗体のパネル：CD45 PerCP、抗TCRb APC、CD4 PE、CD8 FITC、pan-NK PEおよびCD19 FITCを用いて、各マウス由来の溶解末梢血の単一サンプルを染色することによって単核細胞プロファイルを得た。2種類のFITC標識抗体およびPE標識抗体は、相互に排他的な細胞タイプを染色する。Cell Questソフトウェアを備えたBecton Dickinson FACS Caliburフローサイトメーターを使用してサンプルを解析した。

10

#### 【1473】

結果：

FACS3：

(-/-)マウスは、その(+/+)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、CD4細胞の平均パーセンテージの増加を特徴とする末梢血中の白血球サブセットの分布の変化を示した。

#### 【1474】

組織特異的FACS-プロジェクト：

(-/-)マウスは、その(+/+)同腹仔のものと比較した場合、胸腺におけるTCR+細胞のパーセンテージの増加、リンパ節におけるCD11b+ CD11c+およびNK細胞のパーセンテージの増加、ならびに腹腔洗浄液中のCD117+細胞のパーセンテージの増加を示した。

20

#### 【1475】

したがって、PRO4425ポリペプチドをコードする遺伝子をノックアウトすることにより、T細胞集団の増加が引き起こされる。これらの観察結果から、PRO4425ポリペプチドまたはPRO4425をコードする遺伝子が、T細胞増殖の負の制御因子として作用するようであるしたがって、PRO4425ポリペプチドまたはその作用剤は、自己免疫疾患（例えば、関節リウマチ患者）などで起こるT細胞増殖が顕著であるような場合には、T細胞増殖の負の調節因子として有用であろう。さらに、PRO4425ポリペプチドは、皮膚移植片拒絶の防止で特に有用であろう。

30

#### 【1476】

さらに、FACS結果から、ホモ接合性変異マウスにおいてナチュラルキラー細胞の平均パーセンテージが増加したことが示される。ナチュラルキラー細胞は、ウイルスの免疫および腫瘍に対する防御に関係するので、これらの細胞は、ウイルス感染に対する防御の第一線である。ナチュラルキラー細胞すなわちNK細胞は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害におけるエフェクターとして作用し、それらは、事前の免疫または活性化の必要なしに、特定のリンパ系腫瘍細胞株をインビトロにおいて殺滅する能力によって同定されてきた。

したがって、PRO4425ポリペプチドは、NK生成の負の調節因子としての機能を果たす。

40

#### 【1477】

血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイ：

Cytometric Bead Array (CBA)キットを使用して、血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイを行う。このアッセイを使用して、1つのサンプル中のマウスモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖のアイソタイプを迅速に同定する。示される値は、「相対蛍光単位」であり、軽鎖の検出に基づく。6未満のいかなる値も有意ではない。

#### 【1478】

結果：

50

血清 I m m . 2 :

( - / - ) マウスは、その ( + / + ) 同腹仔のもの、当該実行プロジェクト内の ( + / + ) マウスおよび歴史的中央値と比較した場合、平均血清 I g G 2 a レベルの低下および平均血清 I g A レベルのわずかな増加を示した。

【 1 4 7 9 】

血清免疫グロブリンアイソタイピングアッセイにより、成体ホモ接合体が、血清 I g G 2 a レベルの低下を示したことが明らかになった。したがって、ホモ接合体は、( + / + ) 同腹仔と比較して異常に低い血清中免疫グロブリンを示した。したがって、P R O 4 4 2 5 ポリペプチドをコードする遺伝子は、免疫グロブリン (またはガンマグロブリン) を生成するのに必須である。別で、I g G 2 a 免疫グロブリンは、中和作用を有し、それほどではないにせよ、補体系の活性化に重要である。

10

【 1 4 8 0 】

( d ) 心血管表現型解析

心血管生物学領域では、心血管障害、内皮障害、または血管障害の治療のための潜在的標的を同定するために表現型試験を行った。1つのこのような表現型試験には、種々の眼の異常を合図するための網膜動静脈比 ( A / V 比 ) を決定するための眼底撮影法および血管造影法が含まれた。異常な A / V 比は、高血圧の血管疾患 (および高血圧を引き起こす任意の疾患 (例えば、アテローム性動脈硬化症))、糖尿病、または眼科疾患に対応する他の眼疾患に関連し得るこのような全身疾患または障害を示す。このような眼の異常には、以下が含まれ得るがこれらに限定されない：網膜の異常は、以下である：網膜の形成異常、種々の網膜症、再狭窄、網膜動脈閉鎖又は閉塞；網膜血管系の二次的萎縮を生じる網膜変性、色素性網膜炎、黄斑変性、シュタルガルト病、先天性停在夜盲症、コロイデレミア、回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ - マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー - ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群 ( A l s t o m ' s s y n d r o m e )、コケーン症候群、先天性脊骨端形成異常 ( d y s p l a i s a s p o n d y l o e p i p h y s a r i a c o n g e n t i a )、フリン - エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス - シェーンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンブルヒ症候群、アラジール症候群、筋緊張性ジストロフィー、オリーブ橋小脳萎縮、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、バッセン - コルンツヴァイク症候群、無リポ蛋白血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症、またはマンノシドーシス。

20

30

【 1 4 8 1 】

手順：4匹の野生型、4匹のヘテロ接合体、および8匹のホモ接合体のコホートを、このアッセイで試験した。Hawes and coauthors (Hawes et al., 1999 Molecular Vision 1999; 5: 22) にしたがって修正したKowa Genesis小動物用眼底カメラを使用して、意識のある動物に対して眼底撮影法を行った。フルオレセインの腹腔内注射によって、各試験についての直接照明眼底画像および蛍光血管造影図を取得した。直接的な眼科的变化に加えて、この試験は、糖尿病およびアテローム性動脈硬化症などの全身疾患または他の網膜異常に関連した網膜の変化を検出することができる。通常の光線下の眼底写真を得た。血管造影により、眼の動脈および静脈を試験することが可能であった。さらに、眼の動脈 - 静脈 ( A / V ) 比を決定した。

40

【 1 4 8 2 】

上記プロトコルを使用して、作製したF2野生型、ヘテロ接合体、およびホモ接合体変異子孫に対して眼科学分析を行った。詳細には、Kowa COMIT + ソフトウェアを使用した眼底画像に従ってA / V 比を測定し、計算した。この試験は、瞳孔散大によってカラー写真を撮影する。この画像は、多くの疾患の検出および分類に役立つ。動脈 - 静脈

50

比 (A/V) は、静脈の直径に対する動脈の直径の比である (血管の分岐前に測定する)。多くの疾患 (すなわち、糖尿病、心血管障害、乳頭浮腫、視神経萎縮、他の眼の異常 (網膜変性 (色素性網膜炎として公知) など)、網膜の形成異常、視覚問題、または失明) がこの比に影響を及ぼす。したがって、野生型 (+/+ ) 同腹仔と比較してホモ接合体 (-/- ) およびヘテロ接合体 (+/- ) 変異子孫の動脈 - 静脈比が増加する表現型所見は、このような病的状態を示すであろう。

#### 【1483】

結果：

眼底：

(-/- ) マウスは、その (+/+ ) 同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、網膜の平均動脈対静脈比の増加を示した。

10

#### 【1484】

この試験では、(-/- ) は、その (+/+ ) 同腹仔と比較した場合、平均動脈対静脈 (A/V) 比の増加を示し、網膜の変性が示唆された。

まとめると、PRO4425 ポリペプチドをコードすると同定された遺伝子をノックアウトすることによって、ホモ接合性変異体の子孫は、網膜変性に関連する表現型を示す。そのような検出された網膜の変化は、高血圧症 (および高血圧症、例えば、アテローム性動脈硬化症を引き起こす任意の疾患)、網膜変性症などの眼科学的障害に対応する他の眼球の疾患の血管系の疾患に関連し得る心血管全身疾患または障害に最もよく関連する。したがって、PRO4425 コード遺伝子のアンタゴニスト (インヒビター) は、類似の病理学的な網膜の変化に導き得る一方で、アゴニストは、高血圧症、アテローム性動脈硬化症または網膜変性症およびこの状態 (上で同定されたように) に関連する疾患を含む他の眼科学的障害の処置における治療薬として有用であり得る。

20

#### 【1485】

(e) 骨代謝：放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのDEXA
- ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCT

30

#### 【1486】

Dexa 解析 - 試験の説明：

手順：4 匹の野生型マウス、4 匹のヘテロ接合性マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギー X 線吸収測定法 (DEXA) を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量 (BMC)、BMC/LBM 比、容量測定による骨塩密度 (vBMD)、全身 BMD、大腿骨 BMD および椎骨 BMD を測定した。

40

#### 【1487】

Avertin (1.25% 2, 2, 2, -トリプロモエタノール, 20 mL/kg 体重) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスを DEXA スキャンのために PIXImus TM デンシトメーター (Lunar Inc.) のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImus ソフトウェアを使用して、目的の領域 (ROI) [すなわち、全身、椎骨および両大腿骨] の骨塩密度 (BMD) および脂肪組成物 (% 脂肪) および総組織質量 (TTM) を測定した。

#### 【1488】

骨マイクロCT 解析：

手順：マイクロCT を使用して、非常に感度の高い BMD の測定を行った。1 つの椎骨および 1 つの大腿骨を、4 匹の野生型マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートが

50

ら取り出した。腰部の5つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。 $\mu$ CT40スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、16マイクロメートルの解像度で第5腰部椎骨(LV5)において解析し、皮質骨パラメータを、20マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

【1489】

結果：

マイクロCT：

雄(-/-)マウスは、小柱数および連結密度の増加を示した。

10

【1490】

まとめると、(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔と比較した場合、骨梁の骨塩密度の増加を示した。これらの結果から、ノックアウト変異表現型が、大理石骨病のような骨の異常に関連し得ることが示唆される。大理石骨病は、骨の異常な肥厚および硬化ならびに骨の異常な脆弱性を特徴とする状態である。そのため、PRO4425ポリペプチドまたはそのアゴニストは、大理石骨病またはその他の骨関連障害の処置に有益であり得る。一方、PRO4425ポリペプチドのインヒビターまたはアンタゴニストは、骨の治癒に有用であり得る。

【1491】

48.35.DNA59770-2652(UNQ2426)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

20

これらのノックアウト実験において、PRO4985ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA59770-2652と命名)(UNQ2426)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

XM\_203978 PREDICTED：

ムス・ムスクルスRIKEN cDNA5330417C22遺伝子(5330417C22Rik)；参照タンパク質：

XP\_203978 RIKEN cDNA 5330417C22遺伝子[ムス・ムスクルス]；参照ヒト遺伝子配列：

30

NM\_020775ホモ・サピエンスmaba1(KIAA1324)；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

NP\_065826 maba1 [ホモ・サピエンス]。

【1492】

目的のマウス遺伝子は、ヒトmaba1のオルソログであるRIKEN cDNA5330417C22遺伝子である。

別名としては、KIAA1324およびRP11-352P4.1が挙げられる。

【1493】

Maba1は、シグナルペプチド、ケラチン/高硫黄B2タンパク質(B2)ドメインを含む大きな細胞外領域、膜貫通セグメント、および短い細胞質C末端からなる推定内在性原形質膜タンパク質である。B2ドメインを有するタンパク質としては、タンパク質のケラチン/高硫黄B2ファミリーが挙げられ、これは、分化中の有毛細胞によって合成される有毛繊維の成分としての機能を果たす(Mitsui et al., Gene 208(2):123-9(1998)；Rogers et al., J Biol Chem 276(22):19440-51(2001)；Shibuya et al., Genomics 83(4):679-93(2004))。

40

【1494】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹(ES)細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精する

50

ことにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

【1495】

【化57】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	18	43	30	91
予測値	22.75	45.5	22.75	91

10

カイ二乗値 = 0.52 有意性 = 0.7710516 (hom/n) = 0.26 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え（標準）

説明：コードエクソン1をターゲティングした(NCBIアクセッションXM\_203978.4)。

1. 野生型発現パネル：

標的遺伝子の発現は、骨格筋、骨、心臓、脂肪、血液、心臓の帯状組織、大動脈樹状部、MG5週バージン(virgin)、MG成熟バージン、出産(partum)(授乳)後第3日のMG、離乳後第3日(退縮早期)のMG、および離乳後第7日(退縮後期)のMGを除くRT-PCRによって試験した26の成体組織試料すべてにおいて検出された。

20

2. QC発現：QC画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【1496】

48.35.1.DNA59770-2652(UNQ2426)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒトmaba1のオルソログをコードする遺伝子の変異により、雄(-/-)マウスにおいて精子形成の欠陥がもたらされた。顕微解析により、雄ホモ接合性変異型において臨床的に認められた不妊症と一致するホモ接合性変異型マウスの精巣における精子形成の欠陥および精液過少症ならび副睾丸(epididymus)における精子の欠陥が明らかになった。(-/-)マウスはまた、体脂肪の減少を示した。

30

標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【1497】

(b) 病理学

顕微鏡的：

雄(-/-)マウスは、精巣における中等度のびまん性の精子形成の欠陥および精液過少症ならびに副睾丸における精子の欠陥を示した。

40

雄(-/-)マウスは、精子形成における後期の欠陥を示し、円形(round)精子細胞段階を超える発達は行なわれなかった。

精母細胞は、大きな円形の頭部および大きな細胞質小滴を示した。

遺伝子発現：LacZ活性は、免疫組織化学によって組織パネルにおいて検出されなかった。

【1498】

(c) 骨診断

生殖能力：

雄(-/-)マウスでは、雌(+/-)マウスとの交配60日後および4回の交配後、子供は生まれなかった。該マウスは健常であるようであったが、腹圧による陰茎勃起は誘導

50



され得なかった。

#### 【1499】

骨代謝：放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのDEXA
- ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCTを含んだ。

10

#### 【1500】

Dexa解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量(BMC)、BMC/LBM比、容量測定による骨塩密度(vBMD)、全身BMD、大腿骨BMDおよび椎骨BMDを測定した。

#### 【1501】

Avertin(1.25%2, 2, 2, -トリプロモエタノール, 20mL/kg体重)をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンスitomーター(Lunar Inc.)のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域(ROI)[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度(BMD)および脂肪組成物(%脂肪)および総組織質量(TTM)を測定した。

20

#### 【1502】

結果：

Dexa：雄(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較して、平均総脂肪パーセントおよび総脂肪質量の減少を示した。

#### 【1503】

PRO4985ポリペプチドをコードする遺伝子が欠失した変異型(-/-)マウスは、組織消耗性疾患(総体脂肪(%))および脂肪質量(g)の減少)または異常な脂質代謝と一致する表現型を示す。したがって、PRO4985ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニストまたはインヒビターは、これらの異常な代謝関連作用および発達関連作用を模倣し得る。

30

他方において、PRO4985ポリペプチドまたはそのアゴニストは、かかる代謝障害の予防および/または処置ならびに正常な雄の生殖能力の発達に有用であり得る。

#### 【1504】

48.36.DNA80135-2655(UNQ2429)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO4989ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA80135-2655と命名)(UNQ2429)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

40

NM\_153542 ACCESSION: NM\_153542 NID: gi\_23956307 ref NM\_153542.1 ムス・ムスクルス仮想タンパク質MGC25719(MGC25719)；参照タンパク質：Q8CI70 ACCESSION: Q8CI70 NID: ムス・ムスクルス(マウス)。

ロイシン高含有反復配列含有20；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_018205 ACCESSION: NM\_018205 NID:

50

g i 8 9 2 2 6 4 3 r e f N M \_ 0 1 8 2 0 5 . 1 ホモ・サピエンス仮想タンパク質 F L J 1 0 7 5 1 ( F L J 1 0 7 5 1 ) ; ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する :

Q 8 T C A 0 A C C E S S I O N : Q 8 T C A 0 N I D :  
ホモ・サピエンス ( ヒト ) 。

仮想タンパク質 F L J 3 7 4 1 5 。

#### 【 1 5 0 5 】

目的のマウス遺伝子は、ヒト L R R C 2 0 のオルソログである L r r c 2 0 ( 2 0 を含むロイシンリッチ反復 ) である。

別名としては、M G C 2 5 7 1 9 、 c D N A 配列 B C 0 3 6 3 0 4 、 F L J 1 0 7 5 1 、 および F L J 1 0 8 4 4 が挙げられる。

#### 【 1 5 0 6 】

L R R C 2 0 は、ロイシン高含有反復配列を含む 1 8 4 アミノ酸の推定細胞外タンパク質である ( C l a r k e t a l . , G e n o m e R e s 1 3 ( 1 0 ) : 2 2 6 5 - 7 0 ( 2 0 0 3 ) ) 。

#### 【 1 5 0 7 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

#### 【 1 5 0 8 】

##### 【 化 5 8 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	21	40	23	84
予測値	21	42	21	84

カイ二乗値 = 1 . 8 6 有意性 = 0 . 3 9 4 5 5 3 7 2 ( h o m / n ) = 0 . 2 6 平均同腹仔数 = 1 0

変異情報

変異型 : 相同組換え ( 標準 )

説明 : コードエクソン 1 をターゲティングした ( N C B I アクセスions N M \_ 1 5 3 5 4 2 . 1 ) 。

1 . 野生型発現パネル : R T - P C R によって試験された、13 のすべての成体組織サンプル ( 骨および脂肪以外 ) において標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現 : Q C 画像 : 標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【 1 5 0 9 】

4 8 . 3 6 . 1 . 表現型解析 ( 破壊遺伝子 : D N A 8 0 1 3 5 - 2 6 5 5 ( U N Q 2 4 2 9 )

( a ) 全体的な表現型の概要 :

ヒトロイシン高含有反復配列含有 2 0 ( L R R C 2 0 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、オープンフィールド試験の際に不安の減少を示す ( - / - ) マウスがもたらされた。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

#### 【 1 5 1 0 】

( b ) 表現型解析 : C N S / 神経学

神経学の分野において、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害を含む神経性障害および精神医学的障害の処置のためのインビボにおいて有効な標的の同定についての解析に本明細書中では注目した。神経障害は、「不安障害」として定義されるカテゴリーを含む。その「不安障害」としては、以下：軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、別段特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴うパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、I型またはII型の双極性障害、別段特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害にあってはまるることがあり、その人格障害としては、以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない。

10

20

30

40

50

#### 【1511】

手順：

行動スクリーニングを、4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性変異マウスおよび8匹のホモ接合性変異マウスのコホートにおいて実施した。

生存能低下のために、より早期の試験が必要とされない限り、すべての行動試験は、12～16週齢の間に実施した。これらの試験は、不安、活動性レベルおよび探索を計測するためのオープンフィールドを含んだ。

#### 【1512】

オープンフィールド試験：

公知の薬物のいくつかの標的は、オープンフィールド試験において表現型を示した。これらとしては、セロトニン (serotonin) トランスポーター、ドーパミントランスポーター (Girault et al., Nature, 1996 Feb 15; 379 (6566): 606-12) および GABA レセプター (Homann et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1997 Apr 15; 94 (8): 4143-8) のノックアウトを含む。自動化されたオープンフィールドアッセイをカスタマイズして、感情状態に関連する変化および学習に関する探索パターンを扱った。まず、フィールド (40 x 40 cm) をマウスに対して比較的大きくするように選択することによって探索に関連する自発運動の変化を取り上げるように設計した。さらに、4つの穴を床に設け、探索に特に関連する活動である鼻の突っ込みを可能にした。この試験に関連した感情状態を高めるためにいくつかの因子を設けた。オープンフィールド試験は、マウスが試験される最初の実験の手順であり、なされる測定は被験体のチャンバーとの最初の経験であった。さらに、オープンフィールドは明るく照らした。これらの因子のすべてによって、新しい開放性空間に関連する天然の不安が高められる。次いで、探索活動のパターンおよび程度ならびに特に中心からの全移動距離比は、不安または抑鬱症に対する罹りやすさに関する変化を識別することができる。3つの異なったレベルでの赤外線ビームを用いた大きな活動領域 (40 cm x 40 cm、Accuscan Instruments の Versamax 動物活動性モニターシステム) を用いて、直立、穴への突っ込みおよび自発運動を記録した。動物を中心に置き、その活動を20分間測定した。この試験のデータを4分間隔で5回分析した。全移動距離 (cm)、垂直移動回数 (直立)、穴突っ込み回数および中心からの全移動距離比を記録した。

#### 【1513】

マウスが新しい環境に対して正常な慣れ応答を示す傾向を、5回の間隔にわたるその水平自発運動の変化すべてを測定することにより評価する。経時的な活動性の変化のこの算定傾きは、絶対値ではなく正規化された全移動距離を使用して決定する。傾きは5回の間隔のそれぞれにおける正規化された活動を通しての回帰直線から決定する。正常な慣れは、負の傾きの値によって表される。

#### 【1514】

結果：

( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較して、オープンフィールド試験中の中心にいる時間の合計の中央値の増加を示したことから、変異体における不安様応答の低下が示唆される。

( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔と比較して、中心にいる時間の合計の中央値の増加を示したことから、変異体における不安様応答の低下が示唆される。したがって、ノックアウトマウスは、抑鬱症、全般性不安障害、認知障害、痛覚過敏ならびに感覚障害および / または双極性障害と一致する表現型を示した。したがって、PRO4989ポリペプチドおよびそのアゴニストは、抑鬱性障害に関連する症状の処置または寛解に有用であり得る。

10

【1515】

48,37, DNA92929-2534-1 (UNQ2456) 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO5737ポリペプチドをコードする遺伝子 (DNA92929-2534-1と命名) (UNQ2456) を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_153511 ACCESSION: NM\_153511 NID: gi\_23943829 ref NM\_153511.1 ムス・ムスクルスインターロイキン1ファミリー、構成員9 (IL1f9) ; 参照タンパク質：

20

Q8R460 ACCESSION: Q8R460 NID: ムス・ムスクルス (マウス)。インターロイキン1ファミリー構成員9 (IL-1F9) ; 参照ヒト遺伝子配列：

NM\_019618 ホモ・サピエンスインターロイキン1ファミリー、構成員9 (IL1F9) ; ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q9NZH8 ACCESSION: Q9NZH8 NID:

ホモ・サピエンス (ヒト)。

インターロイキン1ファミリー構成員9 (IL-1F9) (インターロイキン-1 ホモログ1) (IL-1H1) (インターロイキン-1 ) (IL-1 ) (IL-1 関連タンパク質2) (IL-1RP2)。

30

【1516】

目的のマウス遺伝子は、ヒトIL1F9のオルソログであるIL1f9 (インターロイキン1ファミリー、構成員9) である。別名としては、IL-1F9、IL1E、IL1H1、IL-1H1、IL1RP2、IL-1RP2、IL-1- 、IL-1 (EPSILON)、インターロイキン-1 、IL-1 関連タンパク質2、インターロイキン-1 ホモログ1、およびインターロイキン1 関連タンパク質2 が挙げられる。

【1517】

IL1F9は、核因子 Bを活性化する受容体IL1RL2のリガンドとしての機能を果たす分泌タンパク質である。

IL1F9は、さまざまな組織、例えば、皮膚、肺、胃および食道などに由来する上皮において発現され、腫瘍壊死因子- によって、およびケラチノサイトにおいてインターフェロン- によって誘導される。

40

【1518】

IL1F9は、おそらく、免疫機能および炎症においてある役割を果たしている (Debets et al., J Immunol 167(3):1440-6(2001) ; Kumar et al., J Biol Chem 275(14):10308-14(2000) ; Towne et al., J Biol Chem 279(14):13677-88(2004))。

【1519】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>

50

由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、 F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、 F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、 F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、 F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、 F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

【 1 5 2 0 】

【化 5 9】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	17	39	21	77
予測値	19.25	38.5	19.25	77

10

カイ二乗値 = 1 . 4 1 有意性 = 0 . 4 9 4 1 0 8 6 ( h o m / n ) = 0 . 2 8 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え ( 標準 )

説明：コードエクソン 1 から 3 をターゲティングした ( N C B I アクセス )

1 . 野生型発現パネル： R T - P C R によって試験された、 1 3 のすべての成体組織サンプルに ( 骨格筋および脂肪以外 ) おいて標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現： Q C 画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【 1 5 2 1 】

4 8 . 3 7 . 1 . 表現型解析 ( 破壊遺伝子： D N A 9 2 9 2 9 - 2 5 3 4 - 1 ( U N Q 2 4 5 6 )

( a ) 全体的な表現型の概要：

ヒトインターロイキン 1 ファミリー、構成員 9 ( I L 1 F 9 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、除脂肪体重の減少を示す変異型 ( - / - ) マウスがもたらされた。遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

30

【 1 5 2 2 】

( b ) 発現

U N Q 2 4 5 6 は、扁平上皮癌または異形成 ( 頭部および首部の ) ; 扁平上皮癌 ( 肺の ) ; ならびにアデノイド扁桃腺の過形成において上方調節される。 U N Q 2 4 5 6 はまた乾癬においても上方調節される。

[ プロトコルの実施例 5 4 および 5 5 参照 ]

( c ) 骨代謝および全身診断学 / 放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

40

・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するための D E X A

・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロ C T

を含んだ。

【 1 5 2 3 】

D e x a 解析 - 試験の説明：

手順： 4 匹の野生型マウス、 4 匹のヘテロ接合性マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギー X 線吸収測定法 ( D E X A ) を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量 ( B M C ) 、 B M C / L B M 比、容量測定による骨塩密度 ( v B M D ) 、全身 B M D 、大腿骨 B M D および椎骨 B

50

M Dを測定した。

#### 【1524】

A v e r t i n ( 1 . 2 5 % 2 , 2 , 2 , - トリプロモエタノール , 2 0 m L / k g 体重 ) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをD E X A スキャンのためにP I X I m u s T M デンシトメーター ( L u n a r I n c . ) のプラットフォーム上に腹臥位にした。L u n a r P I X I m u s ソフトウェアを使用して、目的の領域 ( R O I ) [ すなわち、全身、椎骨および両大腿骨 ] の骨塩密度 ( B M D ) および脂肪組成物 ( % 脂肪 ) および総組織質量 ( T T M ) を測定した。

#### 【1525】

骨マイクロCT解析：

手順：マイクロCTを使用して、非常に感度の高いB M Dの測定を行った。1つの椎骨および1つの大腿骨を、4匹の野生型マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートから取り出した。腰部の5つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。μ C T 4 0 スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、16マイクロメートルの解像度で第5腰部椎骨 ( L V 5 ) において解析し、皮質骨パラメータを、20マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

#### 【1526】

結果：

D e x a : 雄 ( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較して、平均除脂肪体重の減少を示した。

#### 【1527】

P R O 5 7 3 7 ポリペプチドをコードする遺伝子が欠失した変異型 ( - / - ) マウスは、組織消耗性疾患 ( 除脂肪体重の減少 ) と一致する表現型を示す。

したがって、P R O 5 7 3 7 ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニストまたはインヒビターは、これらの代謝関連作用を模倣し得る。他方で、P R O 5 7 3 7 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、悪液質または他の組織るいそう疾患などのそのような代謝障害の予防および / または処置に有用であり得る。

#### 【1528】

4 8 . 3 8 . D N A 1 0 8 9 1 2 - 2 6 8 0 ( U N Q 2 5 0 0 ) 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、P R O 5 8 0 0 ポリペプチドをコードする遺伝子 ( D N A 1 0 8 9 1 2 - 2 6 8 0 と命名 ) ( U N Q 2 5 0 0 ) を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

N M \_ 0 2 3 3 0 4 A C C E S S I O N : N M \_ 0 2 3 3 0 4 N I D :  
g i \_ 1 2 9 6 3 6 2 6 r e f N M \_ 0 2 3 3 0 4 . 1 ムス・ムスクルス線維芽細胞増殖因子22 ( F g f 2 2 ) ; 参照タンパク質：

Q 9 E S S 2 A C C E S S I O N : Q 9 E S S 2 N I D :  
ムス・ムスクルス ( マウス ) 。

F I B R O B L A S T G R O W T H F A C T O R - 2 2 P R E C U R S O R ( F G F - 2 2 ) ; 参照ヒト遺伝子配列：

N M \_ 0 2 0 6 3 7 A C C E S S I O N : N M \_ 0 2 0 6 3 7 N I D :  
g i \_ 1 0 1 9 0 6 7 1 r e f N M \_ 0 2 0 6 3 7 . 1 ホモ・サピエンス線維芽細胞増殖因子22 ( F G F 2 2 ) ; ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q 9 H C T 0 A C C E S S I O N : Q 9 H C T 0 N I D :  
ホモ・サピエンス ( ヒト ) 。

F I B R O B L A S T G R O W T H F A C T O R - 2 2 P R E C U R S O R ( F G F - 2 2 ) 。

## 【 1 5 2 9 】

目的のマウス遺伝子は、ヒト F G F 2 2 のオルソログである F g f 2 2 (線維芽細胞増殖因子 2 2) である。

別名としては、F G F - 2 2 および 2 2 1 0 4 1 4 E 0 6 R i k が挙げられる。

## 【 1 5 3 0 】

F G F 2 2 は、シグナル伝達リガンドとしての機能を果たす分泌タンパク質である。該タンパク質は、シグナルペプチドおよび線維芽細胞増殖因子 (F G F) ドメインからなり、F G F 受容体 2 と結合し得る (Umemori et al., Cell 118 (2): 257 - 70 (2004); Boilly et al., Cytokine Growth Factor Rev 11 (4): 295 - 302 (2000); Eriksson et al., Proc Natl Acad Sci U S A 88 (8): 3441 - 5 (1991); Murzin et al., J Mol Biol 223 (2): 531 - 43 (1992))。

F G F 2 2 は、皮膚上皮および毛嚢の内毛根鞘において発現され、ここでは、おそらく、毛髪の発達および皮膚の発達ならびに修復においてある役割を果たしている (Nakatake et al., Biochim Biophys Acta 1517 (3): 460 - 3 (2001); Beyer et al., Exp Cell Res 287 (2): 228 - 36 (2003); Wilkie et al., Curr Biol 5 (5): 500 - 7 (1995))。

F G F 2 2 はまた舌および脳においても発現され、ここでは、前シナプス (presynaptic) 組織化においてある役割を果たしている (Umemori et al., Cell 118 (2): 257 - 70 (2004))。

## 【 1 5 3 1 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 (E S) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

## 【 1 5 3 2 】

## 【 化 6 0 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	19	34	16	69
予測値	17.25	34.5	17.25	69

カイ二乗値 = 2 . 3 1 有意性 = 0 . 3 1 5 0 5 7 5 5 (h o m / n) = 0 . 2 5 平均同腹仔数 = 1 0

変異情報

変異型：相同組換え (標準)

説明：コードエクソン 1 から 3 をターゲティングした (NCBI アクセッション NM\_\_023304.1)。

1 . 野生型発現パネル：R T - P C R によって試験された、1 3 のすべての成体組織サンプル (脳、脊髄、眼、および胸腺) において標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現：Q C 画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

4 8 . 3 8 . 1 . 表現型解析 (破壊遺伝子：DNA 1 0 8 9 1 2 - 2 6 8 0 (UNQ 2 5 0 0))

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒト線維芽細胞増殖因子 2 2 ( F G F 2 2 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、( - / - ) マウスの末梢血中のナチュラルキラー ( N K ) 細胞のパーセンテージの減少がもたらされた。

標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【 1 5 3 3 】

##### ( b ) 免疫学表現型解析

免疫関連疾患および炎症性疾患は、正常な生理機能において、傷害または損傷に応答し、傷害または損傷からの修復を開始し、そして外来生物体に対する先天的および後天的な防御を開始することによって重大な意味を有する、かなり複雑で、複雑に相互連結していることが多い生物学的経路の症状または結果である。これらの正常な生理学的経路が、応答の強度に直接関連してか、異常な制御もしくは過度の刺激の結果としてか、自己に対する応答としてか、またはこれらの組み合わせのいずれかとして、さらなる傷害または損傷を引き起こすときに、疾患または病態が生じる。

#### 【 1 5 3 4 】

これらの疾患の起源が、多段階の経路および複数の異なる生物学的系 / 経路に関連することが多いが、これらの経路の 1 個以上の重大な点における介入は、寛解性または治療的な効果を有し得る。治療的な介入は、有害なプロセス / 経路の拮抗作用または有益なプロセス / 経路の刺激のいずれかによって生じ得る。

#### 【 1 5 3 5 】

T リンパ球 ( T 細胞 ) は、哺乳動物の免疫応答の重要な成分である。T 細胞は、主要組織適合遺伝子複合体 ( M H C ) 内の遺伝子によってコードされる自己の分子に関連する抗原を認識する。この抗原は、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上に M H C 分子とともに提示され得る。T 細胞系は、宿主哺乳動物に対して健康への脅威をもたらすこれらの改変細胞を排除する。T 細胞としては、ヘルパー T 細胞および細胞傷害性 T 細胞が挙げられる。ヘルパー T 細胞は、抗原提示細胞上の抗原 - M H C 複合体を認識した後、広範囲に増殖する。ヘルパー T 細胞はまた、種々のサイトカイン、すなわち、リンフォカインを分泌する。リンフォカインは、B 細胞、細胞傷害性 T 細胞および免疫応答に関与する他の種々の細胞の活性化において中心的な役割を果たす。

#### 【 1 5 3 6 】

多くの免疫応答において、炎症細胞は、損傷または感染の部位を浸潤する。遊走細胞は、罹患組織の組織学的検査によって決定され得るような、好中球、好酸球、単球またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

多くの免疫関連疾患が知られており、広く研究されている。このような疾患としては、免疫媒介性炎症性疾患 ( 例えば、関節リウマチ、免疫媒介性腎疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患 ( I B D ) 、乾癬および喘息 ) 、非免疫媒介性炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全疾患、新形成および移植片拒絶などが挙げられる。免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を同定した。

#### 【 1 5 3 7 】

免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を本明細書中で同定した。免疫関連疾患は、1 つの場合において、免疫応答を抑制することによって処置され得る。免疫刺激性活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫媒介性疾患および炎症性疾患の処置に有益であり得る。免疫応答を阻害する分子は、免疫応答を阻害するために ( タンパク質を直接または抗体アゴニストの使用を介して ) 利用され得、その結果、免疫関連疾患を寛解させ得る。

#### 【 1 5 3 8 】

以下の試験を実施した：

蛍光標識細胞分取 ( F A C S ) 解析

手順：

10

20

30

40

50



C D 4、C D 8 および T 細胞レセプターを含む、末梢血由来の免疫細胞組成物の F A C S 解析を実施して、T リンパ球、B リンパ球に対する C D 1 9、白血球マーカーとしての C D 4 5 およびナチュラルキラー細胞に対する p a n N K を評価した。F A C S 解析は、2 匹の野生型および 6 匹のホモ接合性マウスにおいて実施し、胸腺、脾臓、骨髄およびリンパ節由来の細胞を含んだ。

#### 【 1 5 3 9 】

これらの研究において、解析される細胞を、胸腺、末梢血、脾臓、骨髄およびリンパ節から単離した。単核細胞集団内の C D 4 および C D 8 陽性の T 細胞、B 細胞、N K 細胞および単球の相対的比率を決定するようにフローサイトメトリーを設定した。B e c t o n - D i c k i n s o n F A C S C a l i b u r 3 - レーザー F A C S 装置を使用して、免疫状態を評価した。表現型アッセイおよびスクリーニングのために、この装置は、C D 4 + / C D 8 + 比に加えて、C D 4 + / C D 8 -、C D 8 + / C D 4 -、N K、B 細胞および単球の数を記録する。6 つの系統特異的抗体のパネル：C D 4 5 P e r C P、抗 T C R b A P C、C D 4 P E、C D 8 F I T C、p a n - N K P E および C D 1 9 F I T C を用いて、各マウス由来の溶解末梢血の単一サンプルを染色することによって単核細胞プロファイルを得た。2 種類の F I T C 標識抗体および P E 標識抗体は、相互に排他的な細胞タイプを染色する。C e l l Q u e s t ソフトウェアを備えた B e c t o n - D i c k i n s o n F A C S C a l i b u r フローサイトメーターを使用してサンプルを解析した。

#### 【 1 5 4 0 】

結果：

F A C S 3：

( - / - ) マウスは、その ( + / + ) 同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、ナチュラルキラー細胞の平均パーセンテージの減少を特徴とする末梢血中の白血球サブセットの分布の変化を示した。

#### 【 1 5 4 1 】

まとめると、F A C S の結果は、特に、P R O 5 8 0 0 ポリペプチドをコードする D N A 1 0 8 9 1 2 - 2 6 8 0 遺伝子のノックアウトと関連する負の表現型の指標であるナチュラルキラー細胞の平均パーセンテージの減少に鑑みると、ホモ接合性変異型マウスが免疫系の障害を有することを示す。ナチュラルキラー細胞は、ウイルスの免疫および腫瘍に対する防御に関係するので、これらの細胞は、ウイルス感染に対する防御の第一線である。ナチュラルキラー細胞すなわち N K 細胞は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害におけるエフェクターとして作用し、それらは、事前の免疫または活性化の必要なしに、特定のリンパ系腫瘍細胞株をインビトロにおいて殺滅する能力によって同定されてきた。しかしながら、宿主防御におけるこれらの公知の機能は、いくつかの細胞内の病原体、特にヘルペスウイルスの感染の初期においてである。したがって、P R O 5 8 0 0 ポリペプチドおよびその作用剤は、健康な免疫系に重要であり、且つ特にウイルス感染時の免疫系刺激で有用であろう。

#### 【 1 5 4 2 】

4 8 . 3 9 . D N A 1 0 0 2 7 6 - 2 6 8 4 ( U N Q 2 5 0 4 ) 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、P R O 5 9 9 3 ポリペプチドをコードする遺伝子 ( D N A 1 0 0 2 7 6 - 2 6 8 4 と命名 ) ( U N Q 2 5 0 4 ) を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

該変異型マウス遺伝子は以下のものに対応する。ヌクレオチド参照：A F 3 5 8 2 5 7

A C C E S S I O N : A F 3 5 8 2 5 7 N I D : 1 7 5 2 9 6 8 8 ムス・ムスクルスムス・ムスクルス C 2 1 o r f 6 3 タンパク質 ( C 2 1 o r f 6 3 ) ; 参照タンパク質：P 5 8 6 5 9 A C C E S S I O N : P 5 8 6 5 9 N I D :

ムス・ムスクルス ( マウス ) 。

PROTEIN C21ORF63 HOMOLOG PRECURSOR ; 参照ヒト遺伝子配列 :

NM\_058187 ホモ・サピエンス染色体21オープンリーディングフレーム63 (C21orf63) ; ヒトタンパク質配列は、以下に対応する : 参照 :

P58658 ACCESSION : P58658 NID :

ホモ・サピエンス (ヒト)。

PROTEIN C21ORF63 PRECURSOR (PROTEIN PRED34) (SUE21)。

#### 【1543】

目的のマウス遺伝子は、ヒトC21orf63 (染色体21オープンリーディングフレーム63) のオルソログであるRIKEN cDNA 4931408A02 (遺伝子である)。

別名としては、1700092M14Rik、B18、SUE21、およびPRED34が挙げられる。

#### 【1544】

C21orf63は、細胞接着分子またはシグナル伝達受容体として機能している可能性がある推定原形質膜タンパク質である (Clark et al., Genome Res 13 (10) : 2265 - 70 (2003)) 該タンパク質は、2つの細胞外ガラクトース結合レクチンドメイン (PFAMアクセッションPF02140)、膜貫通セグメント、および100アミノ酸細胞質セグメントを含む。

#### 【1545】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹 (ES) 細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

#### 【1546】

#### 【化61】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	17	45	24	86
予測値	21.5	43	21.5	86

カイ二乗値 = 1.16 有意性 = 0.5598984 (hom / n) = 0.27 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型 : 相同組換え (標準)

説明 : コードエクソン1をターゲティングした (NCBIアクセッションAF358257)。

1. 野生型発現パネル : RT-PCRによって試験された、胚性幹細胞 (ES) 細胞および13のすべての成体組織サンプル (骨格筋および骨以外) において標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現 : QC画像 : 標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【1547】

48.39.1. 表現型解析 (破壊遺伝子 : DNA100276 - 2684 (UNQ2504))

(a) 全体的な表現型の概要 :

10

20

30

40

50

UNQ2504、DNA100276 ヒト染色体21オープンリーディングフレーム63(C21orf63)のオルソログをコードする遺伝子の変異により、(-/-)マウスにおいて、瞳孔拡張薬である塩酸シクロペントレートに対する抵抗性もたらされた。ホモ接合性変異型マウスは、その野生型同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、眼底検査の際に使用された拡張薬に対する抵抗性を示した。また、変異型(-/-)マウスは、ホットプレート試験において、除脂肪体重の減少および応答潜時の減少を示した。標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【1548】

(b) 骨代謝および全身診断学 / 放射線表現型解析

10

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのDEXA
  - ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCT
- を含んだ。

#### 【1549】

Dexa解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量(BMC)、BMC/LBM比、容量測定による骨塩密度(vBMD)、全身BMD、大腿骨BMDおよび椎骨BMDを測定した。

20

#### 【1550】

Avertin(1.25%2,2,2-トリブromoエタノール,20mL/kg体重)をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンスitomーター(Lunar Inc.)のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域(ROI)[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度(BMD)および脂肪組成物(%脂肪)および総組織質量(TTM)を測定した。

30

#### 【1551】

結果：

Dexa：

(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均除脂肪体重の減少を示した。

#### 【1552】

PRO5993ポリペプチドをコードする遺伝子が欠失した変異型(-/-)マウスは、組織消耗性疾患(除脂肪体重の減少)と一致する表現型を示す。

したがって、PRO5993ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニストまたはインヒビターは、これらの代謝関連作用を模倣し得る。他方で、PRO5993ポリペプチドまたはそのアゴニストは、悪液質または他の組織るいそう疾患などのそのような代謝障害の予防および/または処置に有用であり得る。

40

#### 【1553】

(c) 心血管表現型解析

心血管生物学領域では、心血管障害、内皮障害、または血管障害の治療のための潜在的標的を同定するために表現型試験を行った。1つのこのような表現型試験には、種々の眼の異常を合図するための網膜動静脈比(A/V比)を決定するための眼底撮影法および血管造影法が含まれた。異常なA/V比は、高血圧の血管疾患(および高血圧を引き起こす任意の疾患(例えば、アテローム性動脈硬化症))、糖尿病、または眼科疾患に対応する

50

他の眼疾患に関連し得るこのような全身疾患または障害を示す。このような眼の異常には、以下が含まれ得るがこれらに限定されない：網膜の異常は、以下である：網膜の形成異常、種々の網膜症、再狭窄、網膜動脈閉鎖又は閉塞；網膜血管系の二次的萎縮を生じる網膜変性、色素性網膜炎、黄斑変性、シュタルガルト病、先天性停在夜盲症、コロイデレミア、回転状萎縮、レーバー先天性黒内障、網膜分離障害、ヴァーグナー症候群、アッシャー症候群、ツェルヴェーガー症候群、サルディーノ・マインザー症候群、シニアローケン症候群、バルデー・ビードル症候群、アルポート症候群、アルストレーム症候群 (Alstrom's syndrome)、コケーン症候群、先天性脊骨端形成異常 (dysplasia spondyloepiphysearia congenita)、フリン・エアード症候群、フリートライヒ運動失調、ハルグレン症候群、マーシャル症候群、アルベルス・シェーンベルク病、レフサム病、キーンズ・セイアー症候群、ワールデンブルヒ症候群、アラジール症候群、筋緊張性ジストロフィー、オリーブ橋小脳萎縮、ピエール・マリー症候群、スティックラー症候群、カロチン血症、シスチン蓄積症、ウォルフラム症候群、パッセン・コルンツヴァイク症候群、無リポ蛋白血症、色素失調症、バッテン病、ムコ多糖体沈着症、ホモシスチン尿症、またはマンノシドーシス。

#### 【1554】

手順：4匹の野生型、4匹のヘテロ接合体、および8匹のホモ接合体のコホートを、このアッセイで試験した。Hawes and coauthors (Hawes et al., 1999 Molecular Vision 1999; 5: 22) にしたがって修正したKowa Genesis小動物用眼底カメラを使用して、意識のある動物に対して眼底撮影法を行った。フルオレセインの腹腔内注射によって、各試験についての直接照明眼底画像および蛍光血管造影図を取得した。直接的な眼科的变化に加えて、この試験は、糖尿病およびアテローム性動脈硬化症などの全身疾患または他の網膜異常に関連した網膜の変化を検出することができる。通常の光線下の眼底写真を得た。血管造影により、眼の動脈および静脈を試験することが可能であった。さらに、眼の動脈 - 静脈 (A/V) 比を決定した。

#### 【1555】

上記プロトコルを使用して、作製したF2野生型、ヘテロ接合体、およびホモ接合体変異子孫に対して眼科学分析を行った。詳細には、Kowa COMIT+ソフトウェアを使用した眼底画像に従ってA/V比を測定し、計算した。この試験は、瞳孔散大によってカラー写真を撮影する。この画像は、多くの疾患の検出および分類に役立つ。動脈 - 静脈比 (A/V) は、静脈の直径に対する動脈の直径の比である (血管の分岐前に測定する)。多くの疾患 (すなわち、糖尿病、心血管障害、乳頭浮腫、視神経萎縮、他の眼の異常 (網膜変性 (色素性網膜炎として公知) など)、網膜の形成異常、視覚問題、または失明) がこの比に影響を及ぼす。したがって、野生型 (+/+ ) 同腹仔と比較してホモ接合体 (-/- ) およびヘテロ接合体 (+/- ) 変異子孫の動脈 - 静脈比が増加する表現型所見は、このような病的状態を示すであろう。

#### 【1556】

結果：

眼底：

(-/-) マウスは、瞳孔拡張薬である塩酸シクロペントレートに対する抵抗性を示した。4匹の雄のみを検査した；これらのうち、2つの画像のみが解釈可能である；瞳孔は、これらの動物では正常に拡張しなかった。

2つの画像のみ濁りを示す。

動物のうち1匹は、眼底検査において濁りを有し、また、目に「白斑」を有すると報告された。機能観察バッテリー試験により、やや斜視の目を誘導する顕著な目の変化を有する1匹の野生型 (+/+ ) マウスおよび2匹のホモ接合体 (-/- ) マウスがもたらされた；1匹の (-/-) マウスは、斜視の目に白斑を示した。

(-/-) マウスは、身体の震えおよび探索行動の低減を示した。したがって、検査した変異型 (-/-) マウスは、角膜の変化および/または白内障形成に関連するものであり

10

20

30

40

50

得るある程度の網膜異常を示した。

# 【 1 5 5 7 】

( d ) 表現型解析 : C N S / 神経学

神経学の分野において、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害を含む神経性障害および精神医学的障害の処置のためのインビボにおいて有効な標的の同定についての解析に本明細書中では注目した。神経障害は、「不安障害」として定義されるカテゴリーを含む。その「不安障害」としては、以下：軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、別段特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴うパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、I型またはII型の双極性障害、別段特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害にあてはまることがあり、その人格障害としては、以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない。

10

# 【 1 5 5 8 】

手順：

行動スクリーニングを、4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性変異マウスおよび8匹のホモ接合性変異マウスのコホートにおいて実施した。生存能低下のために、より早期の試験が必要とならない限り、すべての行動試験は、12～16週齢の間に実施した。これらの試験は、不安、活動性レベルおよび探索を計測するためのオープンフィールドを含んだ。

20

# 【 1 5 5 9 】

ホットプレート試験

試験の説明：侵害受容についてのホットプレート試験を、各マウスを小型の閉鎖系である55のホットプレートに置くことによって実施する。ホットプレート上での最大時間を30秒として、後肢応答（なめる、振るまたは跳ねる）までの時間を記録する。各動物を1回試験する。

30

# 【 1 5 6 0 】

結果：

ホットプレート：

( - / - ) マウスは応答潜時の減少を示し、変異型における急性の痛みに対する感受性の増大が示唆された。

48,40,DNA96860-2700(UNQ2524)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO6017ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA96860-2700と命名)(UNQ2524)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：変異マウス遺伝子は、以下に対応する：参照ヌクレオチド：

40

X M \_ 3 5 6 1 1 8 P R E D I C T E D :

ムス・ムスクルス遺伝子モデル1109、(NCBI)(Gm1109)；参照タンパク質：

X P \_ 3 5 6 1 1 8 P R E D I C T E D :

Gタンパク質共役受容体114 [ムス・ムスクルス]と類似；参照ヒト遺伝子配列：

N M \_ 1 5 3 8 3 7 A C C E S S I O N : N M \_ 1 5 3 8 3 7 N I D :

g i \_ 2 4 4 7 5 8 7 0 r e f N M \_ 1 5 3 8 3 7 . 1 ホモ・サピエンスGタンパク質共役受容体114(GPR114)；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

N P \_ 7 2 2 5 7 9 Gタンパク質共役受容体114 [ホモ・サピエンス] g i | 2 2

50

7 4 9 6 2 1 | g b | A A H 3 2 4 0 1 . 1 | G タンパク質共役受容体 1 1 4 [ ホモ・サピエンス ]。

#### 【 1 5 6 1 】

目的のマウス遺伝子は、ヒト G P R 1 1 4 のオルソログである G p r 1 1 4 ( G タンパク質共役受容体 1 1 4 ) である。別名としては、P G R 2 7 および G m 1 1 0 9 が挙げられる。

#### 【 1 5 6 2 】

G P R 1 1 4 は、セクレチンファミリーの G タンパク質共役受容体である ( F r e d r i k s s o n e t a l . , F E B S L e t t 5 3 1 ( 3 ) : 4 0 7 - 1 4 ( 2 0 0 2 ) ; B j a r n a d o t t i r e t a l . , G e n o m i c s 8 4 ( 1 ) : 2 3 - 3 3 ( 2 0 0 4 ) ) 。

10

このファミリーの構成員は、一般的に、大きな N 末端セグメント、G タンパク質共役受容体タンパク質分解性部位 ( G P S ) ドメイン ( S M A R T アクセション S M 0 0 3 0 3 ) 、およびセクレチンファミリー 7 回膜貫通受容体ドメイン ( P f a m アクセション P F 0 0 0 0 2 ) からなる。セクレチンファミリー G タンパク質共役受容体としては、セクレチン、カルシトニン、および血管活性腸管ペプチド受容体が挙げられ、これらは、アデニル・シクラーゼまたはホスホリパーゼ C を活性化する ( P f a m アクセション P F 0 0 0 0 2 ) 。

#### 【 1 5 6 3 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

20

#### 【 1 5 6 4 】

#### 【 化 6 2 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	19	38	17	74
予測値	18.5	37	18.5	74

30

カイ二乗値 = 1 . 1 6 有意性 = 0 . 5 5 9 8 9 8 4 ( h o m / n ) = 0 . 2 4 平均同腹仔数 = 1 0

変異情報

変異型：相同組換え ( 標準 )

説明：コードエクソン 4 から 7 をターゲティングした ( N C B I アクセション X M \_ 3 5 6 1 1 8 . 2 ) 。

1 . 野生型発現パネル：R T - P C R によって試験された、1 3 のすべての成体組織サンプル ( 脳、胚、肝臓、骨格筋、骨、胃、小腸および結腸、および脂肪以外 ) において標的遺伝子の発現を検出した。

40

2 . Q C 発現：Q C 画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【 1 5 6 5 】

4 8 . 4 0 . 1 . 表現型解析 ( 破壊遺伝子：D N A 9 6 8 6 0 - 2 7 0 0 ( U N Q 2 5 2 4 )

( a ) 全体的な表現型の概要：

ヒト G タンパク質共役受容体 1 1 4 ( G P R 1 1 4 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、除脂肪体重の減少および骨中無機質密度の測定値の減少を示す ( - / - )

50

マウスがもたらされた。

遺伝子破壊をサザンブロットによって確認した。

#### 【1566】

(b) 骨代謝および全身診断学 / 放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのDEXA
  - ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCT
- を含んだ。

#### 【1567】

Dexa解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量(BMC)、BMC/LBM比、容量測定による骨塩密度(vBMD)、全身BMD、大腿骨BMDおよび椎骨BMDを測定した。

#### 【1568】

Avertin(1.25%2,2,2-トリブromoエタノール,20mL/kg体重)をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンスitomーター(Lunar Inc.)のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域(ROI)[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度(BMD)および脂肪組成物(%脂肪)および総組織質量(TTM)を測定した。

#### 【1569】

骨マイクロCT解析：

手順：マイクロCTを使用して、非常に感度の高いBMDの測定を行った。1つの椎骨および1つの大腿骨を、4匹の野生型マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートから取り出した。腰部の5つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。μCT40スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、16マイクロメートルの解像度で第5腰部椎骨(LV5)において解析し、皮質骨パラメータを、20マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

#### 【1570】

結果：

Dexa：雄(-/-)マウスが、その性別一致(+ / +)同腹仔および歴史的平均と比較して、平均除脂肪体重の減少を示した。

雄(-/-)マウスはまた、平均骨塩量および密度関連測定値の減少を示した。

#### 【1571】

マイクロCT：雄(-/-)マウスは、その性別一致(+ / +)同腹仔および歴史的平均と比較して、大腿骨中軸の断面積の減少を示した。

#### 【1572】

PRO6017ポリペプチドをコードする遺伝子が欠失した変異型(-/-)マウスは、組織消耗性疾患(除脂肪体重の減少)と一致する表現型を示す。

したがって、PRO6017ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニストまたはインヒビターは、これらの代謝関連作用を模倣し得る。他方で、PRO6017ポリペプチドまたはそのアゴニストは、悪液質または他の組織るいそう疾患などのそのような代謝障害の予防および / または処置に有用であり得る。

10

20

30

40

50

## 【 1 5 7 3 】

また、D E X Aによって解析した（ - / - ）マウスは、その（ + / + ）同腹仔と比較した場合、骨測定値の減少およびボディマス測定値の減少を示し、異常な骨障害が示唆された。

また、除脂肪体重の減少は、成長遅延および組織消耗性障害に関連する代謝障害を示す。骨の負の表現型は、P R O 6 0 1 7 ポリペプチドまたはそのアゴニストが、正常な成長発達に加えて骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。

さらに、P R O 6 0 1 7 ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、P R O 6 0 1 7 ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト（またはインヒビター）は、関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む異常な骨代謝に関連する炎症性疾患を含む異常な骨障害または病理学的な骨障害に導き得る。

## 【 1 5 7 4 】

4 8 . 4 1 . D N A 9 6 8 8 3 - 2 7 4 5 ( U N Q 2 7 8 4 ) 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、P R O 7 1 7 4 ポリペプチドをコードする遺伝子（D N A 9 6 8 8 3 - 2 7 4 5 と命名）（U N Q 2 7 8 4 ）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

該変異型マウス遺伝子は、以下のものに対応する。ヌクレオチド参照：N M \_ 1 9 9 2 2 2 ムス・ムスクルス c D N A 配列 B C 0 2 0 1 8 8 ( B C 0 2 0 1 8 8 ) ；参照タンパク質：Q 8 V C D 3 A C C E S S I O N : Q 8 V C D 3 N I D :

ムス・ムスクルス（マウス）。

E R G I C - 5 3 様タンパク質前駆体（レクチン、マンノース結合 1 様）；参照ヒト遺伝子配列：

N M \_ 0 2 1 8 1 9 A C C E S S I O N : N M \_ 0 2 1 8 1 9 N I D :

g i 1 1 1 4 1 8 9 0 r e f N M \_ 0 2 1 8 1 9 . 1 ホモ・サピエンスレクチン、マンノース結合 1 様（L M A N 1 L ）；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q 9 H A T 1 A C C E S S I O N : Q 9 H A T 1 N I D :

ホモ・サピエンス（ヒト）。

E R G I C - 5 3 様タンパク質前駆体（レクチン、マンノース結合 1 様）。

## 【 1 5 7 5 】

目的のマウス遺伝子は、ヒト L M A N 1 L （レクチン、マンノース結合 1 様）のオルソログである「c D N A 配列 B C 0 2 0 1 8 8 」である。別名としては、E R G L 、C P L X 3 、C P X I I I 、F L J 1 3 9 9 3 、E R G I C - 5 3 L 、コンプレキシニン I I I 、および E R G I C - 5 3 様タンパク質が挙げられる。

## 【 1 5 7 6 】

L M A N 1 L は、シグナルペプチド、マメ科レクチン様ドメイン（P f a m アクセション P F 0 3 3 8 8 ）、および膜貫通セグメントを含む推定 I 型膜タンパク質である。該タンパク質は、おそらく、小胞体（E R ）- ゴルジ中間区画内に位置するカーゴ受容体 E R G I C - 5 3 のカーゴ受容体または調節因子としての機能を果たしている。E R G I C - 5 3 は、マンノース含有糖タンパク質と結合し、糖タンパク質の分取および小胞体からゴルジ複合体への移動に関与している（Y e r u s h a l m i e t a l . , G e n e 2 6 5 ( 1 - 2 ) : 5 5 - 6 0 ( 2 0 0 1 ) ; H a u r i e t a l . , B i o c h e m S o c S y m p 6 9 : 7 3 - 8 2 ( 2 0 0 2 ) ; S c h r a g e t a l . , T r e n d s B i o c h e m S c i 2 8 ( 1 ) : 4 9 - 5 7 ( 2 0 0 3 ) ）。

E R G I C - 5 3 と同様、L M A N 1 L は、おそらく E R - ゴルジ中間区画内に存在している；しかしながら、パイオインフォマティク解析により、L M A N 1 L は細胞外タンパク質であることが示唆される（C l a r k e t a l . , G e n o m e R e s 1 3 ( 1 0 ) : 2 2 6 5 - 7 0 ( 2 0 0 3 ) ）。

L M A N 1 L は、前立腺、心房、唾液腺、脾臓および中枢神経系において発現され、おそ



らく糖タンパク質のフォールディングおよび分泌においてある役割を果たしている (Yerushalmi et al., Gene 265 (1-2): 55-60 (2001); Hauri et al., Biochem Soc Symp 69: 73-82 (2002); Schrag et al., Trends Biochem Sci 28 (1): 49-57 (2003))。

#### 【1577】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹 (ES) 細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。さらに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

10

#### 【1578】

##### 【化63】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	19	24	15	58
予測値	14.5	29	14.5	58

20

カイ二乗値 = 1.76 有意性 = 0.4147829 (hom/n) = 0.26 平均同腹仔数 = 8

変異情報

変異型：相同組換え (標準)

説明：

コードエクソン2~4を標的化した (NCBIアクセッションNM\_021819.1 [ヒト])。

1. 野生型発現パネル：RT-PCRによって試験された、13のすべての成体組織サンプル中の眼のみににおいて標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現：QC画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

30

#### 【1579】

48.41.1. 表現型解析 (破壊遺伝子：DNA96883-2745 (UNQ2784))

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒトレクチン、マンノース結合1様 (LMAN1L) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、(+/-) および (-/-) マウスの両方において、血清グルコースの増加ならびに平均血清コレステロールレベルの増加がもたらされた。尿検査によって、ウロビリノゲンレベルの増加が示された。

変異型 (-/-) マウスは、髄外造血を示した。

40

変異型 (-/-) マウスはまた、数多くの免疫学的異常を示した。

日周期試験によって、(-/-) マウスにおいて移動計数の減少または活動性の低下が示された。変異型 (-/-) マウスはまた、骨梁容積、数および連結密度の減少を示した。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

#### 【1580】

(b) 発現

GeneLogic発現パターンにより、リンパおよび前立腺において高い組織発現が示された。ISHによって、特異的シグナルが脾臓において観察された。

シグナル強度は、前立腺癌で観察されたものと同程度に強く、B細胞脾臓小胞の広い境界域で選択的であった。UNQ2784発現およびノックアウト表現型により、B細胞機能

50

における役割が支持される。

[ プロトコルの実施例 5 7 参照 ]

( c ) 免疫学表現型解析

免疫関連疾患および炎症性疾患は、正常な生理機能において、傷害または損傷に応答し、傷害または損傷からの修復を開始し、そして外来生物体に対する先天的および後天的な防御を開始することによって重大な意味を有する、かなり複雑で、複雑に相互連結していることが多い生物学的経路の症状または結果である。これらの正常な生理学的経路が、応答の強度に直接関連してか、異常な制御もしくは過度の刺激の結果としてか、自己に対する応答としてか、またはこれらの組み合わせのいずれかとして、さらなる傷害または損傷を引き起こすときに、疾患または病態が生じる。

10

【 1 5 8 1 】

これらの疾患の起源が、多段階の経路および複数の異なる生物学的系 / 経路に関連することが多いが、これらの経路の 1 個以上の重大な点における介入は、寛解性または治療的な効果を有し得る。治療的な介入は、有害なプロセス / 経路の拮抗作用または有益なプロセス / 経路の刺激のいずれかによって生じ得る。

【 1 5 8 2 】

T リンパ球 ( T 細胞 ) は、哺乳動物の免疫応答の重要な成分である。T 細胞は、主要組織適合遺伝子複合体 ( M H C ) 内の遺伝子によってコードされる自己の分子に関連する抗原を認識する。この抗原は、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上に M H C 分子とともに提示され得る。T 細胞系は、宿主哺乳動物に対して健康への脅威をもたらすこれらの改変細胞を排除する。T 細胞としては、ヘルパー T 細胞および細胞傷害性 T 細胞が挙げられる。ヘルパー T 細胞は、抗原提示細胞上の抗原 - M H C 複合体を認識した後、広範囲に増殖する。ヘルパー T 細胞はまた、種々のサイトカイン、すなわち、リンフォカインを分泌する。リンフォカインは、B 細胞、細胞傷害性 T 細胞および免疫応答に関与する他の種々の細胞の活性化において中心的な役割を果たす。

20

【 1 5 8 3 】

多くの免疫応答において、炎症細胞は、損傷または感染の部位を浸潤する。遊走細胞は、罹患組織の組織学的検査によって決定され得るような、好中球、好酸球、単球またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

30

多くの免疫関連疾患が知られており、広く研究されている。このような疾患としては、免疫媒介性炎症性疾患 ( 例えば、関節リウマチ、免疫媒介性腎疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患 ( I B D )、乾癬および喘息)、非免疫媒介性炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全疾患、新形成および移植片拒絶などが挙げられる。免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を同定した。

【 1 5 8 4 】

免疫学の分野において、炎症および炎症性障害の処置のための標的を本明細書中で同定した。免疫関連疾患は、1つの場合において、免疫応答を抑制することによって処置され得る。免疫刺激性活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫媒介性疾患および炎症性疾患の処置に有益であり得る。免疫応答を阻害する分子は、免疫応答を阻害するために ( タンパク質を直接または抗体アゴニストの使用を介して ) 利用され得、その結果、免疫関連疾患を寛解させ得る。

40

【 1 5 8 5 】

以下の試験を実施した：

血液学解析：

試験の説明：血液試験は、A b b o t t 社の C e l l - D y n 3 5 0 0 R 自動血液学分析装置によって行う。その特徴の一部としては、5 種類の白血球分画が挙げられる。「患者」レポートには、全部で 2 2 を超えるパラメータが含まれ得る。

【 1 5 8 6 】

50

結果：

血液学：（ - / - ）マウスは、その（ + / + ）同腹仔および歴史的平均と比較して、平均血小板数の増加を示した。

【 1 5 8 7 】

したがって、DNA 9 6 8 8 3 - 2 7 4 5 遺伝子が欠損した変異マウスは、凝血障害に関連する表現型を生じた。これに関して、PRO 7 1 7 4 ポリペプチドのインヒビターまたはアンタゴニストは、血友病などの異常な血液凝固に関連する障害の治療で有用であろう。

【 1 5 8 8 】

蛍光標識細胞分取（FACS）解析

10

手順：

CD 4、CD 8 および T 細胞レセプターを含む、末梢血由来の免疫細胞組成物の FACS 解析を実施して、T リンパ球、B リンパ球に対する CD 1 9、白血球マーカーとしての CD 4 5 およびナチュラルキラー細胞に対する pan NK を評価した。FACS 解析は、2 匹の野生型および 6 匹のホモ接合性マウスにおいて実施し、胸腺、脾臓、骨髄およびリンパ節由来の細胞を含んだ。

【 1 5 8 9 】

これらの研究において、解析される細胞を、胸腺、末梢血、脾臓、骨髄およびリンパ節から単離した。単核細胞集団内の CD 4 および CD 8 陽性の T 細胞、B 細胞、NK 細胞および単球の相対的比率を決定するようにフローサイトメトリーを設定した。Becton Dickinson FACSCalibur 3 - レーザー FACS 装置を使用して、免疫状態を評価した。表現型アッセイおよびスクリーニングのために、この装置は、CD 4 + / CD 8 + 比に加えて、CD 4 + / CD 8 -、CD 8 + / CD 4 -、NK、B 細胞および単球の数を記録する。6 つの系統特異的抗体のパネル：CD 4 5 PerCP、抗 TCRβ APC、CD 4 PE、CD 8 FITC、pan - NK PE および CD 1 9 FITC を用いて、各マウス由来の溶解末梢血の単一サンプルを染色することによって単核細胞プロファイルを得た。2 種類の FITC 標識抗体および PE 標識抗体は、相互に排他的な細胞タイプを染色する。Cell Quest ソフトウェアを備えた Becton Dickinson FACSCalibur フローサイトメーターを使用してサンプルを解析した。

20

30

【 1 5 9 0 】

結果：

組織特異的 FACS - プロジェクト：

（ - / - ）マウスは、その（ + / + ）同腹仔のものと比較した場合、リンパ節において T 細胞：B 細胞比の減少を示した。

（ - / - ）マウスはまた、パイエル班において B 2 2 0 + CD 3 8 低 IgM - および TCR + CD 3 8 + 細胞のパーセンテージの増加を示した。また、軽度 ~ 中等度の髄外造血が、4 匹のホモ接合性（ - / - ）マウスにおいて報告された。

【 1 5 9 1 】

これらの観察結果は、パイエル班において B 細胞サブタイプに変化が認められることを示す。

40

また、リンパ節において B 細胞数の増加が観察された。

したがって、PRO 7 1 7 4 ポリペプチドは、B 細胞生成の負の調節因子および T 細胞生成の陽性調節因子としての機能を果たすようである。

【 1 5 9 2 】

（ d ）表現型解析：心臓学

心臓血管生物学の分野において、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠動脈疾患、異常脂肪血症（例えば、高コレステロール（高コレステロール血症）および血清トリグリセリドの増加（高トリグリセリド血症））、糖尿病および / または肥満症の処置のための標的を本明細書中で同定した。表現型試験は、血清コレステロール

50

および血清トリグリセリドの測定を含んでいた。

【1593】

血中脂質

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートを、このアッセイで試験した。高いコレステロールレベルおよび血中トリグリセリドレベルの上昇は、心血管疾患および/または糖尿病の発症における認識された危険因子である。血中脂質の測定により、血中脂質レベルを制御する生物学的スイッチの発見が容易になる。血中脂質レベルを上昇させる因子の阻害は、心血管疾患リスクの軽減に有用であり得る。これらの血液化学試験では、COBAS Integra 400 (mfr: Roche) を使用して測定値を記録した。

10

【1594】

結果：

血液化学：

雄(+/-)および(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均血清コレステロールの増加を示した。

【1595】

上記に概要を示したように、(+/-)および(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清コレステロールレベルの増加を示した。

したがって、PRO7174遺伝子が欠損した変異マウスは、心血管疾患のモデルとして役立ち得る。PRO7174ポリペプチドまたはそのコード遺伝子は、コレステロールなどの血中脂質の制御に有用であり得る。したがって、PRO7174ポリペプチドまたはそのアゴニストは、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠状動脈疾患、高コレステロール血症、糖尿病および/または肥満症のような心血管疾患の処置に有用であり得る。

20

【1596】

(e) 表現型解析：

代謝 - 血液化学 / 尿検査

代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、血糖測定を含む。マウスにおける血液化学試験を実施するためにCOBAS Integra 400 (mfr: Roche) を使用した。血糖値の測定に加えて、以下の血液化学試験もまた日常的に行う：アルカリホスファターゼ；アラニンアミノ・トランスフェラーゼ；アルブミン；ビリルビン；亜リン酸；クレアチニン；BUN = 血中尿素窒素；カルシウム；尿酸；ナトリウム；カリウム；および塩化物。代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、インスリン感度およびグルコース代謝の変化を測定する耐糖能試験を含む。異常な耐糖能試験結果は、以下の障害または状態：1型糖尿病および2型糖尿病、シンドロームX、様々な循環器疾患および/または肥満症を示唆し得るが、これらに限定されない。

30

【1597】

結果：

雄および雌(+/-)および(-/-)マウスの両方は、その野生型(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清グルコースレベルの増加(歴史的平均より約2SD上)を示した。

40

【1598】

したがって、変異型(+/-)および(-/-)マウスは、グルコース代謝の変化と関連する高血糖症または糖尿病を示した。

PRO7174ポリペプチドまたはそのアゴニストは、正常なグルコースレベル/代謝の維持に有用であり得、おそらく糖尿病の処置に有用であり得る。

ヘテロ接合性およびホモ接合性マウスにおける平均血清グルコースレベルの上昇に加え、雄および雌変異型マウスはまた、尿中ウロビリノゲンの肉眼レベルの上昇(4匹のヘテロ

50

接合性 (+ / -) マウスのうち 2 匹および 4 匹のホモ接合性 (- / -) マウス 3 匹で約 20 倍増加)を示した。

血清ビリルビンは正常であった。

これらの結果は、おそらく腎臓機能不全と関連している尿の異常の関数であり得る。

#### 【1599】

(f) 表現型解析：CNS / 神経学

神経学の分野において、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害を含む神経性障害および精神医学的障害の処置のためのインビボにおいて有効な標的の同定についての解析に本明細書中では注目した。神経障害は、「不安障害」として定義されるカテゴリーを含む。その「不安障害」としては、以下：軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、別段特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴うパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、I 型または II 型の双極性障害、別段特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害にあてはまることがあり、その人格障害としては、以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない。

10

20

#### 【1600】

手順：

行動スクリーニングを、4 匹の野生型マウス、4 匹のヘテロ接合性変異マウスおよび 8 匹のホモ接合性変異マウスのコホートにおいて実施した。生存能低下のために、より早期の試験が必要とならない限り、すべての行動試験は、12 ~ 16 週齢の間に実施した。これらの試験は、不安、活動性レベルおよび探索を計測するためのオープンフィールドを含んだ。

#### 【1601】

概日性試験の説明：

雌マウスを、試験の 1 日目の午後 4 時に 48 . 2 cm x 26 . 5 cm のホームケージ内に個々に収容し、飼料および水を随意に与える。動物を、12 時間明 / 暗サイクル（午前 7 時に点灯し、午後 7 時に消灯する）に曝露する。システムソフトウェアが、動物の動きによって引き起こされる光線遮断回数を記録し、光線中断回数は自動的に移動回数で割り算される。活動性は、3 日間の試験中、1 時間間隔で 60 回記録する。得られたデータは、3 日間の試験期間における各時間で記録した活動性レベル（概日リズム）の中央値および各明 / 暗サイクル中の総活動性（自発活動性）の中央値によって示される。

30

40

#### 【1602】

結果：

(- / -) マウスは、その性別一致 (+ / +) 同腹仔および歴史的平均と比較した場合、1 時間の慣れ期間ならびにホームケージ活動性試験の両方の明期の際、歩行回数の減少（活動性の低下）を示した。これらの結果は、致死性または抑鬱症と一致する。PRO7174 ポリペプチドのアнтаゴニストまたはインヒビターまたは PRO7174 ポリペプチドをコードする遺伝子は、この挙動を模倣すると予想される。同様に、PRO7174 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、かかる神経学的障害、例えば抑鬱障害の処置または不活発状態、認知障害、痛覚過敏および感覚障害などの他の不安様症状の低減に有用であり得る。

#### 【1603】

(g) 骨代謝および全身診断学 / 放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は

50

・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのDEXA  
 ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCT  
 を含んだ。

#### 【1604】

De x a 解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量(BMC)、BMC/LBM比、容量測定による骨塩密度(vBMD)、全身BMD、大腿骨BMDおよび椎骨BMDを測定した。

10

#### 【1605】

A v e r t i n ( 1 . 2 5 % 2 , 2 , 2 , - トリプロモエタノール , 2 0 m L / k g 体重 ) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンシトメーター(Lunar Inc.)のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域(ROI)[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度(BMD)および脂肪組成物(%脂肪)および総組織質量(TTM)を測定した。

#### 【1606】

骨マイクロCT解析：

20

手順：マイクロCTを使用して、非常に感度の高いBMDの測定を行った。1つの椎骨および1つの大腿骨を、4匹の野生型マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートから取り出した。腰部の5つの椎骨骨梁骨体積、骨梁厚、結合性密度ならびに大腿骨中軸の骨の総面積および皮質厚の測定を行った。 $\mu$ CT40スキャンにより、骨量および構造についての詳細な情報が得られた。複数の骨を、サンプルホルダーに置き、自動的にスキャンした。装置ソフトウェアを使用して、解析用の目的の領域を選択した。骨梁骨パラメータを、16マイクロメートルの解像度で第5腰部椎骨(LV5)において解析し、皮質骨パラメータを、20マイクロメートルの解像度で大腿骨中軸において解析した。

#### 【1607】

結果：

30

マイクロCT：雄(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較して、平均脊椎子柱骨の体積、数、および連結密度が減少した。

#### 【1608】

マイクロCT解析によって解析された(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔と比較して、異常な骨障害を示唆する、骨の測定値の減少を示した。(-/-)マウスはまた、負の骨表現型を示し、骨の代謝障害を反映する骨測定値が異常に減少した。骨の負の表現型は、PRO7174ポリペプチドまたはそのアゴニストが、骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。さらに、PRO7174ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、PRO7174ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト(またはインヒビター)は、異常な骨代謝に関連する炎症性疾患(関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む)を含む、異常または病理学的な骨障害に導き得る。

40

#### 【1609】

48.42.DNA136110-2763(UNQ3003)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO9744ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA136110-2763と命名)(UNQ3003)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_022416 ムス・ムスクルスセリン/トレオニンキナーゼ32B (Stk32b

50

); 参照タンパク質:

Q9JJX8 Q9JJX8 Q9JJX8 SERINE / THREONINE PROTEIN KINASE; 参照ヒト遺伝子配列:

NM\_018401 ホモ・サピエンスセリン/トレオニンキナーゼ32B (STK32B); ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する:

Q9NY57 Q9NY57 Q9NY57 SERINE / THREONINE PROTEIN KINASE.

目的のマウス遺伝子は、ヒトSTK32BのオルソログであるStk32b (セリン/トレオニンキナーゼ32B) である。

別名としては、STKG6、Stk32、YANK2、2510009F08Rik、HSA250839、およびセリントレオニンキナーゼ32が挙げられる。

10

#### 【1610】

STK32Bは、セリン/トレオニンプロテインキナーゼ触媒性ドメインを含む推定細胞質セリン/トレオニンプロテインキナーゼである (SMARTアクセッションSM00220)。

バイオインフォマティック解析から、STK32Bは細胞外タンパク質であり得ることが示唆される (Clark et al., Genome Res 13(10):2265-70(2003))。

#### 【1611】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹 (ES) 細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

20

#### 【1612】

#### 【化64】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	15	38	19	72
予測値	18	36	18	72

30

カイ二乗値 = 0.44 有意性 = 0.8025188 (hom/n) = 0.25 平均同腹仔数 = 8

変異情報

変異型: 相同組換え (標準)

説明: コードエクソン3をターゲティングした (NCBIアクセッションNM\_022416.1)。

#### 1. 野生型発現パネル:

標的遺伝子の発現は、脾臓、肺、肝臓、骨格筋、骨、脂肪、喘息肺、LPS 肝臓、血液、大動脈樹状部 and 皮膚線維芽細胞を除くRT-PCRによって試験した26の成体組織試料のすべてにおいて検出された。

2. QC発現: QC画像: 標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

40

#### 【1613】

48.42.1. 表現型解析 (破壊遺伝子: DNA136110-2763 (UNQ3003))

(a) 全体的な表現型の概要:

ヒトセリン/トレオニンキナーゼ32B (STK32B) のオルソログをコードする遺伝

50

子の変異により、平均血清トリグリセリドレベルの増加を示す（-/-）マウスがもたらされた。

遺伝子破壊をサザンブロットによって確認した。

【1614】

（b）表現型解析：心臓学

心臓血管生物学の分野において、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠動脈疾患、異常脂肪血症（例えば、高コレステロール（高コレステロール血症）および血清トリグリセリドの増加（高トリグリセリド血症））、糖尿病および/または肥満症の処置のための標的を本明細書中で同定した。表現型試験は、血清コレステロールおよび血清トリグリセリドの測定を含んでいた。

10

【1615】

血中脂質

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートを、このアッセイで試験した。高いコレステロールレベルおよび血中トリグリセリドレベルの上昇は、心血管疾患および/または糖尿病の発症における認識された危険因子である。血中脂質の測定により、血中脂質レベルを制御する生物学的スイッチの発見が容易になる。血中脂質レベルを上昇させる因子の阻害は、心血管疾患リスクの軽減に有用であり得る。これらの血液化学試験では、COBAS Integra 400（mfr: Roche）を使用して測定値を記録した。

20

【1616】

結果：

血液化学：雄および雌（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較して、平均血清中トリグリセリドレベルの上昇を示した。

【1617】

上でまとめられたように、（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較して、平均血清トリグリセリドレベルの著しい上昇を示した。したがって、PRO9744遺伝子が欠損した変異マウスは、心血管疾患のモデルとして役立ち得る。PRO9744ポリペプチドまたはそのコード遺伝子は、トリグリセリドなどの血中脂質の制御に有用であり得る。したがって、PRO9744ポリペプチドまたはそのアゴニストは、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠動脈疾患、高トリグリセリド血症、糖尿病および/または肥満症のような心血管疾患の処置に有用であり得る。

30

【1618】

48.43.DNA108725-2766（UNQ3023）遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO9821ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA108725-2766と命名）（UNQ3023）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_177139 ムス・ムスクルスRIKEN cDNA E130115E03 遺伝子（E130115E03Rik）；参照タンパク質：Q8BPP5 ACCESSION: Q8BPP5 NID:

40

ムス・ムスクルス（マウス）。

タンパク質UNQ3023 / PRO9821 前駆体；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_194317 ホモ・サピエンス仮想タンパク質MGC52057（MGC52057）；ヒトタンパク質配列は、次の参照に対応する：

Q86Y78 ACCESSION: Q86Y78 NID:

ホモ・サピエンス（ヒト）。

タンパク質UNQ3023 / PRO9821 前駆体。

50

【1619】



目的のマウス遺伝子は、ヒト仮説タンパク質MGC52057のオーソログであるRIKEN cDNA E130115E03遺伝子である。

#### 【1620】

仮想タンパク質MGC52057は、シグナルペプチドおよびLy-6抗原/uPA受容体様(LU)ドメイン(SMARTアクセッションSM00134)からなる推定細胞外タンパク質(Clark et al., Genome Res 13(10):2265-70(2003))。同様のドメイン構成を有するタンパク質としては、CD59抗原(これは、細胞を補体媒介性溶解から保護する)およびLY6Dが挙げられ、これらは、ケラチノサイトにおける細胞-細胞接着に関与している(Brakenhoff et al., J Cell Biol 129(6):1677-89(1995); Clayton et al., Eur J Immunol 33(2):522-31(2003))。

10

#### 【1621】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹(ES)細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

20

#### 【1622】

##### 【化65】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	26	29	17	72
予測値	18	36	18	72

カイ二乗値 = 4.35 有意性 = 0.11360816 (hom/n) = 0.22 平均同腹仔数 = 9

変異情報

30

変異型：相同組換え(標準)

説明：コードエクソン1をターゲティングした(NCBIアクセッションNM\_177139.3)。

1. 野生型発現パネル：RT-PCRによって試験された、胚性幹細胞(ES)細胞および26のすべての成体組織サンプル(骨格筋、脂肪およびLPS肝以外)において標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現：QC画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【1623】

48.43.1. 表現型解析(破壊遺伝子：DNA108725-2766(UNQ3023))

40

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒト仮想タンパク質MGC52057のオルソログをコードする遺伝子の変異により、骨塩量および骨中無機質密度の測定値の減少を示す(-/-)マウスがもたらされた。UNQ3023は未知タンパク質であり、(-/-)マウスでは免疫学的表現型を有しない。しかしながら、UNQ3023はECDにおいて、補体活性化経路に重要なCD59のものと同様のUPAR\_\_LY6ドメインを有するようである。遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

#### 【1624】

(b) 骨代謝および全身診断学/放射線表現型解析

50

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのDEXA
  - ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCT
- を含んだ。

#### 【1625】

Dexa解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量(BMC)、BMC/LBM比、容量測定による骨塩密度(vBMD)、全身BMD、大腿骨BMDおよび椎骨BMDを測定した。

#### 【1626】

Avertin(1.25%2,2,2-トリブromoエタノール,20mL/kg体重)をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンストメーター(Lunar Inc.)のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域(ROI)[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度(BMD)および脂肪組成物(%脂肪)および総組織質量(TTM)を測定した。

#### 【1627】

結果：

Dexa：

雄および雌(-/-)マウスの両方は、その性別一致(+/-)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、骨塩量、BMC/LBM指数および全身骨中無機質密度の測定値の減少を示した。

#### 【1628】

Dexa解析によって解析された(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔と比較して、異常な骨障害を示唆する、骨の測定値の減少を示した。骨の負の表現型は、PRO9821ポリペプチドまたはそのアゴニストが、骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。さらに、PRO9821ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、PRO9821ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト(またはインヒビター)は、異常な骨代謝に関連する炎症性疾患(関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む)を含む、異常または病理学的な骨障害に導き得る。

#### 【1629】

48.44.DNA129332-2775(UNQ3037)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験では、PRO9852ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA129332-2775と命名)(UNQ3037)を破壊した。

これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：

該変異型マウス遺伝子は、以下のものに対応する。ヌクレオチド参照：NM\_\_145937

ACCESSION：NM\_\_145937 NID：

gi\_22122360 ref NM\_\_145937.1ムス・ムスクルスEST A

I463102(AI463102)；参照タンパク質：

Q8R0F3 ACCESSION：Q8R0F3 NID：

ムス・ムスクルス(マウス)。

スルファターゼ修飾因子1前駆体(C-formlyグリシン-generating酵素1)；参照ヒト遺伝子配列：

10

20

30

40

50

NM\_\_182760 ホモ・サピエンススルファターゼ修飾因子1 (SUMF1) ; ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する :

Q8NBK3 ACCESSION : Q8NBK3 NID :

ホモ・サピエンス (ヒト)。

スルファターゼ修飾因子1前駆体 (C - -ホルミル (formyl) グリシン生成酵素1)。

#### 【1630】

目的のマウス遺伝子は、ヒトSUMF1のオルソログであるSumf1 (スルファターゼ修飾因子1) である。別名としては、FGE、MGC39076、EST AI463102、およびC - -ホルミルグリシン生成酵素が挙げられる。

10

#### 【1631】

SUMF1は、小胞体の内腔内の酵素であり、種々のスルファターゼ、例えば、GALNS (ガラクトサミン [N - アセチル] - 6 - スルフェートスルファターゼ)、ARSA (アリールスルファターゼA)、STS (ステロイドスルファターゼ [ミクロソームの]、アリールスルファターゼC、アイソザイムS)、およびARSE (アリールスルファターゼE [軟骨異形成プンクタタ1]) などの触媒性部位においてC - -ホルミルグリシンへのシステインの変換を触媒する。この本訳語修飾は、これらのスルファターゼの酵素活性に必要とされる。

SUMF1は、いくつかの組織、例えば、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓および膵臓ならびに皮膚線維芽細胞において発現される。SUMF1における変異は、リソソーム蓄積症 (OMIM 272200) である多くのスルファターゼ欠損を引き起こし得る (Cosma et al., Cell 113 (4) : 421 - 2 (2003) ; Dierks et al., Cell 113 (4) : 435 - 44 (2003) ; Cosma et al., Hum Mutat 23 (6) : 576 - 81 (2004) ; Preusser - Kunze et al., J Biol Chem 280 (15) : 14900 - 10 (2005) )。

20

#### 【1632】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹 (ES) 細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

30

#### 【1633】

#### 【化66】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	23	42	8	73
予測値	18.25	36.5	18.25	73

40

カイ二乗値 = 13.92 有意性 = 9.490965E - 4 (hom / n) = 0.12 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型 : 相同組換え (標準)

説明 : コードエクソン1をターゲティングした (NCBIアクセッションNM\_\_145937.1)。

1. 野生型発現パネル : RT - PCRによって試験された、胚性幹細胞 (ES) 細胞および13のすべての成体組織サンプルにおいて標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現 : QC画像 : 標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によっ

50

て確認した。

【1634】

48.44.1.DNA129332-2775(UNQ3037)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒトスルファターゼ修飾因子1(SUMF1)のオルソログをコードする遺伝子の変異により、(-/-)マウスにおいてバイアビリティの低下およびリソソーム蓄積症がもたらされた。

遺伝子情報により、この変異によってホモ接合性変異型マウスのバイアビリティの低下がもたらされたことが示される。

ホモ接合性変異型マウスでは、完全なレベル1試験を行なわなかった。

部分解析に利用可能な雌変異型マウスは、成長遅延ならびに血液化学、免疫学および神経学的異常の徴候を示した。顕微鏡解析により、すべての組織において大きな細胞質内小胞によって拡張されたマクロファージを特徴とする変異型におけるリソソーム蓄積症が明らかになった。標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【1635】

(b) 病理学

肉眼的：

(-/-)マウスは、いくつかの骨格異常、例えば、凸形胸骨、脊柱後弯症、四肢の縮小を示した。

【1636】

顕微鏡的：

(-/-)マウスは、すべての組織において大きな細胞質内小胞によって拡張されたマクロファージを特徴とするリソソーム蓄積症を示した。罹患マクロファージは、脾赤色髄およびリンパ節洞では非常に数が多かったが、頭蓋骨および長骨骨端内ではびまん的であった。肝臓のクッパー細胞ならびに脳および脊髄のグリア細胞(主に小神経膠細胞)もまた、大きな細胞質内小胞によって拡張されていた。

大きな拡張クッパー細胞は肝類洞内に突出し、拡張していた。

一部のIto細胞もまた肥大性のようであった。

中枢神経系では、罹患ミクログリア細胞は、脳および脊髄の白質(white tract)において非常に数が多かった。動脈(大動脈)平滑筋細胞は、多くの場合で透明な細胞質小胞によって拡張されていた。より重度な罹患変異型では、拡張細胞が骨格の正常な骨髄と置き換わっており、前庭蝸牛神経を囲み、圧迫していた。長骨における該病変は骨幹端において最も重症であり、ここでは、多くの場合で骨芽細胞および骨梁の完全な非存在、ならびに破骨細胞の数の増加が認められた。骨端では、正常な細胞要素が、大きな拡張マクロファージ、疎性薄い着色細胞外マトリックスおよび散在性離脱軟骨細胞と置き換わっていた。骨端軟骨の正常な成熟配列は完全に破壊され、増殖中および肥大性軟骨細胞正常な柱状アレイの非存在を特徴とした。また、長骨の骨端軟骨鑄型の骨化の低減および関節異常が認められた。この肉眼による明白な骨格異常は、骨の発達および成熟の異常を反映する。

遺伝子発現：LacZ活性は、免疫組織化学解析によって組織パネルにおいて検出されなかった。

【1637】

(c) 免疫表現型解析

免疫関連疾患および炎症疾患は、通常の生理学では発作または損傷に応答し、発作または損傷からの修復を開始し、外来生物に対する先天性および後天性防御を増加させるために極めて重要な非常に複雑でしばしば複数の相互関連した生物学的経路の徴候および結果である。これらの正常な生理学的経路が応答強度の直接的関連、異常な制御または過剰な刺激の結果、自己反応、またはこれらの組み合わせとしてさらなる発作または損傷を引き起こす場合、疾患または病変が起こる。

10

20

30

40

50

## 【 1 6 3 8 】

これらの疾患の発症は、しばしば多段階経路およびしばしば複数の異なる生体系 / 生物学的経路に関与するが、1つまたは複数のこれらの経路における臨界点での介入が改善効果または治療効果を示し得る。有害な過程 / 経路の拮抗作用または有益な過程 / 経路の刺激のいずれかによって治療介入を行うことができる。

## 【 1 6 3 9 】

Tリンパ球 (T細胞) は、哺乳動物免疫応答の重要な構成要素である。T細胞は、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 内の遺伝子によってコードされる自己分子に関連する抗原を認識する。抗原を、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面上のMHC分子と共に提示することができる。T細胞系は、宿主哺乳動物の健康に害を及ぼすこれらの変化した細胞を排除する。T細胞には、ヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞が含まれる。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上の抗原-MHC複合体の認識後に大規模に増殖する。ヘルパーT細胞はまた、B細胞、細胞傷害性T細胞、および免疫応答に関与する種々の他の細胞の活性化で中心的な役割を果たす種々のサイトカイン (すなわち、リンフォカイン) を分泌する。

10

## 【 1 6 4 0 】

多くの免疫応答では、炎症細胞が損傷部位または感染部位に浸潤する。移動細胞は、罹患組織の組織学的試験によって決定することができる好中球、好酸球、単球、またはリンパ球であり得る。Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

20

多くの免疫関連疾患が公知であり、広く研究されている。このような疾患には、免疫介在炎症疾患 (関節リウマチ、免疫介在腎臓疾患、肝胆疾患、炎症性腸疾患 (IBD)、乾癬、および喘息など)、非免疫介在炎症疾患、感染症、免疫不全、新形成、および移植片拒絶などが含まれる。免疫学領域では、炎症および炎症障害の治療のための標的を同定した。

## 【 1 6 4 1 】

免疫学領域では、本明細書中で、炎症および炎症障害の治療のための標的を同定した。免疫関連障害を、ある場合において、免疫応答の抑制によって治療することができる。免疫刺激活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用は、免疫介在疾患および炎症疾患の治療で有利であろう。免疫応答を阻害する分子 (直接または抗体作用剤の使用を介したタンパク質) を使用して、免疫応答を阻害し、免疫関連疾患を改善することができる。

30

## 【 1 6 4 2 】

以下の試験を行った。

## 【 1 6 4 3 】

血液学解析：

試験の説明：血液試験は、Abbott社のCell-Dyn 3500 R自動血液学分析装置によって行う。その特徴の一部としては、5種類の白血球分画が挙げられる。「患者」レポートには、全部で22を超えるパラメータが含まれ得る。

## 【 1 6 4 4 】

結果：

血液学：

雌 (-/-) マウスは、その (+/+) 同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球容積、平均赤血球容積および平均赤血球ヘモグロビンの減少を示した。雌 (-/-) マウスはまた、赤血球分布幅の増加を示した。

## 【 1 6 4 5 】

(-/-) マウスは、その (+/+) 同腹仔および歴史的平均と比較した場合、ヘモグロビンレベル、ヘマトクリットおよび赤血球容積の減少を示した。

## 【 1 6 4 6 】

これらの結果は、貧血に関連する表現型に係する。したがって、PRO0952ポリ

50

ペプチド、そのアゴニストまたはPRO9852ポリペプチドをコードする遺伝子は、正常な赤血球産生に必須であるに違いなく、ゆえに貧血または低ヘマトクリットに関連する血液障害の処置に有用であり得る。

#### 【1647】

蛍光標識細胞分取 (FACS) 解析

手順：

CD4、CD8およびT細胞レセプターを含む、末梢血由来の免疫細胞組成物のFACS解析を実施して、Tリンパ球、Bリンパ球に対するCD19、白血球マーカーとしてのCD45およびナチュラルキラー細胞に対するpan NKを評価した。FACS解析は、野生型およびホモ接合性マウスにおいて実施し、胸腺、脾臓、骨髓およびリンパ節由来の細胞を含んだ。

10

#### 【1648】

これらの研究において、解析される細胞を、胸腺、末梢血、脾臓、骨髓およびリンパ節から単離した。単核細胞集団内のCD4およびCD8陽性のT細胞、B細胞、NK細胞および単球の相対的比率を決定するようにフローサイトメトリーを設定した。Becton-Dickinson FACSCalibur 3-レーザーFACS装置を使用して、免疫状態を評価した。表現型アッセイおよびスクリーニングのために、この装置は、CD4+/CD8+比に加えて、CD4+/CD8-、CD8+/CD4-、NK、B細胞および単球の数を記録する。6つの系統特異的抗体のパネル：CD45 PerCP、抗TCRb APC、CD4 PE、CD8 FITC、pan-NK PEおよびCD19 FITCを用いて、各マウス由来の溶解末梢血の単一サンプルを染色することによって単核細胞プロファイルを得た。2種類のFITC標識抗体およびPE標識抗体は、相互に排他的な細胞タイプを染色する。CellQuestソフトウェアを備えたBecton-Dickinson FACSCaliburフローサイトメーターを使用してサンプルを解析した。

20

#### 【1649】

結果：

FACS3：

(-/-)マウスは、その(+ / +)同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、B細胞の平均パーセンテージの減少およびCD8細胞の平均パーセンテージの増加を特徴とする末梢血中の白血球サブセットの分布の変化を示した。

30

これらの結果は、ノックアウト(-/-)マウスがその野生型(+ / +)同腹仔と比較した場合、免疫学的異常を示すことを示す。

PRO9852ポリペプチドのアнтаゴニスト(インヒビター)は、この表現型を模倣することが予測され得る。

PRO9852ポリペプチドまたはそのアゴニストは、T細胞生成の負の調節因子およびB細胞発達の陽性調節因子としての機能を果たすようであり、B細胞の発達または成熟に有用であり得、これは、次いで、速やかな免疫応答に関与し得る。

40

卵白アルブミン攻撃

手順：このアッセイは、野生型およびホモ接合体マウスにおいて行った。ニワトリ卵白アルブミン(OVA)は、T細胞依存性抗原であり、マウスにおける抗原特異的免疫応答の研究用のモデルタンパク質として一般に使用されている。OVAは無毒で不活性であり、したがって、免疫応答が誘発されない場合であっても動物に害をもたらさない。OVAに対するマウスの免疫応答は、T細胞応答を惹起させる免疫優性ペプチドが同定されている程度まで充分に特徴付けされている。抗OVA抗体を、免疫処置の8~10日後に酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)を用いて検出することができ、抗体の異なるアイソタイプの測定によって、遺伝子操作されたマウスにおいて欠陥性応答をもたらし得る複雑なプロセスに関するさらなる情報が得られる。

50

#### 【1650】

上記のように、このプロトコルは、マウスが抗原特異的免疫応答を生じる能力を評価する。動物に 50 mg のニワトリ卵白アルブミン（完全フロイントアジュバント中に乳化）を IP 注射し、14 日後に、抗卵白アルブミン抗体（IgM、IgG1 および IgG2 サブクラス）の血清力価を測定した。血清試料中のOVA 特異的抗体の量は、96 ウェル試料プレートをスキャンする装置によって得られる光学密度（OD）値に比例する。データは、各血清試料の一組の連続希釈物に対して収集した。

#### 【1651】

この攻撃の結果：

（-/-）マウスは、その（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清 IgG1 および IgG2a 応答の減少を示した。

10

#### 【1652】

まとめると、卵白アルブミン攻撃研究は、PRO9852 ポリペプチドをコードする遺伝子が欠失したノックアウトマウスが、その野生型同腹仔と比較した場合、免疫学的異常を示すことを示す。特に、変異マウスは、T細胞依存性OVA 抗原で攻撃した場合、免疫学的応答を誘発する能力の低下を示した。したがって、PRO9852 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、免疫系の刺激（例えば、T細胞増殖など）に有用であり得、この効果が白血病、他の癌型、および免疫不全患者（AIDS 患者など）などの場合の個体に有利である場合に使用されるであろうということが示唆される。したがって、PRO9852 ポリペプチドのインヒビター（アンタゴニスト）は、免疫応答の阻害に有用であり得、このため、例えば、移植片拒絶または移植片対宿主病の場合において有害な免疫応答を抑制するための有用な候補であり得る。

20

#### 【1653】

（d）表現型解析：CNS / 神経学

神経学の分野において、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害を含む神経性障害および精神医学的障害の処置のためのインピボにおいて有効な標的の同定についての解析に本明細書中では注目した。神経障害は、「不安障害」として定義されるカテゴリーを含む。その「不安障害」としては、以下：軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、別段特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴うパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、I 型またはII 型の双極性障害、別段特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害にあてはまることもあり、その人格障害としては、以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない。

30

#### 【1654】

手順：

行動スクリーニングを、野生型マウス、ヘテロ接合性変異マウスおよびホモ接合性変異マウスのコホートにおいて実施した。生存能低下のために、より早期の試験が必要とならない限り、すべての行動試験は、12 ~ 16 週齢の間に実施した。これらの試験は、不安、活動性レベルおよび探索を測定するオープンフィールドを含んだ。

40

#### 【1655】

オープンフィールド試験：

公知の薬物のいくつかの標的は、オープンフィールド試験において表現型を示した。これらとしては、セロトニン（serotonin）トランスポーター、ドーパミントランスポーター（Giroulet et al., Nature, 1996 Feb 15; 379 (6566): 606-12) および GABA レセプター（Homann et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1997 Apr 15; 94 (8): 4143-8) のノックアウトを含む。自動化されたオープンフィールドアッ

50

セイをカスタマイズして、感情状態に関連する変化および学習に関する探索パターンを扱った。まず、フィールド(40×40cm)をマウスに対して比較的大きくなるように選択することによって探索に関連する自発運動の変化を取り上げるように設計した。さらに、4つの穴を床に設け、探索に特に関連する活動である鼻の突っ込みを可能にした。この試験に関連した感情状態を高めるためにいくつかの因子を設けた。オープンフィールド試験は、マウスが試験される最初の実験の手順であり、なされる測定は被験体のチャンバーとの最初の経験であった。さらに、オープンフィールドは明るく照らした。これらの因子のすべてによって、新しい開放性空間に関連する天然の不安が高められる。次いで、探索活動のパターンおよび程度ならびに特に中心からの全移動距離比は、不安または抑鬱症に対する罹りやすさに関する変化を識別することができる。3つの異なったレベルでの赤外線ビームを用いた大きな活動領域(40cm×40cm、AccuScan InstrumentsのVersaMax動物活動性モニターシステム)を用いて、直立、穴への突っ込みおよび自発運動を記録した。動物を中心に置き、その活動を20分間測定した。この試験のデータを4分間隔で5回分析した。全移動距離(cm)、垂直移動回数(直立)、穴突っ込み回数および中心からの全移動距離比を記録した。

10

20

30

40

50

#### 【1656】

マウスが新しい環境に対して正常な慣れ応答を示す傾向を、5回の間隔にわたるその水平自発運動の変化すべてを測定することにより評価する。経時的な活動性の変化のこの算定傾きは、絶対値ではなく正規化された全移動距離を使用して決定する。傾きは5回の間隔のそれぞれにおける正規化された活動を通しての回帰直線から決定する。正常な慣れは、負の傾きの値によって表される。

#### 【1657】

結果：

(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較して、オープンフィールド試験中の中心にいる時間の合計の中央値の増加を示したことから、変異体における不安様応答の低下が示唆される。

#### 【1658】

注目すべき差が、オープンフィールド活動性試験中に観察された。(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔と比較して、中心領域にいる時間の合計の中央値の増加を示した。これは、変異体における不安様応答の低下を示唆する。したがって、ノックアウトマウスは、抑鬱症、全般性不安障害、認知障害、痛覚過敏ならびに感覚障害および/または双極性障害と一致する表現型を示した。したがって、PRO9852ポリペプチドおよびそのアゴニストは、抑鬱性障害に関連する症状の処置または寛解に有用であり得る。

#### 【1659】

機能観察バッテリー(FOB)試験 - 尾部懸垂試験：

FOBは、全身感覚および運動欠陥を測定するために動物に適用される一連の状態である。全身の神経機能を評価するIrwin神経性のスクリーニングからの試験のサブセットを使用する。一般に、短期間、触覚、嗅覚および視覚の刺激を動物に適用することにより、それらが正常に検知および応答する能力を測定する。これらの簡単な試験は、約10分を要し、マウスは、試験後、ホームケージに戻される。

#### 【1660】

尾部懸垂試験：

尾部懸垂試験は、げっ歯類の抑鬱症様挙動モデルとして開発された手順である。この特定の準備では、マウスの尾部を6分間懸垂し、それに応じてマウスがこの位置から逃れるためにもがく。一定時間後、マウスのもがきは減少し、これは、どうすることもできないパラダイムの学習型と解釈される。無効なデータ(すなわち、試験中にその尾部を登る)を有する動物を、この分析から排除する。

#### 【1661】

結果：



## 尾部懸垂 2 :

雌 ( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、不動時間の増加を示し、変異型における鬱様応答の増加が示唆された。

### 【 1 6 6 2 】

したがって、ノックアウトマウスは、抑鬱症、全般性不安障害、認知障害、痛覚過敏、感覚障害、および / または双極性障害と一致する表現型を示した。したがって、PRO9852ポリペプチドおよびその作用剤は、抑鬱性障害に関連する症状の治療または改善に有用であろう。

### 【 1 6 6 3 】

#### 聴覚驚愕反射のプレパルス抑制

聴覚驚愕反射のプレパルス抑制は、大きな120デシベル ( dB ) 驚愕誘発音が、より小さい ( プレパルス ) 音に先行する場合に起こる。PPIパラダイムは、6種類の異なる試行型 ( 70 dB バックグラウンドノイズ、120 dB 単独、74 dB + 120 dB - pp4、78 dB + 120 dB - pp8、82 dB + 120 dB - pp12、および90 dB + 120 dB - pp20 ) からなり、各々、擬似ランダム順に6回、合計36回の試行が繰り返される。刺激に対する最大応答 ( V<sub>max</sub> ) を、各試行型について平均する。100以下の120 dB 平均値を有する動物は、解析から除外する。プレパルスが動物の驚愕刺激に対する応答を抑制するパーセンテージを計算し、グラフで示す。

### 【 1 6 6 4 】

#### 結果 :

#### PPI :

( - / - ) マウスは、驚愕応答を示さず、変異型における聴力障害を示した。したがって、プレパルス抑制は評価されなかった。

### 【 1 6 6 5 】

#### 概日性試験の説明 :

雌マウスを、試験の1日目の午後4時に48.2 cm x 26.5 cmのホームケージ内に個々に収容し、飼料および水を随意に与える。動物を、12時間明 / 暗サイクル ( 午前7時に点灯し、午後7時に消灯する ) に曝露する。システムソフトウェアが、動物の動きによって引き起こされる光線遮断回数を記録し、光線中断回数は自動的に移動回数で割り算される。活動性は、3日間の試験中、1時間間隔で60回記録する。得られたデータは、3日間の試験期間における各時間で記録した活動性レベル ( 概日リズム ) の中央値および各明 / 暗サイクル中の総活動性 ( 自発活動性 ) の中央値によって示される。

### 【 1 6 6 6 】

#### 結果 :

#### 日周期 :

雌 ( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較した場合、1時間および12時間慣れ期間およびすべての明 / 暗期中、歩行回数の減少を示した。

### 【 1 6 6 7 】

これらの結果は、不活発状態または抑鬱障害と一致する。

PRO9852ポリペプチドまたはPRO9852コード遺伝子のアンタゴニストまたはインヒビターは、この挙動を模倣することが予測され得る。

同様に、PRO9852ポリペプチドまたはそのアゴニストは、かかる神経学的障害、例えば、抑鬱障害の処置または不活発状態、認知障害、痛覚過敏および感覚障害などの他の不安様症状の低減に有用であり得る。

### 【 1 6 6 8 】

#### 反転スクリーン試験 :

野生型マウス、ヘテロ接合性変異マウスおよびホモ接合性変異マウスのコホートに対して行動スクリーニングを行った。生存能低下によってより早期の試験が必要とならない限り、すべての行動試験を12 ~ 16週齢で行った。これらの試験には、不安、活動レベルおよび探索を測定するためのオープンフィールドが含まれていた。

## 【 1 6 6 9 】

反転スクリーン試験データ：

反転するスクリーンを使用して、運動力 / 共調を測定する。訓練されていないマウスを、金属棒上に水平に配置した正方形 ( 7 . 5 c m × 7 . 5 c m ) のワイヤースクリーンの上に個別に置いた。次いで、マウスがスクリーン下になるように、その棒を 1 8 0 ° 回転させた。以下の行動応答を、1 分間の試験にわたって記録した：落下、登上せず、および登上。

## 【 1 6 7 0 】

結果：

## 【 1 6 7 1 】

## 【 化 6 7 】

遺伝子型	落下率 %		登上率 %	
+ / + (n=8)	1/8	13	7/8	87.5
- / - (n=8)	5/8	63	0/8	0

WT 集団は、落下率 3. 62 登上率 60. 04

運動力の欠損は、( - / - ) マウスまたは ( + / - ) マウスと ( + / + ) マウスとの間で落下応答が 5 0 % 異なる場合に明らかである。登上しなかった 0 / 8 もしくは 1 / 8 匹の ( - / - ) マウスまたは ( + / - ) マウスは、運動協調性障害を示す。登上した 7 / 8 もしくは 8 / 8 匹の ( - / - ) マウスまたは ( + / - ) マウスは、運動協調性の増強を示す。

## 【 1 6 7 2 】

反転スクリーン試験を、基本的な感覚および運動観察を測定するように設定する：

解析した 8 匹の ( - / - ) マウスのうち、5 匹がスクリーンから落下したのに対して、1 / 8 匹の ( + / + ) マウスが落下した。これらの結果から、変異体の運動協調性の障害が示唆される。これらの結果は、下に示すような骨関連測定値における観察結果と一致する。

## 【 1 6 7 3 】

( e ) 表現型解析：代謝 - 血液化学

代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、血糖測定を含む。マウスにおける血液化学試験を実施するために C O B A S I n t e g r a 4 0 0 ( m f r : R o c h e ) を使用した。血糖値の測定に加えて、以下の血液化学試験も日常的に行う：アルカリホスファターゼ；アラニンアミノトランスフェラーゼ；アルブミン；ビリルビン；リン；クレアチニン；B U N = 血中尿素窒素；カルシウム；尿酸；ナトリウム；カリウム；および塩化物。代謝領域では、糖尿病治療のための標的を同定することができる。血液化学表現型解析は、インスリン感受性およびグルコース代謝の変化を測定するための耐糖能試験を含む。耐糖能試験の異常な結果は、以下の障害または容態を示し得るが、これらに限定されない：1 型および 2 型糖尿病、症候群 X、種々の心血管疾患、および / または肥満症。

## 【 1 6 7 4 】

結果：

血液化学：

雌 ( - / - ) マウスは、その ( + / + ) 同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、アルカリホスファターゼ、アルブミン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、リンおよびカリウムレベルの増加を示した。

## 【 1 6 7 5 】

これらの血液化学異常は、P R O 9 8 5 2 コード遺伝子がマウスにおいてノックアウトされた場合、バイアビリティの低下の結果と一致する。

## 【 1 6 7 6 】

( f ) 骨代謝および全身診断学

10

20

30

40

50

## ( 1 ) 組織質量および除脂肪体重の測定 - D e x a

D e x a 解析 - 試験の説明 :

手順 : 野生型マウス、ヘテロ接合性マウスおよびホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギー X 線吸収測定法 ( D E X A ) を、うまく使用して総組織質量 ( T T M ) の変化を同定した。

## 【 1 6 7 7 】

A v e r t i n ( 1 . 2 5 % 2 , 2 , 2 , - トリプロモエタノール , 2 0 m L / k g 体重 ) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスを D E X A スキャンのために P I X I m u s T M デンシトメーター ( L u n a r I n c . ) のプラットフォーム上に腹臥位にした。L u n a r P I X I m u s ソフトウェアを使用して、目的の領域 ( R O I 、すなわち、全身、椎骨および両大腿骨 ) の骨塩密度 ( B M D ) および脂肪組成物 ( % 脂肪 ) および総組織質量 ( T T M ) を測定した。

身体測定 ( 体長および体重 ) :

身体測定 : 約 1 6 週齢で体長および体重の測定を行った。

## 【 1 6 7 8 】

結果 :

体重 : ( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較して、平均体重の減少を示した。

## 【 1 6 7 9 】

体長 :

解析した 2 匹の雌 ( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均体長の減少を示した。

## 【 1 6 8 0 】

## ( 2 ) 骨代謝 : 放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は :

- ・ 大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するための D E X A
- ・ 骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロ C T

を含んだ。

## 【 1 6 8 1 】

D e x a 解析 - 試験の説明 :

手順 : 野生型マウス、ヘテロ接合性マウスおよびホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギー X 線吸収測定法 ( D E X A ) を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量 ( B M C ) 、 B M C / L B M 比、容量測定による骨塩密度 ( v B M D ) 、全身 B M D 、大腿骨 B M D および椎骨 B M D を測定した。

## 【 1 6 8 2 】

A v e r t i n ( 1 . 2 5 % 2 , 2 , 2 , - トリプロモエタノール , 2 0 m L / k g 体重 ) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスを D E X A スキャンのために P I X I m u s T M デンシトメーター ( L u n a r I n c . ) のプラットフォーム上に腹臥位にした。L u n a r P I X I m u s ソフトウェアを使用して、目的の領域 ( R O I ) [ すなわち、全身、椎骨および両大腿骨 ] の骨塩密度 ( B M D ) および脂肪組成物 ( % 脂肪 ) および総組織質量 ( T T M ) を測定した。

## 【 1 6 8 3 】

結果 :

D e x a :

解析に利用可能な 2 匹の雌 ( - / - ) マウスは、歴史的平均と比較した場合、総組織マス、除脂肪体重、総体脂肪パーセント、総脂肪質量および全身骨塩量の減少を示した。しかしながら、この 2 匹の雌 ( + / + ) マウスはまた、同様の測定値の減少を示した。

10

20

30

40

50

マイクロCT：

顕著な差はなし。

しかしながら、解析に利用可能な（-/-）マウスはなかった。

【1684】

PRO9852ポリペプチドをコードする遺伝子が欠損した変異（-/-）マウスは、体重および体長の減少および組織のいそう疾患（総体脂肪（%）および脂肪質量（g）の減少）を特徴とする、成長遅延と一致する表現型を示す。したがって、PRO9852ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニストまたはインヒビターは、これらの代謝関連効果および成長関連効果を模倣するであろう。他方では、PRO9852ポリペプチドまたはその作用剤は、糖尿病または他の組織のいそう疾患などの代謝障害の予防および/または治療で有用であろう。

10

【1685】

また、DEXAによって解析した（-/-）マウスは、その（+/+）同腹仔と比較した場合、骨測定値の減少およびボディマス測定値の減少を示し、異常な骨障害が示唆された。

また、平均総組織マスおよび除脂肪体重の減少は、成長遅延および組織消耗性障害に関連する代謝障害を示す。

骨の負の表現型は、PRO9852ポリペプチドまたはそのアゴニストが、正常な成長発達に加えて骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。

さらに、PRO9852ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、PRO9852ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト（またはインヒビター）は、異常な骨代謝に関連する炎症性疾患（関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む）を含む、異常または病理学的な骨障害に導き得る。

20

【1686】

これらの所見は、病理報告および顕微鏡観察結果と一致する。

【1687】

（g）心臓学/診断 - 血圧

説明：

Visitech BP-2000血圧分析システムによる4日間の非侵襲性テールカフ法によって収縮期血圧を測定する。血圧を、4日間にわたって1日10回測定する。次いで、4日間の値を平均して、マウスの意識下収縮期血圧を得る。

30

【1688】

結果：

血圧：

解析に利用可能な2匹の雌（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、高血圧症を示す平均収縮期血圧の増大を示した。

【1689】

48,45,DNA143076-2787（UNQ3054）遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO9873ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA143076-2787と命名）（UNQ3054）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

40

NM\_020595 ムス・ムスクルスオトラプリン（otoraplin）（Otor）；参照タンパク質：

Q9JIE3 ACCESSION: Q9JIE3 NID:

ムス・ムスクルス（マウス）。

オトラプリン前駆体（黒色腫阻害活性様タンパク質）；参照ヒト遺伝子配列：NM\_020157 ACCESSION: NM\_020157 NID:

gi\_21618345 ref NM\_020157.2 ホモ・サピエンスオトラプリ

50

ン ( O T O R ) ; ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する :

Q 9 N R C 9 A C C E S S I O N : Q 9 N R C 9 N I D :

ホモ・サピエンス ( ヒト ) 。

オトラプリン前駆体 ( 繊維芽細胞由来タンパク質 ) ( 黒色腫阻害活性様タンパク質 ) 。

【 1 6 9 0 】

目的のマウス遺伝子は、ヒト O T O R のオルソログである O t o r ( オトラプリン ) である。別名としては、F d p、M I A、M I A L、C D R A P、繊維芽細胞由来タンパク質、および黒色腫阻害活性様タンパク質が挙げられる。

【 1 6 9 1 】

O T O R は、主に、蝸牛および内耳腔の感覚上皮の下方の間葉細胞層によって発現される分泌タンパク質である。

該タンパク質は、シグナルペプチドおよび S H 3 ドメインからなり、翻訳後修飾を受け、硫酸化および共有結合性ホモ二量体化をもたらす ( R e n d t o r f f e t a l . , G e n o m i c s 7 1 ( 1 ) : 4 0 - 5 2 ( 2 0 0 1 ) ; S t o l l e t a l . , P r o t e i n S c i 1 2 ( 3 ) : 5 1 0 - 9 ( 2 0 0 3 ) ; R o b e r t s o n e t a l . , G e n o m i c s 6 6 ( 3 ) : 2 4 2 - 8 ( 2 0 0 0 ) ) 。

O T O R は、細胞外マトリックスの一成分として、またはシグナル伝達リガンドとして機能している可能性がある ( B o s s e r h o f f および B u e t t n e r , H i s t o l H i s t o p a t h o l 1 7 ( 1 ) : 2 8 9 - 3 0 0 ( 2 0 0 2 ) ) 。

O T O R は、おそらく、周期的な間充組織の軟骨形成においてある役割を果たしており、発達中の耳嚢の形成に関与している。 ( C o h e n - S a l m o n e t a l . , J B i o l C h e m 2 7 5 ( 5 1 ) : 4 0 0 3 6 - 4 1 ( 2 0 0 0 ) ) 。

O T O R における変異は難聴を引き起こし得る ( C o h e n - S a l m o n e t a l . , J B i o l C h e m 2 7 5 ( 5 1 ) : 4 0 0 3 6 - 4 1 ( 2 0 0 0 ) ; R e n d t o r f f e t a l . , G e n o m i c s 7 1 ( 1 ) : 4 0 - 5 2 ( 2 0 0 1 ) ) 。

【 1 6 9 2 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

【 1 6 9 3 】

【 化 6 8 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	20	30	29	79
予測値	19.75	39.5	19.75	79

カイ二乗値 = 0 . 8 1 有意性 = 0 . 6 6 6 9 7 6 8 ( h o m / n ) = 0 . 2 7 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型 : 相同組換え ( 標準 )

説明 : コードエクソン 1 から 3 をターゲティングした ( N C B I アクセッション N M \_ 0 2 0 5 9 5 . 1 ) 。

1 . 野生型発現パネル : R T - P C R によって試験された、13 のすべての成体組織サンプル ( 脳、脊椎、眼、および胸腺 ) において標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現 : Q C 画像 : 標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によ

て確認した。

【1694】

48.45.1.表現型解析(破壊遺伝子:DNA143076-2787(UNQ3054))

(a)全体的な表現型の概要:

ヒトオトラプリン(OTOR)のオルソログをコードする遺伝子の変異により、雄(-/-)マウスにおいて不安関連応答の増大がもたらされた。遺伝子破壊をサザンブロットによって確認した。

【1695】

(b)表現型解析:CNS/神経学

10

神経学の分野において、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害を含む神経性障害および精神医学的障害の処置のためのインビボにおいて有効な標的の同定についての解析に本明細書中では注目した。神経障害は、「不安障害」として定義されるカテゴリーを含む。その「不安障害」としては、以下:軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、別段特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴うパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、I型またはII型の双極性障害、別段特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害

20

【1696】

手順:

行動スクリーニングを、4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性変異マウスおよび8匹のホモ接合性変異マウスのコホートにおいて実施した。生存能低下のために、より早期の試験が必要とならない限り、すべての行動試験は、12~16週齢の間に実施した。これらの試験は、不安、活動性レベルおよび探索を計測するためのオープンフィールドを含んだ。

30

【1697】

オープンフィールド試験:

公知の薬物のいくつかの標的は、オープンフィールド試験において表現型を示した。これらとしては、セロトニン(serotonin)トランスポーター、ドーパミントランスポーター(Giros et al., Nature, 1996 Feb 15; 379(6566):606-12)およびGABAレセプター(Homanics et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1997 Apr 15; 94(8):4143-8)のノックアウトを含む。自動化されたオープンフィールドアッセイをカスタマイズして、感情状態に関連する変化および学習に関する探索パターンを扱った。まず、フィールド(40x40cm)をマウスに対して比較的大きくなるように選択することによって探索に関連する自発運動の変化を取り上げるように設計した。さらに、4つの穴を床に設け、探索に特に関連する活動である鼻の突っ込みを可能にした。この試験に関連した感情状態を高めるためにいくつかの因子を設けた。オープンフィールド試験は、マウスが試験される最初の実験的手順であり、なされる測定は被験体のチャンバーとの最初の経験であった。さらに、オープンフィールドは明るく照らした。これらの因子のすべてによって、新しい開放性空間に関連する天然の不安が高められる。次いで、探索活動のパターンおよび程度ならびに特に中心からの全移動距離比は、不安または抑鬱症に対する罹りやすさに関する変化を識別することができる。3つの異なったレベルでの赤外線ビームを用いた大きな活動領域(40cmx40cm、AccuScan InstrumentsのVersaMax動物活動性モニターシステム)を用いて、直立、穴への

40

50

突っ込みおよび自発運動を記録した。動物を中心に置き、その活動を20分間測定した。この試験のデータを4分間隔で5回分析した。全移動距離(c m)、垂直移動回数(直立)、穴突っ込み回数および中心からの全移動距離比を記録した。

#### 【1698】

マウスが新しい環境に対して正常な慣れ応答を示す傾向を、5回の間隔にわたるその水平自発運動の変化すべてを測定することにより評価する。経時的な活動性の変化のこの算定傾きは、絶対値ではなく正規化された全移動距離を使用して決定する。傾きは5回の間隔のそれぞれにおける正規化された活動を通しての回帰直線から決定する。正常な慣れは、負の傾きの値によって表される。

#### 【1699】

結果：

不安：雄(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較して、オープンフィールド試験中の中心にいる時間の合計の中央値の減少を示したことから、変異体における不安様応答の増大が示唆される。

(-/-)マウスは、(+/-)マウスと比較した場合、2、3および5回の間隔で中心にいる時間の合計の中央値の減少を示し、(-/-)マウスにおける不安の増大-様応答が示唆された。

#### 【1700】

まとめると、オープンフィールド試験により、軽度から中程度の不安、全般的病状による不安および/もしくは双極性障害；活動亢進；感覚障害；強迫性障害、精神分裂病または妄想性人格に関連し得る不安の増大に関連する表現型が明らかになった。したがって、PRO9873ポリペプチドまたはそのアゴニストは、そのような神経障害の処置に有用であり得る。

#### 【1701】

48.46.DNA144841-2816(UNQ3115)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO10196ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA144841-2816と命名)(UNQ3115)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_020013 ムス・ムスクルス線維芽細胞増殖因子21(Fgf21)；参照タンパク質：

Q9JJN1 ACCESSION: Q9JJN1 NID:

ムス・ムスクルス(マウス)。

Fibroblast増殖因子-21前駆体(FGF-21)；参照ヒト遺伝子配列：NM\_019113

ACCESSION: NM\_019113 NID: 9506596

ホモ・サピエンスホモ・サピエンス線維芽細胞増殖因子21(FGF21)；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q9NSA1 ACCESSION: Q9NSA1 NID:

ホモ・サピエンス(ヒト)。

FIBROBLAST GROWTH FACTOR-21 PRECURSOR(FGF-21)。

#### 【1702】

目的のマウス遺伝子は、ヒトFGF21のオルソログであるFgf21(線維芽細胞増殖因子21)である。

別名としては、FGF-21およびUNQ3115が挙げられる。

#### 【1703】

FGF21は、主に肝臓で発現される推定分泌タンパク質である。該209アミノ酸タンパク質は、シグナルペプチドおよび線維芽細胞増殖因子(FGF)ドメインを含む(PfamアクセッションPF00167)。

10

20

30

40

50

F G F 2 1 は、シグナル伝達リガンドとして機能している可能性がある ( N i s h i m u r a e t a l . , B i o c h i m B i o p h y s A c t a 1 4 9 2 ( 1 ) : 2 0 3 - 6 ( 2 0 0 0 ) ) 。

#### 【 1 7 0 4 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

10

#### 【 1 7 0 5 】

##### 【 化 6 9 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	17	49	21	87
予測値	21.75	43.5	21.75	87

カイ二乗値 = 2 . 4 5 有意性 = 0 . 2 9 3 7 5 7 7 ( h o m / n ) = 0 . 2 5 平均同腹仔数 = 9

20

#### 変異情報

変異型：相同組換え ( 標準 )

説明：コードエクソン 1 から 3 をターゲティングした ( N C B I アクセッション N M \_ 0 2 0 0 1 3 . 2 ) 。

1 . 野生型発現パネル：R T - P C R によって試験された、1 3 の成体組織サンプルのうち、脳のみにおいて標的遺伝子の発現を検出した。

2 . Q C 発現：Q C 画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【 1 7 0 6 】

4 8 . 4 6 . 1 . 表現型解析 ( 破壊遺伝子：D N A 1 4 4 8 4 1 - 2 8 1 6 ( U N Q 3 1 1 5 )

30

( a ) 全体的な表現型の概要：

ヒト線維芽細胞増殖因子 2 1 ( F G F 2 1 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、平均血清コレステロールおよびグルコースレベルの増加を示す ( - / - ) マウスがもたらされた。変異型 ( - / - ) マウスはまた、総組織マスおよび総体脂肪の増加を示した。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

#### 【 1 7 0 7 】

( b ) 表現型解析：心臓学

心臓血管生物学の分野において、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠動脈疾患、異常脂肪血症 ( 例えば、高コレステロール ( 高コレステロール血症 ) および血清トリグリセリドの増加 ( 高トリグリセリド血症 ) )、糖尿病および / または肥満症の処置のための標的を本明細書中で同定した。表現型試験は、血清コレステロールおよび血清トリグリセリドの測定を含んでいた。

40

#### 【 1 7 0 8 】

##### 血中脂質

手順：4 匹の野生型マウス、4 匹のヘテロ接合性マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートを、このアッセイで試験した。高いコレステロールレベルおよび血中トリグリセリドレベルの上昇は、心血管疾患および / または糖尿病の発症における認識された危険因子である。血中脂質の測定により、血中脂質レベルを制御する生物学的スイッチの発見

50



が容易になる。血中脂質レベルを上昇させる因子の阻害は、心血管疾患リスクの軽減に有用であり得る。これらの血液化学試験では、C O B A S I n t e g r a 4 0 0 ( m f r : R o c h e ) を使用して測定値を記録した。

【 1 7 0 9 】

結果：

血液化学：( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較して、平均血清中コレステロールレベルの上昇を示した。

【 1 7 1 0 】

上記に概要を示したように、( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清コレステロールレベルの増加を示した。

したがって、P R O 1 0 1 9 6 遺伝子が欠損した変異マウスは、心血管疾患のモデルとして役立ち得る。P R O 1 0 1 9 6 ポリペプチドまたはそのコード遺伝子は、コレステロールなどの血中脂質の制御に有用であり得る。したがって、P R O 1 0 1 9 6 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠状動脈疾患、高コレステロール血症、糖尿病および / または肥満症のような心血管疾患の処置に有用であり得る。

【 1 7 1 1 】

( c ) 表現型解析：代謝 - 血液化学

代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、血糖測定を含む。マウスにおける血液化学試験を実施するために C O B A S I n t e g r a 4 0 0 ( m f r : R o c h e ) を使用した。代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。

【 1 7 1 2 】

結果：

ホモ接合性 ( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清グルコースレベルの上昇を示した。

【 1 7 1 3 】

したがって、変異型 ( - / - ) マウスは、グルコース代謝の変化または糖尿病と関連するものであり得る高血糖症を示した。

P R O 1 0 1 9 6 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、正常なグルコースレベル / 代謝の維持に有用であり得、おそらく糖尿病の処置に有用であり得る。

【 1 7 1 4 】

( d ) 骨代謝および全身診断学 / 放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するための D E X A
- ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロ C T

を含んだ。

【 1 7 1 5 】

D e x a 解析 - 試験の説明：

手順：4 匹の野生型マウス、4 匹のヘテロ接合性マウスおよび 8 匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギー X 線吸収測定法 ( D E X A ) を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量 ( B M C )、B M C / L B M 比、容量測定による骨塩密度 ( v B M D )、全身 B M D、大腿骨 B M D および椎骨 B M D を測定した。

【 1 7 1 6 】

A v e r t i n ( 1 . 2 5 % 2 , 2 , 2 , - トリプロモエタノール , 2 0 m L / k g 体重 ) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そ

10

20

30

40

50

のマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンスitomーター(Lunar Inc.)のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域(ROI)[すなわち、全身、椎骨および両大腿骨]の骨塩密度(BMD)および脂肪組成物(%脂肪)および総組織質量(TTM)を測定した。

【1717】

結果：

雄(-/-)マウスは、その性別一致野生型(+/+)同腹仔および歴史的平均と比較した場合、総組織マスおよび総体脂肪(%およびg)の増加を示した。

【1718】

これらの研究により、変異(-/-)非ヒトトランスジェニック動物が肥満に関連し得る負の表現型を示すことが示唆される。したがって、PRO10196ポリペプチドまたはその作用剤は、正常な成長および代謝過程に不可欠であり、肥満または他の成長関連障害の予防および/または治療で特に重要であろう。

【1719】

48.47.DNA220432(UNQ3966)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO34778ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA220432と命名)(UNQ3966)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

該変異型マウス遺伝子は、以下のものに対応する。ヌクレオチド参照：NM\_\_130866ムス・ムスクルス嗅神経受容体78(Olf78)；参照タンパク質：

Q8VBV9 Q8VBV9 Q8VBV9 OLFACTORY RECEPTOR MOR18-2 PROSTATE-SPECIFIC；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_\_030774 ACCESSION：NM\_\_030774 NID：19923630ホモ・サピエンスホモ・サピエンス嗅神経受容体、ファミリー51、サブファミリーE、構成員2(OR51E2)；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q9H255 OXE2\_HUMAN Q9H255 OLFACTORY RECEPTOR 51E2 PROSTATE SPECI.

目的のマウス遺伝子は、ヒトOR51E2(嗅神経受容体、ファミリー51、サブファミリーE、構成員2)のオルソログであるOlf78(嗅神経受容体78)である。別名としては、PSGR；RA1c；MOL2.3；MOR18-2；4633402A21Rik；嗅神経受容体MOR18-2；GA\_\_x6K02T2PBj9-5459657-5458695；OR52A2；OR51E3P；嗅神経受容体OR11-16；前立腺特異的Gタンパク質共役受容体；嗅神経受容体、ファミリー52、サブファミリーA、構成員2；嗅神経受容体、ファミリー51、サブファミリーE、構成員3偽遺伝子が挙げられる。

【1720】

OR51E2は、主に前立腺において発現される内在性膜タンパク質であり、おそらくGタンパク質共役受容体としての機能を果たしている。

該タンパク質は、7回膜貫通受容体(ロドプシンファミリー)ドメイン(PFAMアクセションPF00001)を含み、嗅神経受容体ファミリー構成員と著しい類似性を示し、GNA12(グアニンヌクレオチド結合タンパク質[Gタンパク質]12)と相互作用する。

OR51E2はまた、ヒトの嗅神経組織および脳の延髄、マウスの脳および結腸、ならびにラットの脳および肝臓においても発現される(Xu et al., Cancer Res 60(23):6568-72(2000)；Yuan et al., Gene 278(1-2):41-51(2001)；Xia et al., Oncogene 20(41):5903-7(2001))。

OR51E2の発現は、多くの場合で前立腺癌において上方調節され、該タンパク質が前

10

20

30

40

50

立腺癌の早期検出および処置に有用であり得ることを示唆する (Weng et al., Int J Cancer 113 (5): 811-8 (2005))。

#### 【1721】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹 (ES) 細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

10

#### 【1722】

##### 【化70】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	18	25	18	61
予測値	15.25	30.5	15.25	61

カイ二乗値 = 0.32 有意性 = 0.85214376 (hom/n) = 0.27 平均同腹仔数 = 8

変異情報

20

変異型：相同組換え (標準)

説明：コードエクソン1をターゲティングした (NCBIアクセッションNM\_130866.2)。

1. 野生型発現パネル：RT-PCRによって試験された、胚性幹細胞 (ES) 細胞および26のすべての成体組織サンプル (肝臓および脂肪以外) において標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現：QC画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【1723】

48.47.1. 表現型解析 (破壊遺伝子：DNA220432 (UNQ3966))

30

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒト嗅神経受容体、ファミリー51、サブファミリーE、構成員2 (OR51E2) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、総組織マスおよび総体脂肪の増加ならびにコレステロールレベルの増加を示す (-/-) マウスがもたらされた。耐糖能の向上もまた変異型 (-/-) マウスにおいて観察された。

神経学試験により、ホモ接合性マウスにおいてストレス誘導型高体温が示された。遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

#### 【1724】

(b) 表現型解析：心臓学

心臓血管生物学の分野において、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠動脈疾患、異常脂肪血症 (例えば、高コレステロール (高コレステロール血症) および血清トリグリセリドの増加 (高トリグリセリド血症))、糖尿病および/または肥満症の処置のための標的を本明細書中で同定した。表現型試験は、血清コレステロールおよび血清トリグリセリドの測定を含んでいた。

40

#### 【1725】

血中脂質

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートを、このアッセイで試験した。高いコレステロールレベルおよび血中トリグリセリドレベルの上昇は、心血管疾患および/または糖尿病の発症における認識された危険因子である。血中脂質の測定により、血中脂質レベルを制御する生物学的スイッチの発見

50

が容易になる。血中脂質レベルを上昇させる因子の障害は、心血管疾患リスクの軽減に有用であり得る。これらの血液化学試験では、C O B A S I n t e g r a 4 0 0 ( m f r : R o c h e ) を使用して測定値を記録した。

【 1 7 2 6 】

結果：

血液化学：( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較して、平均血清中コレステロールレベルの上昇を示した。

【 1 7 2 7 】

上記に概要を示したように、( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清コレステロールレベルの増加を示した。

したがって、P R O 3 4 7 7 8 遺伝子が欠損した変異マウスは、心血管疾患のモデルとして役立つ。P R O 3 4 7 7 8 ポリペプチドまたはそのコード遺伝子は、コレステロールなどの血中脂質の制御に有用であり得る。したがって、P R O 3 4 7 7 8 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、心不全、脳卒中、様々な冠状動脈疾患、高コレステロール血症、糖尿病および / または肥満症のような心血管疾患の処置に有用であり得る。

【 1 7 2 8 】

( c ) 表現型解析：代謝 - 血液化学 / 耐糖能

代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、血糖測定を含む。マウスにおける血液化学試験を実施するために C O B A S I n t e g r a 4 0 0 ( m f r : R o c h e ) を使用した。代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、インスリン感度およびグルコース代謝の変化を測定する耐糖能試験を含む。異常な耐糖能試験結果は、以下の障害または状態：1 型糖尿病および 2 型糖尿病、シンドローム X、様々な循環器疾患および / または肥満症を示唆し得るが、これらに限定されない。

【 1 7 2 9 】

手順：2 匹の野生型および 4 匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイに使用した。耐糖能試験は、哺乳動物における損傷したグルコースホメオスタシスを定義するための標準的な試験である。L i f e s c a n 血糖測定器を使用して耐糖能試験を行った。2 0 % 溶液として送達される 2 g / k g の D - グルコースを動物に I P 注射し、血糖値を注射の 0、3 0、6 0 および 9 0 分後に測定した。

【 1 7 3 0 】

結果：

耐糖能試験：変異 ( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔と比較した場合、耐糖能の増強を示した。

【 1 7 3 1 】

これらの研究において、変異型 ( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較した場合、試験した 3 回すべてで、正常な空腹時グルコースの存在下、耐糖能の増加または向上を示した。したがって、ノックアウトマウスは、インスリン感受性の増加またはグルコースホメオスタシス障害の反対の表現型パターンを示し、そのようなものとして、P R O 3 4 7 7 8 ポリペプチドまたはそのコード遺伝子に対するアンタゴニスト ( インヒビター ) は、グルコースホメオスタシス障害の治療で有用であろう。

【 1 7 3 2 】

( d ) 骨代謝および全身診断学 / 放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治療を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するための D E X A
- ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロ C T

10

20

30

40

50

を含んだ。

#### 【1733】

D e x a 解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法（D E X A）を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量（B M C）、B M C / L B M 比、容量測定による骨塩密度（v B M D）、全身 B M D、大腿骨 B M D および椎骨 B M D を測定した。

#### 【1734】

A v e r t i n ( 1 . 2 5 % 2 , 2 , 2 , - トリプロモエタノール , 2 0 m L / k g 体重 ) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスを D E X A スキャンのために P I X I m u s T M デンシトメーター ( L u n a r I n c . ) のプラットフォーム上に腹臥位にした。L u n a r P I X I m u s ソフトウェアを使用して、目的の領域 ( R O I ) [ すなわち、全身、椎骨および両大腿骨 ] の骨塩密度 ( B M D ) および脂肪組成物 ( % 脂肪 ) および総組織質量 ( T T M ) を測定した。

#### 【1735】

結果：

雄 ( - / - ) マウスは、その性別一致野生型 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較した場合、総組織マスおよび総体脂肪 ( % および g ) の増加を示した。

#### 【1736】

これらの研究により、変異 ( - / - ) 非ヒトトランスジェニック動物が肥満に関連し得る負の表現型を示すことが示唆される。したがって、P R O 3 4 7 7 8 ポリペプチドまたはその作用剤は、正常な成長および代謝過程に不可欠であり、肥満の予防および / または治療で特に重要であろう。

#### 【1737】

( e ) 表現型解析：C N S / 神経学

神経学の分野において、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害を含む神経性障害および精神医学的障害の処置のためのインビボにおいて有効な標的の同定についての解析に本明細書中では注目した。神経障害は、「不安障害」として定義されるカテゴリーを含む。その「不安障害」としては、以下：軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、別段特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴うパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、I 型またはII型の双極性障害、別段特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害にあてはまることがあり、その人格障害としては、以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【1738】

手順：

行動スクリーニングを、4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性変異マウスおよび8匹のホモ接合性変異マウスのコホートにおいて実施した。生存能低下のために、より早期の試験が必要とならない限り、すべての行動試験は、12～16週齢の間に実施した。これらの試験は、不安、活動性レベルおよび探索を計測するためのオープンフィールドを含んだ。

#### 【1739】

機能観察バッテリー ( F O B ) 試験 - ストレス誘導過温症：

F O B は、全身感覚および運動欠陥を測定するために動物に適用される一連の状態である。全身の神経機能を評価する I r w i n 神経性のスクリーニングからの試験のサブセッ

10

20

30

40

50

トを使用する。一般に、短期間、触覚、嗅覚および視覚の刺激を動物に適用することにより、それらが正常に検知および応答する能力を測定する。これらの簡単な試験は、約10分を要し、マウスは、試験後、ホームケージに戻される。

#### 【1740】

結果：

不安：（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔および歴史的平均と比較して、ストレス誘導性高熱に対する感受性が増加し、変異体における不安様応答の増加が示唆された。まとめると、機能観察試験により、軽度から中等度の不安、一般的病状に起因する不安、および/または双極性障害、活動亢進、感覚障害、強迫性障害、分裂病、または偏執性人格に関連し得る不安の増加に関連する表現型が明らかとなった。したがって、P R O 3 4 7 7 8 ポリペプチドまたはその作用剤は、このような神経障害の治療で有用であろう。

10

#### 【1741】

48.48.DNA165608（UNQ6208）遺伝子破壊を含むマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験では、P R O 2 0 2 3 3 ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA165608と示す）（UNQ6208）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報を以下に示す：変異マウス遺伝子は、以下に対応する：参照ヌクレオチド：NM\_\_178257 ACCESSION：NM\_\_178257 NID：gi\_30142708 ref NM\_\_178257.1ムス・ムスクルスインターロイキン22 受容体、1（IL22ra1）；参照タンパク質：Q80XZ4 ACCESSION：Q80XZ4 NID：ムス・ムスクルス（マウス）。

20

インターロイキン-22 受容体 鎖；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_\_021258 ACCESSION：NM\_\_021258 NID：

gi\_31317238 ref NM\_\_021258.2ホモ・サピエンスインターロイキン22 受容体、1（IL22RA1）；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q9HB22 ACCESSION：Q9HB22 NID：

ホモ・サピエンス（ヒト）。

30

#### 【1742】

目的のマウス遺伝子は、ヒトIL22RA1のオルソログであるIL22ra1（インターロイキン22受容体、1）である。別名としては、IL22r、IL-22R、C R F 2 - 9、およびインターロイキン-22受容体 鎖が挙げられる。

#### 【1743】

IL22RA1は、IL22受容体複合体のサブユニットとしての機能を果たすI型内在性原形質膜タンパク質である。IL22受容体複合体は、IL22RA1およびインターロイキン10受容体（IL10RB）の両方からなり、これらは、T細胞によって放出されるインターロイキン22（IL22）と結合する（Xie et al., J Biol Chem 275(40):31335-9(2000); Kotenko et al., J Biol Chem 276(4):2725-32(2001)）。IL22受容体複合体の活性化により、JAK/STAT経路を介して遺伝子転写が刺激され得、いくつかのMAPキナーゼ経路が活性化され得る（Xie et al., J Biol Chem 275(40):31335-9(2000); Aggarwal et al., J Interferon Cytokine Res 21(12):1047-53(2001); Lejeune et al., J Biol Chem 277(37):33676-82(2002)）。

40

IL22RA1は、肝臓、腎臓、脾臓、小腸、結腸、血管内皮および皮膚ケラチノサイトにおいて発現される（Kotenko et al., J Biol Chem 276

50

(4): 2725-32 (2001); Aggarwal et al., J Interferon Cytokine Res 21 (12): 1047-53 (2001); Ramesh et al., Cancer Res 63 (16): 5105-13 (2003); Wolk et al., Immunity 21 (2): 241-54 (2004)。

さらに、IL22RA1発現は、リポ多糖による刺激に応答して肝臓において (Tachibiri et al., Genes Immun 4 (2): 153-9 (2003)) およびインターフェロン- に応答してケラチノサイト (Wolk et al., Immunity 21 (2): 241-54 (2004)) 上方調節される。

IL22RA1は、先天性免疫 (Wolk et al., Immunity 21 (2): 241-54 (2004))、肝臓損傷の予防および修復 (Radaeva et al., Hepatology 39 (5): 1332-42 (2004))、血管形成 (Ramesh et al., Cancer Res 63 (16): 5105-13 (2003))、ならびに癌細胞のアポトーシス (Sauane et al., J Cell Physiol 196 (2): 334-45 (2003)) においてある役割を果たしている可能性がある。

#### 【1744】

ターゲティングされたか遺伝子トラップされた変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹 (ES) 細胞で行った。キメラマウスを、C57BL/6Jアルビノマウスと交配してF1ヘテロ接合体動物を作製する。これらの子孫を交雑受精してF2野生型子孫、ヘテロ接合体変異子孫、およびホモ接合体変異子孫を作製する。稀に、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合、F1ヘテロ接合体マウスを、129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑してさらなるヘテロ接合体動物を作製し、これを交雑受精してF2マウスを作製する。この世代由来のマウスに対してレベルI表現型解析を行う。

#### 【1745】

#### 【化71】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	17	37	13	67
予測値	16.75	33.5	16.75	67

カイ二乗 = 0.46 有意性 = 0.7945336 (hom/n) = 0.23 平均同腹仔数 = 7

#### 変異情報

変異型：相同組換え (標準)

説明：コードエクソン2から4をターゲティングした (NCBIアクセッションNM\_178257.1)。

1. 野生型発現パネル：RT-PCRによって試験された、胚性幹細胞 (ES) 細胞および13のすべての成体組織サンプル (骨格筋および骨以外) において標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現：QC画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【1746】

48.48.1. 表現型解析 (破壊遺伝子：DNA165608 (UNQ6208))

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒトインターロイキン22受容体、1 (IL22RA1) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、小型の雌 (-/-) マウスがもたらされた。

雌ホモ接合性変異型マウスは、その性別一致野生型同腹仔よりも小さく、体重および体長の減少、総組織マスの減少、および除脂肪体重の減少ならびに骨塩量および骨中無機質密度の測定値の減少を示した。

標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【1747】

(b) 発現

UNQ6208は、脾臓の腫瘍において過剰発現される。

[ プロトコルの実施例54および55を参照 ]

(c) 骨代謝および骨診断

(1) 組織質量および除脂肪体重の測定 - Dexa

Dexa解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法 (DEXA) を、うまく使用して総組織質量 (TTM) の変化を同定した。

10

【1748】

Avertin (1.25% 2, 2, 2, -トリプロモエタノール, 20 mL / kg 体重) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンスitomーター (Lunar Inc.) のプラットフォーム上に腹臥位にした。Lunar PIXImusソフトウェアを使用して、目的の領域 (ROI、すなわち、全身、椎骨および両大腿骨) の骨塩密度 (BMD) および脂肪組成物 (%脂肪) および総組織質量 (TTM) を測定した。

【1749】

身体測定 (体長および体重) :

身体測定：約16週齢で体長および体重の測定を行った。

20

【1750】

結果：

体重：

(-/-) マウスは、その (+/+) 同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均体重の減少を示し、その差は雌においてより顕著であった。

【1751】

体長：

雌 (-/-) マウスは、その (+/+) 同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均体長の減少を示した。

30

【1752】

(2) 骨代謝：放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのDEXA
- ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCTを含んだ。

40

【1753】

Dexa解析 - 試験の説明：

手順：4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性マウスおよび8匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX線吸収測定法 (DEXA) を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量 (BMC)、BMC / LBM比、容量測定による骨塩密度 (vBMD)、全身BMD、大腿骨BMDおよび椎骨BMDを測定した。

【1754】

Avertin (1.25% 2, 2, 2, -トリプロモエタノール, 20 mL / kg 体重) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをDEXAスキャンのためにPIXImusTMデンスitomーター (Lunar

50



I n c . ) のプラットフォーム上に腹臥位にした。L u n a r P I X I m u s ソフトウェアを使用して、目的の領域 ( R O I ) [ すなわち、全身、椎骨および両大腿骨 ] の骨塩密度 ( B M D ) および脂肪組成物 ( % 脂肪 ) および総組織質量 ( T T M ) を測定した。

【 1 7 5 5 】

結果：

D e x a :

雌 ( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔のものおよび歴史的平均と比較した場合、平均総組織マス、除脂肪体重、骨塩量、ならびに骨中無機質密度 ( 全身 B M D 、大腿骨 B M D および椎骨 B M D ) の顕著な減少を示した。

【 1 7 5 6 】

P R O 2 0 2 3 3 ポリペプチドをコードする遺伝子が欠失した変異型雌 ( - / - ) マウスは、体重および体長ならびに総組織マスおよび除脂肪体重の減少が顕著な成長遅延と一致する表現型を示す。したがって、P R O 2 0 2 3 3 ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニストまたはインヒビターは、これらの代謝効果および成長関連効果模倣し得る。他方で、P R O 2 0 2 3 3 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、糖尿病または他の組織るいそう疾患などの代謝障害の予防および / または処置に有用であり得る。

【 1 7 5 7 】

また、D E X A によって解析した ( - / - ) マウスは、その ( + / + ) 同腹仔と比較した場合、骨測定値の減少およびボディマス測定値の減少を示し、異常な骨障害が示唆された。

( - / - ) マウスは、骨代謝障害を反映する異常な骨測定値の減少を含む負の骨表現型を示した。

また、平均総組織マスおよび除脂肪体重の減少は、成長遅延および組織消耗性障害に関連する代謝障害を示す。

骨の負の表現型は、P R O 2 0 2 3 3 ポリペプチドまたはそのアゴニストが、正常な成長発達に加えて骨ホメオスタシスの維持に有用であり得ることを示唆する。

さらに、P R O 2 0 2 3 3 ポリペプチドは、骨の治癒または関節炎もしくは骨粗鬆症の処置に有用であり得る一方で、P R O 2 0 2 3 3 ポリペプチドまたはそのコード遺伝子のアンタゴニスト ( またはインヒビター ) は、関節炎、骨粗鬆症および骨減少症を含む異常な骨代謝に関連する炎症性疾患を含む異常な骨障害または病理学的な骨障害に導き得る。

【 1 7 5 8 】

4 8 . 4 9 . D N A 1 7 8 5 1 1 - 2 9 8 6 ( U N Q 6 9 7 3 ) 遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、P R O 2 1 9 5 6 ポリペプチドをコードする遺伝子 ( D N A 1 7 8 5 1 1 - 2 9 8 6 と命名 ) ( U N Q 6 9 7 3 ) を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

N M \_ 0 1 1 7 1 9 ムス・ムスクルスウイングレス ( ウイングレス ) 型 M M T V 組込み部位 9 B ( W n t 9 b ) ; 参照タンパク質 : O 3 5 4 6 8 W n t - 9 b タンパク質前駆体 ( W n t - 1 5 ) ( W n t - 1 4 b ) g i | 1 8 1 8 1 9 1 7 | d b j | B A B 8 3 8 6 6 . 1 | W n t 1 4 b [ ムス・ムスクルス ] ; 参照ヒト遺伝子配列：

N M \_ 0 0 3 3 9 6 A C C E S S I O N : N M \_ 0 0 3 3 9 6 N I D : g i 1 7 0 1 7 9 7 5 r e f N M \_ 0 0 3 3 9 6 . 1 ホモ・サピエンスウイングレス型 M M T V 組込み部位ファミリー、構成員 1 5 ( W N T 1 5 ) ; ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

O 1 4 9 0 5 A C C E S S I O N : O 1 4 9 0 5 N I D :

ホモ・サピエンス ( ヒト ) 。

W N T - 1 5 P R O T E I N P R E C U R S O R ( W N T - 1 4 B ) 。

【 1 7 5 9 】

目的のマウス遺伝子は、ヒト W N T 9 B ( ウイングレス型 M M T V 組込み部位ファミリ

10

20

30

40

50

一、構成員 9 B) のオルソログである Wnt 9 b (ウイングレス型 MMTV 組込み部位 9 B) である。別名としては、Wnt 14 b、Wnt 15、ウイングレス型 MMTV 組込み部位 15、およびウイングレス型 MMTV 組込み部位ファミリー構成員 15 が挙げられる。

#### 【1760】

WNT 9 B は、おそらく、G タンパク質共役受容体の縮れファミリーの構成員のリガンドとしての機能を果たしている分泌タンパク質である (Kato h、Int J Mol Med 9 (6) : 579 - 84 (2002))。

該タンパク質は、発達中ではほとんどの組織において、および成体期では腎臓および脳において発現される (Qian et al., Genomics 81 (1) : 34 - 46 (2003); Kirikoshi et al., Int J Oncol 19 (5) : 947 - 52 (2001); Kirikoshi and Kato h、Int J Mol Med 9 (2) : 135 - 9 (2002))。

WNT 9 B は、胚形成および神経分化においてある役割を果たしている可能性がある (Kirikoshi et al., Int J Oncol 19 (5) : 947 - 52 (2001); Kirikoshi and Kato h、Int J Mol Med 9 (2) : 135 - 9 (2002))。

WNT 9 B の過剰発現は、ある種の型の乳癌においてある役割を果たしている可能性がある (Qian et al., Genomics 81 (1) : 34 - 46 (2003))、WNT 9 B 遺伝子の破壊によりマウスにおいて口唇口蓋裂が引き起こされ得る (Juriloff et al., Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 73 (2) : 103 - 13 (2005))。

#### 【1761】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 129 S v E v B r d 由来の胚性幹 (ES) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C57BL/6 J アルビノマウスと交雑させ、F1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1 ヘテロ接合性マウスを 129 S v E v B r d / C57 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

#### 【1762】

##### 【化72】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	19	38	0	57
予測値	14.25	28.5	14.2	57

カイ二乗値 = 15.61 有意性 = 4.076915E - 4 (hom / n) = 0.09 平均同腹仔数 = 8

変異情報

変異型：相同組換え (標準)

説明：コードエクソン 2 から 4 をターゲティングした (NCBI アクセッション NM\_011719.2)。

1. 野生型発現パネル：RT-PCR によって試験された、胚性幹細胞 (ES) 細胞および 13 のすべての成体組織サンプル (骨格筋; 骨; および胃; 小腸、および結腸以外) において標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC 発現：QC 画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【1763】

48.49.1. 表現型解析 (破壊遺伝子: DNA 178511 - 2986 (UNQ 6

973)

(a) 全体的な表現型の概要:

ヒトウイングレス型MMTV組込み部位ファミリー、構成員9B(WNT9B)のオルソログをコードする遺伝子の変異により、(-/-)変異型の致死がもたらされた。遺伝子情報により、この変異によってホモ接合性変異型の致死がもたらされたことが示される。

ヘテロ接合性マウスでは、顕著な表現型は観察されなかった。標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【1764】

(b) 病理学

10

顕微鏡的: 12.5日目に、41個の胚: 10個の(-/-)胚、18個の(+/-)胚、7個の(+/+)胚、5個の再吸収モル(resorption moles)および1個の不確定な胚が観察された。

しかしながら、(-/-)胚では、構造的発達異常は検出されなかった。

遺伝子発現: LacZ活性は、免疫組織化学によって組織パネルにおいて検出されなかった。

【1765】

致死性の胚の発達異常に関連する考察:

ノックアウトマウスにおける胚性致死は、通常、種々の重篤な発生上の問題(神経変性疾患、血管障害、炎症性疾患が挙げられるが、これらに限定されない)によって生じるか、または遺伝子/タンパク質が多く細胞型において基礎的な細胞シグナル伝達プロセスで重要な役割を果たす場合に生じる。さらに、胚性致死マウスは、潜在的な癌モデルとして有用である。同様に、対応するヘテロ接合性(+/-)変異動物は、これらがノックアウトされた遺伝子の機能に関する非常に有益な手がかりを明らかにする表現型および/または病理学報告を示す場合に特に有用である。例えば、EPOノックアウト動物は胚致死性を示したが、胚に関する病理学報告は、RBCの著しい欠如を示した。

20

【1766】

48.50.DNA269238(UNQ8782)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO57290ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA269238と命名)(UNQ8782)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである: 変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する: 参照ヌクレオチド:

NM\_032398 ACCESSION: NM\_032398 NID:

gi\_14161697 ref NM\_032398.1 ムス・ムスクルス細胞膜小胞会合タンパク質(Plvap); 参照タンパク質:

Q99JB1 ACCESSION: Q99JB1 NID:

ムス・ムスクルス(マウス)。

PV1タンパク質; 参照ヒト遺伝子配列:

NM\_031310 ACCESSION: NM\_031310 NID:

gi\_13775237 ref NM\_031310.1 ホモ・サピエンス細胞膜小胞会合タンパク質(PLVAP); ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する:

Q9BX97 ACCESSION: Q9BX97 NID:

ホモ・サピエンス(ヒト)。

PV1タンパク質。

40

【1767】

目的のマウス遺伝子は、ヒトPLVAPのオルソログであるPlvap(細胞膜小胞会合タンパク質)である。別名としては、PV-1、MECA32、PV1、FELS、gp68、および有窓内皮関連構造タンパク質が挙げられる。

【1768】

50

PLVAPは、小窩の両方の気孔隔膜、経内皮チャネルs、および小胞空砲 (vesiculovacuolar) 細胞小器官ならびに内皮窓の隔壁と関連しているII型内在性原形質膜タンパク質である。該タンパク質は、おそらく、これらの隔壁の形成および構造においてある役割を果たしており、溶質の選択的バリアとしての機能を果たす。

PLVAPは、血液脳関門の発達および微小血管の透過性などのプロセスにおいてある役割を果たしている可能性がある (Hallmann et al., Dev Dyn 202 (4): 325-32 (1995); Stan et al., Genomics 72 (3): 304-13 (2001); Stan, Am J Physiol Heart Circ Physiol 286 (4): H1347-53 (2004))。

PLVAPはまた、さまざまな内分泌および非内分泌細胞、例えば、膵島細胞、神経葉下垂体細胞、黄体細胞、成体細精管内の生殖細胞、新生児精巣の間質細胞、および発達中の卵胞の卵胞膜細胞層などにおいても発現される (Hnasko et al., J Endocrinol 175 (3): 649-61 (2002))。

【1769】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹 (ES) 細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

【1770】

【化73】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	22	42	18	82
予測値	20.5	41	20.5	82

カイ二乗値 = 1.77 有意性 = 0.41271418 (hom/n) = 0.22 平均同腹仔数 = 8

変異情報

変異型：相同組換え (標準)

説明：コードエクソン1をターゲティングした (NCBIアクセッションNM\_032398.1)。

1. 野生型発現パネル：RT-PCRによって試験された、胚性幹細胞 (ES) 細胞および13のすべての成体組織サンプル (骨以外) において標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現：QC画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

【1771】

48.50.1. 表現型解析 (破壊遺伝子：DNA269238 (UNQ8782))

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒト細胞膜小胞会合タンパク質 (PLVAP) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、オープンフィールド試験において不安の減少を示す変異型 (-/-) マウスがもたらされた。

変異型 (-/-) マウスはまた、平均血清グルコースレベルの低下を示した。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

【1772】

(b) 発現

UNQ8782は腎臓明細胞癌において過剰発現される。

[ プロトコルの実施例54および55を参照 ]

## (c) 表現型解析：CNS / 神経学

神経学の分野において、抑鬱症、全般性不安障害、注意欠陥多動性障害、強迫性障害、精神分裂病、認知障害、痛覚過敏および感覚障害を含む神経性障害および精神医学的障害の処置のためのインピボにおいて有効な標的の同定についての解析に本明細書中では注目した。神経障害は、「不安障害」として定義されるカテゴリーを含む。その「不安障害」としては、以下：軽度から中程度の不安、全般的病状による不安障害、別段特定されない不安障害、全般性不安障害、パニック発作、広場恐怖症を伴うパニック障害、広場恐怖症を伴わないパニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会恐怖症、特定の恐怖症、物質誘導性不安障害、急性アルコール禁断、強迫性障害、広場恐怖症、I型またはII型の双極性障害、別段特定されない双極性障害、循環病、抑鬱性障害、大鬱性障害、気分障害、物質誘導性気分障害が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不安障害は、人格障害にあてはまることもあり、その人格障害としては、以下のタイプ：妄想性、反社会性、回避行動、境界性人格障害、依存性、演技性、自己愛性、強迫性、分裂性および統合失調型が挙げられるがこれらに限定されない。

10

20

30

40

50

## 【1773】

手順：

行動スクリーニングを、4匹の野生型マウス、4匹のヘテロ接合性変異マウスおよび8匹のホモ接合性変異マウスのコホートにおいて実施した。生存能低下のために、より早期の試験が必要とならない限り、すべての行動試験は、12～16週齢の間に実施した。これらの試験は、不安、活動性レベルおよび探索を計測するためのオープンフィールドを含んだ。

## 【1774】

オープンフィールド試験：

公知の薬物のいくつかの標的は、オープンフィールド試験において表現型を示した。これらとしては、セロトニン (serotonin) トランスポーター、ドーパミントランスポーター (Giros et al., Nature, 1996 Feb 15; 379 (6566): 606-12) および GABA レセプター (Homann et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1997 Apr 15; 94 (8): 4143-8) のノックアウトを含む。自動化されたオープンフィールドアッセイをカスタマイズして、感情状態に関連する変化および学習に関する探索パターンを扱った。まず、フィールド (40 x 40 cm) をマウスに対して比較的大きくなるように選択することによって探索に関連する自発運動の変化を取り上げるように設計した。さらに、4つの穴を床に設け、探索に特に関連する活動である鼻の突っ込みを可能にした。この試験に関連した感情状態を高めるためにいくつかの因子を設けた。オープンフィールド試験は、マウスが試験される最初の実験の手順であり、なされる測定は被験体のチャンバーとの最初の経験であった。さらに、オープンフィールドは明るく照らした。これらの因子のすべてによって、新しい開放性空間に関連する天然の不安が高められる。次いで、探索活動のパターンおよび程度ならびに特に中心からの全移動距離比は、不安または抑鬱症に対する罹りやすさに関する変化を識別することができる。3つの異なったレベルでの赤外線ビームを用いた大きな活動領域 (40 cm x 40 cm、AccuScan Instruments の VersaMax 動物活動性モニタリングシステム) を用いて、直立、穴への突っ込みおよび自発運動を記録した。動物を中心に置き、その活動を20分間測定した。この試験のデータを4分間隔で5回分析した。全移動距離 (cm)、垂直移動回数 (直立)、穴突っ込み回数および中心からの全移動距離比を記録した。

## 【1775】

マウスが新しい環境に対して正常な慣れ応答を示す傾向を、5回の間隔にわたるその水平自発運動の変化すべてを測定することにより評価する。経時的な活動性の変化のこの算定傾きは、絶対値ではなく正規化された全移動距離を使用して決定する。傾きは5回の間隔のそれぞれにおける正規化された活動を通しての回帰直線から決定する。正常な慣れは、負の傾きの値によって表される。

## 【 1 7 7 6 】

結果：

雌（ - / - ）マウスは、その性別一致（ + / + ）同腹仔および歴史的平均と比較して、オープンフィールド試験中の中心にいる時間の合計の中央値の増加を示したことから、変異体における不安様応答の低下が示唆される。

## 【 1 7 7 7 】

注目すべき差が、オープンフィールド活動性試験中に観察された。雄（ - / - ）マウスは、その性別一致（ + / + ）同腹仔と比較して、中心領域にいる時間の合計の中央値の増加を示した。これは、変異体における不安様応答の低下を示唆する。したがって、ノックアウトマウスは、抑鬱症、全般性不安障害、認知障害、痛覚過敏ならびに感覚障害および / または双極性障害と一致する表現型を示した。したがって、PRO57290ポリペプチドおよびそのアゴニストは、抑鬱性障害に関連する症状の処置または寛解に有用であり得る。

10

## 【 1 7 7 8 】

（ d ）表現型解析：代謝 - 血液化学

代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、血糖測定を含む。マウスにおける血液化学試験を実施するためにCOBAS Integra 400（mfr：Roche）を使用した。代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。

20

## 【 1 7 7 9 】

結果：

雄（ - / - ）マウスはまた、異常なグルコース代謝および / または糖尿病に関連するものであり得る平均血清グルコースレベルの低下を示した。

## 【 1 7 8 0 】

これらの研究において、変異型（ - / - ）マウスは、インスリン感受性の増大のためであり得る血清グルコースレベルの減少を示した。したがって、PRO57290ポリペプチドまたはそのコード遺伝子に対するアンタゴニスト（インヒビター）は、損傷したグルコースホメオスタシスの処置に有用であり得る。

## 【 1 7 8 1 】

48.51.DNA228002（UNQ9128）遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

30

これらのノックアウト実験において、PRO38465ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA228002と命名）（UNQ9128）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：NM\_027209ムス・ムスクルス膜貫通（spanning）4 - ドメイン、サブファミリーA、構成員6B（Ms4a6b）；参照タンパク質：Q99N09膜貫通4 - ドメインサブファミリーA構成員6B gi | 13649409 | gb | AAK37418.1 | MS4A6B タンパク質 [ムス・ムスクルス]；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_152852ホモ・サピエンス膜貫通4 - ドメイン、サブファミリーA、構成員6A（MS4A6A）、転写物改変体1；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

40

Q9H2W1 ACCESSION：Q9H2W1 NID：

ホモ・サピエンス（ヒト）。

CDA01（MS4A6A - POLYMORPH）（MS4A6A タンパク質）。

## 【 1 7 8 2 】

目的のマウス遺伝子は、ヒトMS4A6A（膜貫通4 - ドメイン、サブファミリーA、構成員6A）のオルソログであるMs4a6b（膜貫通4 - ドメイン、サブファミリーA、構成員6B）である。別名としては、1810027D10Rik、CDA01、MS4A6、4SPAN3、CD20L3、MST090、MSTP090、4SPAN3.2、MGC22650、HAIRB - iso、MS4A6A - 多型形、CD20様前駆体

50

、4回膜貫通タンパク質3.1、および4回膜貫通タンパク質3.2が挙げられる。

#### 【1783】

MS4A6Aは、おそらくシグナル伝達受容体複合体の一成分としての機能を果たしている内在性原形質膜タンパク質である。該タンパク質は、CD20/IgE Fc受容体サブユニットファミリードメイン内の4回膜貫通セグメントからなる。

このドメインを有するタンパク質としては、細胞表面受容体サブユニットCD20、高親和性IgE受容体鎖、およびHTm4が挙げられ、これらは、造血系細胞上で発現される。MS4A6Aの種々の発現が、一部のB細胞、骨髄単球性および赤白血病細胞株において明白であった(Liang and Tedder, Genomics 72(2):119-27(2001); Ishibashi et al., Gene 264(1):87-93(2001))。

10

#### 【1784】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹(ES)細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。まれに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

20

#### 【1785】

##### 【化74】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	25	35	18	78
予測値	19.5	39	19.5	78

カイ二乗値 = 0.21 有意性 = 0.9003245 (hom/n) = 0.25 平均同腹仔数 = 9

変異情報

変異型：相同組換え(標準)

30

説明：コードエクソン1~3をターゲティングした(NCBIアクセッションNM\_027209.2)。

1. 野生型発現パネル：RT-PCRによって試験された、26のすべての成体組織サンプル(骨および喘息の肺以外)において標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【1786】

48.51.1. 表現型解析(破壊遺伝子：DNA228002(UNQ9128))

(a) 全体的な表現型の概要：

ヒト膜貫通4-ドメイン、サブファミリーA、構成員6A(MS4A6A)のオルソログをコードする遺伝子の変異により、平均血清グルコースの増加および耐糖能障害を伴うインスリンレベルの減少を示す(-/-)マウスがもたらされた。変異型(-/-)マウスはまた、皮膚線維芽細胞増殖の減少を示した。

40

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

#### 【1787】

(b) 発現

UNQ9128は、卵巣腫瘍(乳頭を含む漿液性嚢胞腺癌)において過剰発現される。

[プロトコルの実施例54および55を参照]

(c)

血液化学/耐糖能

50

代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、血糖測定を含む。マウスにおける血液化学試験を実施するために C O B A S I n t e g r a 4 0 0 ( m f r : R o c h e ) を使用した。代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、インスリン感度およびグルコース代謝の変化を測定する耐糖能試験を含む。異常な耐糖能試験結果は、以下の障害または状態：1型糖尿病および2型糖尿病、シンドロームX、様々な循環器疾患および/または肥満症を示唆し得るが、これらに限定されない。

#### 【1788】

手順：2匹の野生型および4匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイに使用した。耐糖能試験は、哺乳動物における損傷したグルコースホメオスタシスを定義するための標準的な試験である。L i f e s c a n 血糖測定器を使用して耐糖能試験を行った。20%溶液として送達される2g/kgのD-グルコースを動物にIP注射し、血糖値を注射の0、30、60および90分後に測定した。

#### 【1789】

結果：

血糖値/耐糖能試験：

(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較して、耐糖能障害を示した。( - / - ) マウスは、平均絶食時血清中グルコースレベルの上昇を示した。

#### 【1790】

これらの研究では、(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較した場合、試験した3つ全ての間隔で正常な空腹時血糖の存在下で耐糖能が減少を示したかまたは耐糖能障害を示した。したがって、ノックアウト変異マウスは、グルコースホメオスタシス障害の表現型パターンを示し、それゆえ、P R O 3 8 4 9 6 ポリペプチド(またはそのアゴニスト)またはそれをコードする遺伝子は、グルコースホメオスタシス障害および/または糖尿病を含む様々な循環器疾患に関連した状態の処置に有用であり得る。

#### 【1791】

インスリンデータ：

試験の説明：L e x i c o n G e n e t i c s は、マウスにおける定量的インスリンアッセイの実施のための臨床的状况で、C o b r a I I シリーズ自動カウンティングシステムを使用する。

#### 【1792】

結果：

インスリン：(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清インスリンレベルが減少した。

#### 【1793】

血清グルコースレベル

結果：

ホモ接合性(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清グルコースレベルの増加を示した。

#### 【1794】

したがって、変異型(-/-)マウスは、グルコース代謝の変化と関連する高血糖症または糖尿病を示した。

P R O 3 8 4 6 5 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、正常なグルコースレベル/代謝の維持に有用であり得、おそらく糖尿病の処置に有用であり得る。

これらの結果は、変異型(-/-)マウスにおいて観察されたインスリンレベルの減少と一致する。

#### 【1795】

(d)成体皮膚細胞増殖：



手順：皮膚細胞を16週齢の動物（2匹の野生型マウスおよび4匹のホモ接合性マウス）から単離した。これらを、初代線維芽細胞培養物に発達させて、その線維芽細胞増殖速度を厳密に制御されたプロトコルにおいて測定した。このアッセイが過剰増殖性表現型および低増殖性表現型を検出する能力は、p53およびKun80で証明されている。BrdU取り込みを使用して増殖を測定した。

【1796】

詳細には、これらの研究において、皮膚線維芽細胞増殖アッセイを使用した。標準化された培養物中の細胞数の増加を、相対的な増殖能力の基準として使用した。野生型マウスおよび変異マウスから採取した皮膚パイオプシーから初代線維芽細胞を確立した。5万個の細胞の2つ組または3つ組の培養物を播種し、6日間生育させた。培養期間の終わりに、培養物中に存在する細胞の数を、電子粒子カウンターを使用して測定した。

10

【1797】

結果：

雌（-/-）マウスは、その性別一致（+/+）同腹仔と比較して、平均皮膚線維芽細胞増殖速度の減少を示した。

【1798】

したがって、ホモ接合性変異マウスは、低増殖表現型を示した。これらの観察結果により示唆されるように、PRO38465ポリペプチドのアンタゴニストまたはインヒビターは、この低増殖表現型を模倣し、腫瘍抑制因子として機能することができ、異常な細胞増殖の減少に有用であろう。

20

【1799】

48.52.DNA228199（UNQ9638）遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO38683ポリペプチドをコードする遺伝子（DNA228199と命名）（UNQ9638）を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

XM\_357986 PREDICTED：

ムス・ムスクルスRIKEN cDNA 1110008I14遺伝子（1110008I14Rik）；参照タンパク質：

30

XP\_357986 MUC16 [ムス・ムスクルス]；参照ヒト遺伝子配列：

AF414442ホモ・サピエンス卵巣癌関連腫瘍マーカーCA125 mRNA、完全cds；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q8WXI7 ACCESSION：Q8WXI7 NID：

ホモ・サピエンス（ヒト）。

卵巣癌関連腫瘍マーカーCA125。

【1800】

目的のマウス遺伝子は、ヒトMUC16（ムチン16）のオルソログであるRIKEN cDNA 1110008I14遺伝子である。別名としては、CA125、FLJ14303、およびCA125卵巣癌抗原が挙げられる。

40

【1801】

MUC16は、さまざまな上皮において発現され、上皮卵巣癌細胞において過剰発現される内在性原形質膜巨大糖タンパク質である。該タンパク質は、大きなN末端細胞外セグメント、膜貫通セグメント、および短いC末端細胞質ドメインからなる。

該細胞外N末端のセグメントは、選択的なスプライシングのため長さが種々であるが、20,000もの多くのアミノ酸からなるものであり得る。

このセグメントは高度にO-グリコシル化され、多くのセリンおよびトレオニン残基を含む。該細胞外セグメントは、N末端ドメインおよび原形質膜付近のSEAドメイン（ウニ精子タンパク質、エンテロキナーゼ、アグリンに見られるドメイン）の40～60もの多くのタンデム反復配列からなる。

50

S E Aドメインは、一般的に、高度にグリコシル化されたタンパク質において見られ、おそらく、隣接分子上の糖鎖との結合に関与している ( S M A R Tアクセッション S M 0 0 2 0 0 )。

M U C 1 6 の細胞外セグメントは、タンパク質分解性切断によって細胞外空間内に放出され得る ( O ' B r i e n e t a l . , T u m o u r B i o l 2 2 ( 6 ) : 3 4 8 - 6 6 ( 2 0 0 1 ) ; O ' B r i e n e t a l . , T u m o u r B i o l 2 3 ( 3 ) : 1 5 4 - 6 9 ( 2 0 0 2 ) )。

M U C 1 6 は、おそらく、免疫抑制および生殖能力、母性免疫応答からの胚の保護に関与している。

上皮卵巣腫瘍細胞における M U C 1 6 の上方調節により、細胞傷害性 T 細胞およびナチュラルキラー細胞の回避が可能となり得る ( K u i W o n g e t a l . , J B i o l C h e m 2 7 8 ( 3 1 ) : 2 8 6 1 9 - 3 4 ( 2 0 0 3 ) )。

さらに、M U C 1 6 は、異型細胞接着および転移においてある役割を果たしている可能性がある ( R u m p e t a l . , J B i o l C h e m 2 7 9 ( 1 0 ) : 9 1 9 0 - 8 ( 2 0 0 4 ) )。

#### 【 1 8 0 2 】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> 由来の胚性幹 ( E S ) 細胞において生じさせる。キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J アルビノマウスと交雑させ、F 1 ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F 2 の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。さらに、例えば、F 1 マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F 1 ヘテロ接合性マウスを 1 2 9 S v E v <sup>B r d</sup> / C 5 7 ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F 2 マウスを作製する。この世代のマウスについてレベル I 表現型解析を実施する。

#### 【 1 8 0 3 】

##### 【 化 7 5 】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	16	41	21	78
予測値	19.5	39	19.5	78

カイ二乗値 = 1 . 2 6 有意性 = 0 . 5 3 2 5 9 1 8 ( h o m / n ) = 0 . 2 2 平均同腹仔数 = 9

#### 変異情報

変異型：相同組換え ( 標準 )

説明：

コードエキソン 6 0 - 6 3 を標的化した ( N C B I アクセッション X M \_ 3 5 7 9 8 6 . 2 )。

1 . 野生型発現パネル：R T - P C R によって試験された、胚性幹細胞 ( E S ) 細胞および 1 3 のすべての成体組織サンプルに ( 脳、骨格筋、および骨以外 ) おいて標的遺伝子の発現を検出した。

さらなる R T - P C R 試験により、( + / + ) マウス由来の正常な R N A 組織における発現が、以下の通りに示された。雄 ( + / + ) マウスでは心臓、肺、精巣および精管；雌 ( + / + ) マウスでは心臓、肺、卵巣 / 卵管 ( ファローピウス管を含む ) および子宮。

2 . Q C 発現：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

#### 【 1 8 0 4 】

4 8 . 5 2 . 1 . 表現型解析 ( 破壊遺伝子：D N A 2 2 8 1 9 9 ( U N Q 9 6 3 8 )

( a ) 全体的な表現型の概要：

ヒトムチン 1 6 ( M U C 1 6 ) のオルソログをコードする遺伝子の変異により、皮膚線維芽細胞増殖割合の減少を示す ( - / - ) マウスがもたらされた。

遺伝子破壊をサザンブロットによって確認した。

【1805】

(b) 成体皮膚細胞増殖：

手順：皮膚細胞を16週齢の動物(2匹の野生型マウスおよび4匹のホモ接合性マウス)から単離した。これらを、初代線維芽細胞培養物に発達させて、その線維芽細胞増殖速度を厳密に制御されたプロトコルにおいて測定した。このアッセイが過剰増殖性表現型および低増殖性表現型を検出する能力は、p53およびKu80で証明されている。BrdU取り込みを使用して増殖を測定した。

【1806】

詳細には、これらの研究において、皮膚線維芽細胞増殖アッセイを使用した。標準化された培養物中の細胞数の増加を、相対的な増殖能力の基準として使用した。野生型マウスおよび変異マウスから採取した皮膚バイオプシーから初代線維芽細胞を確立した。5万個の細胞の2つ組または3つ組の培養物を播種し、6日間生育させた。培養期間の終わりに、培養物中に存在する細胞の数を、電子粒子カウンターを使用して測定した。

10

【1807】

結果：雌(-/-)マウスは、その性別一致(+/-)同腹仔と比較して、平均皮膚線維芽細胞増殖速度の減少を示した。

【1808】

したがって、ホモ接合性変異マウスは、低増殖性表現型を示した。これらの観察結果により示唆されるように、PRO38683ポリペプチドのアンタゴニストまたはインヒビターは、腫瘍サプレッサーとして機能し得、異常な細胞増殖を低下させるのに有用であり得る。

20

【1809】

48.53.DNA329632(UNQ16168)遺伝子が破壊されたマウスの作製および解析

これらのノックアウト実験において、PRO85161ポリペプチドをコードする遺伝子(DNA329632と命名)(UNQ16168)を破壊した。これらの研究のための遺伝子特異的情報は、以下のとおりである：変異されたマウス遺伝子は、次のものに対応する：参照ヌクレオチド：

NM\_027022ムス・ムスクルスケモカイン様因子スーパーファミリー2A(Cklfsf2a)；参照タンパク質：

30

Q9DAR1 ACCESSION: Q9DAR1 NID:

ムス・ムスクルス(マウス)。

1700001K04Rik タンパク質；参照ヒト遺伝子配列：

NM\_144673ホモ・サピエンスケモカイン様因子スーパーファミリー2(CKLFSF2)；ヒトタンパク質配列は、次のものに対応する：

Q8TAZ6 ACCESSION: Q8TAZ6 NID:

ホモ・サピエンス(ヒト)。

推定(ケモカイン様因子スーパーファミリー2)と類似。

40

【1810】

目的のマウス遺伝子は、Cklfsf2a(ケモカイン様因子スーパーファミリー2A)、ヒトCKLFSF2(ケモカイン様因子スーパーファミリー2)のオルソログである。

別名としては、C32、Cklf、ARR19、CKLF3、CKLF4、CKLF5、Cklf1、UCK-1、Cklfsf2-1b、1700001K04Rik、17000041N15Rik、17000063K20Rik、ケモカイン様因子、ケモカイン様因子スーパーファミリー2-1b、FLJ25732、MGC39436およびCKLFSF2-v2が挙げられる。

【1811】

CKLFSF2は、主に精巣および前立腺で発現される内在性膜タンパク質である。該

50

タンパク質は、4つの膜貫通セグメントをMARVEL（膜会合性）ドメイン内に含む。MARVELドメインを有するタンパク質は、膜同格事象（例えば、輸送小胞生物発生）において機能し得る（PFAMアクセッションPF01284）。

#### 【1812】

CKLFSF2は細胞質存在するが、アンドロゲン活性化アンドロゲン受容体と複合体を形成した後、核に転位する。CKLFSF2は、ヒストンデアセチラーゼ4を漸増させることによりアンドロゲン受容体のトランス活性化を抑制し得るものである。したがって、CKLFSF2は、アンドロゲン受容体コリプレッサーとしての機能を果たすようである。バイオインフォマティック解析により、CKLFSF2は原形質膜内に存在することが示唆される。CKLFSF2は、細胞増殖、細胞分化および雄の生殖プロセスに関与している可能性がある（Xia et al., Biochim Biophys Acta 1591(1-3):163-173(2002); Rui et al., Mol Biol Rep 30(4):229-37(2003); Han et al., Genomics 81(6):609-17(2003); Jeong et al., Mol Endocrinol 18(1):13-25(2004)）。

10

#### 【1813】

遺伝子ターゲティングまたは遺伝子トラップによる変異を、系統129SvEv<sup>Brd</sup>由来の胚性幹（ES）細胞において生じさせる。キメラマウスをC57BL/6Jアルビノマウスと交雑させ、F1ヘテロ接合性動物を作製する。これらの子孫を、交雑受精することにより、F2の野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性の変異体子孫を作製する。さらに、例えば、F1マウスがキメラからほとんど得られない場合に、F1ヘテロ接合性マウスを129SvEv<sup>Brd</sup>/C57ハイブリッドマウスと交雑することにより、交雑受精用のさらなるヘテロ接合性動物を得て、F2マウスを作製する。この世代のマウスについてレベルI表現型解析を実施する。

20

#### 【1814】

##### 【化76】

	野生型	ヘテロ	ホモ	合計
実測値	12	27	13	52
予測値	13	26	13	52

30

カイ二乗値 = 2.41 有意性 = 0.29969198 (hom/n) = 0.25 平均同腹仔数 = 8

変異情報

変異型：相同組換え（標準）

説明：コードエクソン1および2をターゲティングした（NCBIアクセッションNM\_027022.2）。

1. 野生型発現パネル：RT-PCRによって試験された13の成体組織サンプルのうち、脳のみにおいて標的遺伝子の発現を検出した。

2. QC発現：QC画像：標的遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーション解析によって確認した。

40

#### 【1815】

48.53.1. 表現型解析（破壊遺伝子：DNA329632（UNQ16168））  
（a）全体的な表現型の概要：

ヒトケモカイン様因子スーパーファミリー2（CKLFSF2）のオルソログをコードする遺伝子の変異により、アルカリホスファターゼレベルの増加および体脂肪の増加を示す（-/-）マウスがもたらされた。

遺伝子破壊をサザンプロットによって確認した。

#### 【1816】

（b）表現型解析：代謝 - 血液化学

代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は

50

、血糖測定を含む。マウスにおける血液化学試験を実施するためにC O B A S I n t e g r a 4 0 0 ( m f r : R o c h e ) を使用した。血糖値の測定に加えて、以下の血液化学試験もまた日常的に行う：アルカリホスファターゼ；アラニンアミノ - トランスフェラーゼ；アルブミン；ビリルビン；亜リン酸；クレアチニン；B U N = 血中尿素窒素；カルシウム；尿酸；ナトリウム；カリウム；および塩化物。代謝の分野において、糖尿病の処置のための標的を同定し得る。血液化学表現型解析は、インスリン感受性およびグルコース代謝の変化を測定するための耐糖能試験を含む。耐糖能試験の異常な結果は、以下の障害または容態を示し得るが、これらに限定されない：1 型および2 型糖尿病、症候群 X、種々の心血管疾患、および / または肥満症。

#### 【1817】

10

結果：

雄 ( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較した場合、平均血清アルカリホスファターゼの増加を示した。

#### 【1818】

( c ) 骨代謝および放射線表現型解析

骨代謝の分野において、関節炎、骨粗鬆症、骨減少症および大理石骨病の処置のため、ならびに骨の治癒を促進する標的を同定するための標的を本明細書中で同定した。試験は：

- ・大腿骨および椎骨における骨塩密度を測定するためのD E X A
  - ・骨梁と皮質骨の両方についての骨塩密度を非常に高い解像度および非常に高い感度で測定するためのマイクロCT
- を含んだ。

20

#### 【1819】

D e x a 解析 - 試験の説明：

手順：4 匹の野生型マウス、4 匹のヘテロ接合性マウスおよび8 匹のホモ接合性マウスのコホートをこのアッセイで試験した。二重エネルギーX 線吸収測定法 ( D E X A ) を、うまく使用して骨の変化を同定した。麻酔動物を試験し、骨塩量 ( B M C ) 、B M C / L B M 比、容量測定による骨塩密度 ( v B M D ) 、全身B M D 、大腿骨B M D および椎骨B M D を測定した。

#### 【1820】

30

A v e r t i n ( 1 . 2 5 % 2 , 2 , 2 , - トリプロモエタノール , 2 0 m L / k g 体重 ) をマウスに腹腔内注射することにより麻酔し、体長および体重を測定し、次いで、そのマウスをD E X A スキャンのためにP I X I m u s T M デンシトメーター ( L u n a r I n c . ) のプラットフォーム上に腹臥位にした。L u n a r P I X I m u s ソフトウェアを使用して、目的の領域 ( R O I ) [ すなわち、全身、椎骨および両大腿骨 ] の骨塩密度 ( B M D ) および脂肪組成物 ( % 脂肪 ) および総組織質量 ( T T M ) を測定した。

#### 【1821】

結果：

D e x a : 雌 ( - / - ) マウスは、その性別一致 ( + / + ) 同腹仔および歴史的平均と比較して、平均総体脂肪パーセントおよび総脂肪質量の増加を示した。

40

#### 【1822】

これらの研究から、変異 ( - / - ) 非ヒトトランスジェニック動物が、肥満症に関連し得る負の表現型を示すことが示唆される。したがって、P R O 8 5 1 6 1 ポリペプチドまたはそのアゴニストは、正常な成長および代謝プロセスに必須であり、特に肥満症の予防および / または処置に重要であり得る。

#### 【1823】

実施例 4 9 :

ハイブリダイゼーションプローブとしてのP R O 2 2 6 、P R O 2 5 7 、P R O 2 6 8 、P R O 2 9 0 、P R O 3 6 0 0 6 、P R O 3 6 3 、P R O 3 6 5 、P R O 3 8 2 、P R O 4 4 4 、P R O 7 0 5 、P R O 1 0 7 1 、P R O 1 1 2 5 、P R O 1 1 3 4 、P R O 1 1

50

55、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161の使用

以下の方法は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションプローブとしての使用を示す。

【1824】

本明細書中に開示した完全長または成熟PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドのコード配列を含むDNAは、ヒト組織cDNAライブラリーまたはヒト組織ゲノムライブラリーにおいて、相同なDNA（例えば、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドの天然に存在する改変体をコードするものなど）をスクリーニングするためのプローブとして使用される。

【1825】

いずれかのライブラリーDNAを含むフィルターのハイブリダイゼーションおよび洗浄は、下記の高ストリンジェンシー条件下で行う。

放射能標識 PRO226 -、PRO257 -、PRO268 -、PRO290 -、PRO36006 -、PRO363 -、PRO365 -、PRO382 -、PRO444 -、PRO705 -、PRO1071 -、PRO1125 -、PRO1134 -、PRO1155 -、PRO1281 -、PRO1343 -、PRO1379 -、PRO1380 -、PRO1387 -、PRO1419 -、PRO1433 -、PRO1474 -、PRO1550 -、PRO1571 -、PRO1572 -、PRO1759 -、PRO1904 -、PRO35193 -、PRO4341 -、PRO4348 -、PRO4369 -、PRO4381 -、PRO4407 -、PRO4425 -、PRO4985 -、PRO4989 -、PRO5737 -、PRO5800 -、PRO5993 -、PRO6017 -、PRO7174 -、PRO9744 -、PRO9821 -、PRO9852 -、PRO9873 -、PRO10196 -、PRO34778 -、PRO20233 -、PRO21956 -、PRO57290 -、PRO38465 -、PRO38683 - または PRO85161 由来プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションは、50%ホルムアミド、5×SSC、0.1%SDS、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH 6.8、2×デンハルト溶液および10%硫酸デキストランの溶液中、42で20時間行なわれる。

10

フィルターの洗浄は、0.1×SSCおよび0.1%SDSの水溶液中、42で行う  
完全長の天然の配列 PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドをコードするDNAと所望の配列同一性を有するDNAが、次いで、当該技術分野で知られた標準技術を用いて同定され得る。

20

30

#### 【1826】

##### 実施例50：

大腸菌での PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161の発現

40

この実施例は、大腸菌での組換え発現による PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PR

50

O 4 4 2 5、P R O 4 9 8 5、P R O 4 9 8 9、P R O 5 7 3 7、P R O 5 8 0 0、P R O 5 9 9 3、P R O 6 0 1 7、P R O 7 1 7 4、P R O 9 7 4 4、P R O 9 8 2 1、P R O 9 8 5 2、P R O 9 8 7 3、P R O 1 0 1 9 6、P R O 3 4 7 7 8、P R O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9 0、P R O 3 8 4 6 5、P R O 3 8 6 8 3またはP R O 8 5 1 6 1ポリペプチドの非グリコシル化形態の調製を示す。

【 1 8 2 7 】

P R O 2 2 6、P R O 2 5 7、P R O 2 6 8、P R O 2 9 0、P R O 3 6 0 0 6、P R O 3 6 3、P R O 3 6 5、P R O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、P R O 1 1 2 5、P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、P R O 1 3 7 9、P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、P R O 1 4 7 4、P R O 1 5 5 0、P R O 1 5 7 1、P R O 1 5 7 2、P R O 1 7 5 9、P R O 1 9 0 4、P R O 3 5 1 9 3、P R O 4 3 4 1、P R O 4 3 4 8、P R O 4 3 6 9、P R O 4 3 8 1、P R O 4 4 0 7、P R O 4 4 2 5、P R O 4 9 8 5、P R O 4 9 8 9、P R O 5 7 3 7、P R O 5 8 0 0、P R O 5 9 9 3、P R O 6 0 1 7、P R O 7 1 7 4、P R O 9 7 4 4、P R O 9 8 2 1、P R O 9 8 5 2、P R O 9 8 7 3、P R O 1 0 1 9 6、P R O 3 4 7 7 8、P R O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9 0、P R O 3 8 4 6 5、P R O 3 8 6 8 3またはP R O 8 5 1 6 1ポリペプチドをコードするD N A配列を、まず、選択したP C Rプライマーを用いて増幅させる。プライマーは、選択した発現ベクター上の制限酵素部位に対応する制限酵素部位を含む必要がある。さまざまな発現ベクターを使用し得る。適当なベクターの一例は、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性の遺伝子を含むp B R 3 2 2（大腸菌由来；B o l i v a r e t a l . , G e n e、2：9 5（1 9 7 7）を参照）である。ベクターを制限酵素で消化し、脱ホスホリル化する。P C R増幅された配列を、次いで、ベクター内にライゲートする。

該ベクターは、好ましくは、抗生物質耐性遺伝子、t r pプロモーター、ポリヒスリーダー（最初の6つのS T I Iコドン、ポリヒス配列およびエンテロキナーゼ切断部位を含む）、P R O 2 2 6、P R O 2 5 7、P R O 2 6 8、P R O 2 9 0、P R O 3 6 0 0 6、P R O 3 6 3、P R O 3 6 5、P R O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、P R O 1 1 2 5、P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、P R O 1 3 7 9、P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、P R O 1 4 7 4、P R O 1 5 5 0、P R O 1 5 7 1、P R O 1 5 7 2、P R O 1 7 5 9、P R O 1 9 0 4、P R O 3 5 1 9 3、P R O 4 3 4 1、P R O 4 3 4 8、P R O 4 3 6 9、P R O 4 3 8 1、P R O 4 4 0 7、P R O 4 4 2 5、P R O 4 9 8 5、P R O 4 9 8 9、P R O 5 7 3 7、P R O 5 8 0 0、P R O 5 9 9 3、P R O 6 0 1 7、P R O 7 1 7 4、P R O 9 7 4 4、P R O 9 8 2 1、P R O 9 8 5 2、P R O 9 8 7 3、P R O 1 0 1 9 6、P R O 3 4 7 7 8、P R O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9 0、P R O 3 8 4 6 5、P R O 3 8 6 8 3またはP R O 8 5 1 6 1コード領域、転写ターミネーターならびにa r g U遺伝子をコードする配列を含む。

【 1 8 2 8 】

次いで、ライゲーション混合物を用い、選択した大腸菌系統をS a m b r o o k e t a l .（前出）に記載の方法を用いて形質転換する。形質転換体を、L Bプレート上でその生育能力によって同定し、次いで抗生物質耐性コロニーを選択する。プラスミドD N Aを、制限解析によって単離し、D N A配列決定によって確認し得る。

【 1 8 2 9 】

選択されたクローンは、液体培養培地（例えば、抗生物質を加えたL Bブロスなど）中で一晚培養し得る。一晚培養物は、続いて大規模培養物にイノキュレートするために使用され得る。次いで、細胞を所望の光学密度まで培養し、この間に発現プロモーターが作動する。

【 1 8 3 0 】

細胞をさらに数時間培養した後、細胞を、遠心分離によって回収し得る。遠心分離によって得られた細胞ペレットは、当該技術分野で知られた種々の薬剤を用いて



可溶化され得、可溶化されたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161タンパク質は、次いで、タンパク質の強固な結合を可能にする条件下で金属キレートカラムを用いて精製され得る。

10

# 【1831】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161は、大腸菌においてポリ-ヒスタグ化形態で、以下の手順を用いて発現させ得る。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161をコードするDNAを、まず、選択したPCRプライマーを用いて増幅させる。プライマーは、選択した発現ベクター上の制限酵素部位に対応する制限酵素部位、ならびに効率的で信頼性のある翻訳の開始、金属キレートカラム上での速やかな精製およびエンテロキナーゼによるタンパク質分解的除去をもたらすのに有用な他の配列を含む。次いで、PCR増幅されたポリ-Hiスタグ化配列を発現ベクター内にライゲートし、これを用いて菌株52(W3110fu hA(tonA)lon galE rpoH ts(htpR ts)clpP(lacI q)系の大腸菌宿主を形質転換する。形質転換体を、まず、50mg/mLのカルベニシリンを含有するLB中にて30で、振とうさせながら3~5のO.D.600が達成されるまで培養する。次いで、培養物をCRAP培地(3.57gの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.71gのクエン酸ナトリウム・2H<sub>2</sub>O、1.07gのKCl、5.36gのDifco製酵母抽出物、5.36gのSheffield hycase SF(500mLの水中)、ならびに110mMのMPOS、pH7.3、0.55%(w/v)のグルコースおよび7mMのMgSO<sub>4</sub>を混合することにより調製)中で50~100倍に希釈し、およそ20~30時間30で、振とうさ

20

30

40

50

せながら培養する。試料を取り出し、SDS-PAGE解析によって発現を確認し、バルク培養物を遠心分離して細胞をペレット化する。細胞ペレットは、精製およびリフォールディングまで凍結しておく。

#### 【1832】

0.5～1 Lの発酵物からの大腸菌ペースト(6～10 gのペレット)を10容量(w/v)で7 Mグアニジン、20 mM Tris (pH 8) バッファー中に再懸濁する。固形亜硫酸ナトリウムおよび四チオン酸ナトリウムを、それぞれ、終濃度が0.1 Mおよび0.02 Mとなるように添加し、溶液を一晩4 で攪拌する。この工程により、すべてのシステイン残基がスルフィトリル化(sulfitolization)によってブロックされた変性タンパク質がもたらされる。この溶液を40,000 rpmで、Beckman 10 超遠心分離機にて30分間遠心分離する。上清みを3～5容量の金属キレートカラムバッファー(6 Mグアニジン、20 mM Tris、pH 7.4)で希釈し、0.22ミクロンフィルターに通して濾過して清澄化する。清澄化された抽出物を、金属キレートカラムバッファー中で平衡化した5 mL容QiaGen Ni-NTA金属キレートカラム上に負荷する。カラムを50 mMイミダゾール(Calbiochem, Utracelグレード)を含有するさらなるバッファー(pH 7.4)で洗浄する。タンパク質を、250 mMイミダゾールを含有するバッファーで溶出する。所望のタンパク質を含む画分をプールし、4 で保存する。タンパク質濃度を、そのアミノ酸配列に基づいて計算された消衰係数を用い、280 nmにおけるその吸光度によって推定する。

#### 【1833】

タンパク質を、20 mM Tris (pH 8.6)、0.3 M NaCl、2.5 Mの尿素、5 mMのシステイン、20 mMのグリシンおよび1 mM EDTAからなる新たに調製したリフォールディングバッファー中に試料をゆっくり希釈することによりリフォールディングさせる。リフォールディング容量は、最終タンパク質濃度が50～100マイクログラム/mLとなるように選択される。リフォールディング溶液は、12～36時間4 で穏やかに攪拌する。リフォールディング反応を、終濃度0.4% (およそ3のpH)までTFAを添加することによってクエンチする。タンパク質のさらなる精製の前に、溶液を0.22ミクロンフィルターに通して濾過し、アセトニトリルを2～10%の終濃度まで添加する。リフォールディングさせたタンパク質をPoros R1/H逆相カラム上で、0.1% TFAの移動相バッファーを用い、10～80%のアセトニトリルの勾配での溶出を伴ってクロマトグラフィー処理する。A280吸光度を有する画分のアリコートにSDSポリアクリルアミドゲル上で解析し、均質なリフォールディングタンパク質を含む画分をプールする。一般的に、大部分のタンパク質が適正にリフォールディングされた種は、その疎水性内部が最も緻密であり、逆相樹脂との相互作用から遮断されるため、最低濃度のアセトニトリルで溶出される。凝集した種は、通常、より高いアセトニトリル濃度で溶出される。ミスフォールド形態のタンパク質を所望の形態から分離することに加え、逆相工程ではまた、内毒素を試料から除去する。

#### 【1834】

所望のフォールドされたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドを含有する画分をプールし、アセトニトリルを、該溶液に指向した穏やかな窒素

10

20

30

40

50

流を用いて除去する。透析によって、または構築バッファー中で平衡化した G 2 5 S u p e r f i n e ( P h a r m a c i a ) 樹脂を用いたゲル濾過によって、0.14 M の塩化ナトリウムおよび 4 % マンニトールを含む 20 mM H e p e s ( p H 6 . 8 ) 中にタンパク質を構築し、滅菌濾過する。

【1835】

実施例 51:

哺乳動物細胞での PRO 2 2 6、PRO 2 5 7、PRO 2 6 8、PRO 2 9 0、PRO 3 6 0 0 6、PRO 3 6 3、PRO 3 6 5、PRO 3 8 2、PRO 4 4 4、PRO 7 0 5、PRO 1 0 7 1、PRO 1 1 2 5、PRO 1 1 3 4、PRO 1 1 5 5、PRO 1 2 8 1、PRO 1 3 4 3、PRO 1 3 7 9、PRO 1 3 8 0、PRO 1 3 8 7、PRO 1 4 1 9、PRO 1 4 3 3、PRO 1 4 7 4、PRO 1 5 5 0、PRO 1 5 7 1、PRO 1 5 7 2、PRO 1 7 5 9、PRO 1 9 0 4、PRO 3 5 1 9 3、PRO 4 3 4 1、PRO 4 3 4 8、PRO 4 3 6 9、PRO 4 3 8 1、PRO 4 4 0 7、PRO 4 4 2 5、PRO 4 9 8 5、PRO 4 9 8 9、PRO 5 7 3 7、PRO 5 8 0 0、PRO 5 9 9 3、PRO 6 0 1 7、PRO 7 1 7 4、PRO 9 7 4 4、PRO 9 8 2 1、PRO 9 8 5 2、PRO 9 8 7 3、PRO 1 0 1 9 6、PRO 3 4 7 7 8、PRO 2 0 2 3 3、PRO 2 1 9 5 6、PRO 5 7 2 9 0、PRO 3 8 4 6 5、PRO 3 8 6 8 3 または PRO 8 5 1 6 1 の発現

この実施例は、哺乳動物細胞での組換え発現による、おそらくグリコシル化された形態の PRO 2 2 6、PRO 2 5 7、PRO 2 6 8、PRO 2 9 0、PRO 3 6 0 0 6、PRO 3 6 3、PRO 3 6 5、PRO 3 8 2、PRO 4 4 4、PRO 7 0 5、PRO 1 0 7 1、PRO 1 1 2 5、PRO 1 1 3 4、PRO 1 1 5 5、PRO 1 2 8 1、PRO 1 3 4 3、PRO 1 3 7 9、PRO 1 3 8 0、PRO 1 3 8 7、PRO 1 4 1 9、PRO 1 4 3 3、PRO 1 4 7 4、PRO 1 5 5 0、PRO 1 5 7 1、PRO 1 5 7 2、PRO 1 7 5 9、PRO 1 9 0 4、PRO 3 5 1 9 3、PRO 4 3 4 1、PRO 4 3 4 8、PRO 4 3 6 9、PRO 4 3 8 1、PRO 4 4 0 7、PRO 4 4 2 5、PRO 4 9 8 5、PRO 4 9 8 9、PRO 5 7 3 7、PRO 5 8 0 0、PRO 5 9 9 3、PRO 6 0 1 7、PRO 7 1 7 4、PRO 9 7 4 4、PRO 9 8 2 1、PRO 9 8 5 2、PRO 9 8 7 3、PRO 1 0 1 9 6、PRO 3 4 7 7 8、PRO 2 0 2 3 3、PRO 2 1 9 5 6、PRO 5 7 2 9 0、PRO 3 8 4 6 5、PRO 3 8 6 8 3 または PRO 8 5 1 6 1 ポリペプチドの調製を示す。

【1836】

ベクター p R K 5 ( E P 3 0 7 , 2 4 7 ( 1 9 8 9 年 3 月 1 5 日 公 開 ) を 参 照 の こ と ) を発現ベクターとして使用する。

任意選択で、PRO 2 2 6、PRO 2 5 7、PRO 2 6 8、PRO 2 9 0、PRO 3 6 0 0 6、PRO 3 6 3、PRO 3 6 5、PRO 3 8 2、PRO 4 4 4、PRO 7 0 5、PRO 1 0 7 1、PRO 1 1 2 5、PRO 1 1 3 4、PRO 1 1 5 5、PRO 1 2 8 1、PRO 1 3 4 3、PRO 1 3 7 9、PRO 1 3 8 0、PRO 1 3 8 7、PRO 1 4 1 9、PRO 1 4 3 3、PRO 1 4 7 4、PRO 1 5 5 0、PRO 1 5 7 1、PRO 1 5 7 2、PRO 1 7 5 9、PRO 1 9 0 4、PRO 3 5 1 9 3、PRO 4 3 4 1、PRO 4 3 4 8、PRO 4 3 6 9、PRO 4 3 8 1、PRO 4 4 0 7、PRO 4 4 2 5、PRO 4 9 8 5、PRO 4 9 8 9、PRO 5 7 3 7、PRO 5 8 0 0、PRO 5 9 9 3、PRO 6 0 1 7、PRO 7 1 7 4、PRO 9 7 4 4、PRO 9 8 2 1、PRO 9 8 5 2、PRO 9 8 7 3、PRO 1 0 1 9 6、PRO 3 4 7 7 8、PRO 2 0 2 3 3、PRO 2 1 9 5 6、PRO 5 7 2 9 0、PRO 3 8 4 6 5、PRO 3 8 6 8 3 または PRO 8 5 1 6 1 DNA を、PRO 2 2 6、PRO 2 5 7、PRO 2 6 8、PRO 2 9 0、PRO 3 6 0 0 6、PRO 3 6 3、PRO 3 6 5、PRO 3 8 2、PRO 4 4 4、PRO 7 0 5、PRO 1 0 7 1、PRO 1 1 2 5、PRO 1 1 3 4、PRO 1 1 5 5、PRO 1 2 8 1、PRO 1 3 4 3、PRO 1 3 7 9、PRO 1 3 8 0、PRO 1 3 8 7、PRO 1 4 1 9、PRO 1 4 3 3、PRO 1 4 7 4、PRO 1 5 5 0、PRO 1 5 7 1、PRO 1 5 7 2、PRO 1 7 5 9、PRO 1 9 0 4、PRO 3 5 1 9 3、PRO 4 3 4 1、PRO 4 3 4 8、PRO 4 3 6 9、PRO 4 3 8 1、PRO 4 4 0 7、PRO 4 4 2 5、PRO 4 9 8 5、PRO 4 9 8 9、PR

O5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161DNAの挿入を可能にする選択した制限酵素を有するpRK5内に、Sambrookら（前出）に記載のものなどのライゲーション方法を用いてライゲートさせる。得られたベクターを、pRK5-PRO226、pRK5-PRO257、pRK5-PRO268、pRK5-PRO290、pRK5-PRO36006、pRK5-PRO363、pRK5-PRO365、pRK5-PRO382、pRK5-PRO444、pRK5-PRO705、pRK5-PRO1071、pRK5-PRO1125、pRK5-PRO1134、pRK5-PRO1155、pRK5-PRO1281、pRK5-PRO1343、pRK5-PRO1379、pRK5-PRO1380、pRK5-PRO1387、pRK5-PRO1419、pRK5-PRO1433、pRK5-PRO1474、pRK5-PRO1550、pRK5-PRO1571、pRK5-PRO1572、pRK5-PRO1759、pRK5-PRO1904、pRK5-PRO35193、pRK5-PRO4341、pRK5-PRO4348、pRK5-PRO4369、pRK5-PRO4381、pRK5-PRO4407、pRK5-PRO4425、pRK5-PRO4985、pRK5-PRO4989、pRK5-PRO5737、pRK5-PRO5800、pRK5-PRO5993、pRK5-PRO6017、pRK5-PRO7174、pRK5-PRO9744、pRK5-PRO9821、pRK5-PRO9852、pRK5-PRO9873、pRK5-PRO10196、pRK5-PRO34778、pRK5-PRO20233、pRK5-PRO21956、pRK5-PRO57290、pRK5-PRO38465、pRK5-PRO38683またはpRK5-PRO85161と呼ぶ。

10

20

30

40

50

#### 【1837】

選択される宿主細胞は293細胞であり得る。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)を組織培養プレート内で、ウシ胎仔血清ならびに任意選択で栄養成分および/または抗生物質を補給したDMEMなどの培地中でコンフルエンスまで培養する。

約10μgのpRK5-PRO226、pRK5-PRO257、pRK5-PRO268、pRK5-PRO290、pRK5-PRO36006、pRK5-PRO363、pRK5-PRO365、pRK5-PRO382、pRK5-PRO444、pRK5-PRO705、pRK5-PRO1071、pRK5-PRO1125、pRK5-PRO1134、pRK5-PRO1155、pRK5-PRO1281、pRK5-PRO1343、pRK5-PRO1379、pRK5-PRO1380、pRK5-PRO1387、pRK5-PRO1419、pRK5-PRO1433、pRK5-PRO1474、pRK5-PRO1550、pRK5-PRO1571、pRK5-PRO1572、pRK5-PRO1759、pRK5-PRO1904、pRK5-PRO35193、pRK5-PRO4341、pRK5-PRO4348、pRK5-PRO4369、pRK5-PRO4381、pRK5-PRO4407、pRK5-PRO4425、pRK5-PRO4985、pRK5-PRO4989、pRK5-PRO5737、pRK5-PRO5800、pRK5-PRO5993、pRK5-PRO6017、pRK5-PRO7174、pRK5-PRO9744、pRK5-PRO9821、pRK5-PRO9852、pRK5-PRO9873、pRK5-PRO10196、pRK5-PRO34778、pRK5-PRO20233、pRK5-PRO21956、pRK5-PRO57290、pRK5-PRO38465、pRK5-PRO38683またはpRK5-PRO85161DNAを、VA RNA遺伝子[Thimmappa et al., Cell, 31:543(1982)]をコードするDNA約1μgと混合し、500μlの1mM Tris-HCl、0.1mM EDTA、0.227 M CaCl<sub>2</sub>に溶解する。

この混合物に、500μLの50mM HEPES(pH7.35)、280mM Na

C1、1.5 mM NaPO<sub>4</sub>を滴下し、25 で10分間、沈殿物を形成させる。沈殿物を懸濁して293細胞に添加し、37 で約4時間沈降させる。培養培地を吸引除去し、2 mLの20%グリセロール含有PBSを30秒間添加する。次いで、293細胞を血清無含有培地で洗浄し、新鮮培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートする。

#### 【1838】

トランスフェクションのおよそ24時間後、培養培地を除去し、培養培地(単独)または200 µCi/mLの<sup>35</sup>S-システインおよび200 µCi/mLの<sup>35</sup>S-メチオニンを含む培養培地と交換する。12時間のインキュベーション後、ならし培地を回収し、スピンフィルターにて濃縮し、15%SDSゲル上に負荷する。

処理したゲルは、選択した時間、乾燥させ、フィルムに露光してPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドの存在を顕現させ得る。トランスフェクト細胞を含む培養物は、さらなるインキュベーション(血清無含有培地中)に供してもよく、培地を、選択したバイオアッセイにおいて試験する。

#### 【1839】

択一的な技術の一例では、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161を、Somparyrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575(1981)に記載された硫酸デキストラン法を用いて293細胞内に一過的に導入させ得る。293細胞を、最大密度までスピナーフラスコ内で培養し、700 µgのpRK5-PRO226、pRK5-PRO257、pRK5-PRO268、pRK5-PRO290、pRK5-PRO36006、pRK5-PRO363、pRK5-PRO365、pRK5-PRO382、pRK5-PRO444、pRK5-PRO705、pRK5-PRO1071、pRK5-PRO1125、pRK5-PRO1134、pRK5-PRO1155、pRK5-PRO1281、pRK5-PRO1343、pRK5-PRO1379、pRK5-PRO1380、pRK5-PRO1387、pRK5-PRO1419、pRK5-PRO1433、pRK5-PRO1474、pRK5-PRO1550、pRK5-PRO1571、pRK5-PRO1572、pRK5-PRO1759、pRK5-PRO1904、pRK5-PRO35193、pRK5-PRO4341、pRK5-PRO4348、pRK5-PRO4369、pRK5-PRO4381、pRK5-PRO4407、pRK5-PRO4425、pRK5-PRO4985、pRK5-PRO4989、pRK5-PRO5737、pRK5

- PRO5800、pRK5 - PRO5993、pRK5 - PRO6017、pRK5 - PRO7174、pRK5 - PRO9744、pRK5 - PRO9821、pRK5 - PRO9852、pRK5 - PRO9873、pRK5 - PRO10196、pRK5 - PRO34778、pRK5 - PRO20233、pRK5 - PRO21956、pRK5 - PRO57290、pRK5 - PRO38465、pRK5 - PRO38683またはpRK5 - PRO85161 DNAを添加する。該細胞を、まず、スピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄する。DNA - デキストラン沈殿物を、細胞ペレット上で4時間インキュベートする。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、5  $\mu$ g/mLウシインスリンおよび0.1  $\mu$ g/mLウシトランスフェリンを入れたスピナーフラスコ内に再導入する。約4日後、ならし培地を遠心分離し、濾過して細胞および残屑を除去する。

発現されたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161を含有する試料は、次いで、任意の選択した方法、例えば、透析および/またはカラムクロマトグラフィーなどによって濃縮および精製され得る。

#### 【1840】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161は、CHO細胞において発現され得る。

pRK5 - PRO226、pRK5 - PRO257、pRK5 - PRO268、pRK5 - PRO290、pRK5 - PRO36006、pRK5 - PRO363、pRK5 - PRO365、pRK5 - PRO382、pRK5 - PRO444、pRK5 - PRO705、pRK5 - PRO1071、pRK5 - PRO1125、pRK5 - PRO1134、pRK5 - PRO1155、pRK5 - PRO1281、pRK5 - PRO1343、pRK5 - PRO1379、pRK5 - PRO1380、pRK5 - PRO1387、pRK5 - PRO1419、pRK5 - PRO1433、pRK5 - PRO1474、pRK5 - PRO1550、pRK5 - PRO1571、pRK5 - PRO1572、pRK5 - PRO1759、pRK5 - PRO1904、pRK5 - PRO35193、pRK5 - PRO4341、pRK5 - PRO4348、pRK5 - PRO4369、pRK5 - PRO4381、pRK5 - PRO4407、pRK5 - PRO4425、pRK5 - PRO4985、pRK5 - PRO4989、pRK5 - PRO5737、pRK5 - PRO5800、pRK5 - PRO5993、pRK5 - PRO6017、pRK5 - PR

O 7 1 7 4、p R K 5 - P R O 9 7 4 4、p R K 5 - P R O 9 8 2 1、p R K 5 - P R O 9 8 5 2、p R K 5 - P R O 9 8 7 3、p R K 5 - P R O 1 0 1 9 6、p R K 5 - P R O 3 4 7 7 8、p R K 5 - P R O 2 0 2 3 3、p R K 5 - P R O 2 1 9 5 6、p R K 5 - P R O 5 7 2 9 0、p R K 5 - P R O 3 8 4 6 5、p R K 5 - P R O 3 8 6 8 3またはp R K 5 - P R O 8 5 1 6 1でC H O細胞を、C a P O<sub>4</sub>またはD E A E - デキストランなどの既知の試薬を用いてトランスフェクトし得る。上記のように、細胞培養物をインキュベートすることができ、培地は培養培地（単独）または<sup>3</sup> <sup>5</sup> S - メチオニンなどの放射能標識を含有する培地と交換することができる。

P R O 2 2 6、P R O 2 5 7、P R O 2 6 8、P R O 2 9 0、P R O 3 6 0 0 6、P R O 3 6 3、P R O 3 6 5、P R O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、  
P R O 1 1 2 5、P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、  
P R O 1 3 7 9、P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、  
P R O 1 4 7 4、P R O 1 5 5 0、P R O 1 5 7 1、P R O 1 5 7 2、P R O 1 7 5 9、  
P R O 1 9 0 4、P R O 3 5 1 9 3、P R O 4 3 4 1、P R O 4 3 4 8、P R O 4 3 6 9、  
P R O 4 3 8 1、P R O 4 4 0 7、P R O 4 4 2 5、P R O 4 9 8 5、P R O 4 9 8 9、  
P R O 5 7 3 7、P R O 5 8 0 0、P R O 5 9 9 3、P R O 6 0 1 7、P R O 7 1 7 4、  
P R O 9 7 4 4、P R O 9 8 2 1、P R O 9 8 5 2、P R O 9 8 7 3、P R O 1 0 1 9 6、  
P R O 3 4 7 7 8、P R O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9 0、P R O 3 8 4 6 5、  
P R O 3 8 6 8 3またはP R O 8 5 1 6 1ポリペプチドの存在を調べた後、  
培養培地を、血清無含有培地と交換してもよい。

好ましくは、培養物を約6日間インキュベートし、次いで、ならし培地を回収する。

発現されたP R O 2 2 6、P R O 2 5 7、P R O 2 6 8、P R O 2 9 0、P R O 3 6 0 0 6、  
P R O 3 6 3、P R O 3 6 5、P R O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、  
P R O 1 1 2 5、P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、  
P R O 1 3 7 9、P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、  
P R O 1 4 7 4、P R O 1 5 5 0、P R O 1 5 7 1、P R O 1 5 7 2、P R O 1 7 5 9、  
P R O 1 9 0 4、P R O 3 5 1 9 3、P R O 4 3 4 1、P R O 4 3 4 8、P R O 4 3 6 9、  
P R O 4 3 8 1、P R O 4 4 0 7、P R O 4 4 2 5、P R O 4 9 8 5、P R O 4 9 8 9、  
P R O 5 7 3 7、P R O 5 8 0 0、P R O 5 9 9 3、P R O 6 0 1 7、P R O 7 1 7 4、  
P R O 9 7 4 4、P R O 9 8 2 1、P R O 9 8 5 2、P R O 9 8 7 3、P R O 1 0 1 9 6、  
P R O 3 4 7 7 8、P R O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9 0、P R O 3 8 4 6 5、  
P R O 3 8 6 8 3またはP R O 8 5 1 6 1を含む培地は、次いで、任意の選択した方法によって濃縮および精製され得る。

#### 【1841】

エピトープタグ化P R O 2 2 6、P R O 2 5 7、P R O 2 6 8、P R O 2 9 0、P R O 3 6 0 0 6、  
P R O 3 6 3、P R O 3 6 5、P R O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、  
P R O 1 1 2 5、P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、  
P R O 1 3 7 9、P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、  
P R O 1 4 7 4、P R O 1 5 5 0、P R O 1 5 7 1、P R O 1 5 7 2、P R O 1 7 5 9、  
P R O 1 9 0 4、P R O 3 5 1 9 3、P R O 4 3 4 1、P R O 4 3 4 8、P R O 4 3 6 9、  
P R O 4 3 8 1、P R O 4 4 0 7、P R O 4 4 2 5、P R O 4 9 8 5、P R O 4 9 8 9、  
P R O 5 7 3 7、P R O 5 8 0 0、P R O 5 9 9 3、P R O 6 0 1 7、P R O 7 1 7 4、  
P R O 9 7 4 4、P R O 9 8 2 1、P R O 9 8 5 2、P R O 9 8 7 3、P R O 1 0 1 9 6、  
P R O 3 4 7 7 8、P R O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9 0、P R O 3 8 4 6 5、  
P R O 3 8 6 8 3またはP R O 8 5 1 6 1も、宿主C H O細胞において発現させ得る。

P R O 2 2 6、P R O 2 5 7、P R O 2 6 8、P R O 2 9 0、P R O 3 6 0 0 6、P R O 3 6 3、  
P R O 3 6 5、P R O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、P R O 1 1 2 5、  
P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、P R O 1 3 7 9、  
P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、

PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161を、pRK5ベクターからサブクローニングしてもよい。

サブクローン挿入物はPCRに供し、インフレーションで、選択したエピトープタグ（例えば、ポリ-Hisタグなど）とともにバキュロウイルス発現ベクター内に融合させ得る。

ポリ-Hisタグ化PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161挿入物は、次いで、安定なクローンの選択のためのDHFRなどの選択マーカを含むSV40駆動ベクター内にサブクローニングされ得る。

最後に、CHO細胞にSV40駆動ベクターをトランスフェクトさせ得る（上記のようにして）。標識化は、上記のように、発現を確認するために行い得る。

発現されたポリ-Hisタグ化PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161を含む培養培地は、次いで、任意の選択した方法、例えば、 $Ni^{2+}$ -キレートアフィニティクロマトグラフィーなどによって濃縮および精製され得る。

#### 【1842】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161も、CHOおよび/またはC

10

20

30

40

50



O S 細胞において一過的発現手順によって、あるいはC H O 細胞において別の安定な発現手順によって発現され得る。

【 1 8 4 3 】

C H O 細胞における安定な発現は、下記の手順を用いて行われる。タンパク質はI g G 構築物（イムノアドヘシン）として発現させ、それぞれのタンパク質の可溶性形態のコード配列（例えば、細胞外ドメイン）を、ヒンジ、C H 2 およびC H 2 ドメインを含有するI g G 1 定常領域配列と融合させる、および／またはポリ - H i s タグ化された形態である。

【 1 8 4 4 】

P C R 増幅後、それぞれのDNAを、C H O 発現ベクター内に、A u s u b e l e t a l . , C u r r e n t P r o t o c o l s o f M o l e c u l a r B i o l o g y , U n i t 3 . 1 6 , J o h n W i l e y a n d S o n s ( 1 9 9 7 ) に記載のような標準的手法を用いてサブクローニングする。C H O 発現ベクターは、c D N A の簡便なシャトリングが可能となるように目的のDNAの5 ' および3 ' 側に適合性の制限部位を有するように構築する。C H O 細胞における発現に使用されるベクターは、L u c a s e t a l . N u c l . A c i d s R e s . 2 4 : 9 ( 1 7 7 4 - 1 7 7 9 ( 1 9 9 6 ) に記載されているとおりであり、対象のc D N A およびジヒドロ葉酸還元酵素（D H F R ）の発現を駆動するためのS V 4 0 初期プロモーター／エンハンサーを使用する。D H F R 発現により、トランスフェクション後のプラスミドの安定な維持のための選択が可能になる。

【 1 8 4 5 】

1 2 マイクログラムの所望のプラスミドDNAを、およそ1 0 0 0 0 0 0 0 個のC H O 細胞内に、市販のトランスフェクション試薬S u p e r f e c t （登録商標）（Q i a g e n ）, D o s p e r （登録商標）またはF u g e n e （登録商標）（B o e h r i n g e r M a n n h e i m ）を用いて導入する。細胞を、L u c a s e t a l . （前出）に記載のようにして培養する。およそ $3 \times 10^7$  細胞を、下記のようなさらなる培養および生成のために、アンプル内で凍結させる。

【 1 8 4 6 】

プラスミドDNAの入ったアンプルを、水浴内への配置によって解凍し、ボルテックスによって混合する。内容物を、1 0 m L の培地を入れた遠心分離チューブ内にピペティングし、1 0 0 0 r p m で5 分間遠心分離する。上清みを吸引し、細胞を1 0 m L の選択培地（5 % の0 . 2  $\mu$  m 透析濾過ウシ胎児血清含有0 . 2  $\mu$  m 濾過P S 2 0 ）中に再懸濁する。次いで、細胞のアリコートをし、9 0 m L の選択培地を入れた1 0 0 m L 容量のスピンナー内に採取する。1 ~ 2 日後、細胞を、1 5 0 m L の選択培養培地で満たした2 5 0 m L 容量のスピンナー内に移し、3 7 ° でインキュベートする。さらに2 ~ 3 日後、2 5 0 m L 、5 0 0 m L および2 0 0 0 m L 容量のスピンナーに $3 \times 10^5$  細胞 / m L を播種する。細胞培地を新たな培地と、遠心分離および生産培地中への再懸濁によって交換する。任意の適当なC H O 培地を使用し得るが、米国特許第5 , 1 2 2 , 4 6 9 号（1 9 9 2 年6 月1 6 日発行）に記載の生産培地を実際に使用することができる。3 L 容量の生産用スピンナーに $1.2 \times 10^6$  細胞 / m L で播種する。第0 日目、細胞数 p H を測定する（i e d e t e r m i n e d ） 。第1 日目、スピンナーから試料を採取し、濾過空気でのスパーキングを開始する。第2 日目、スピンナーから試料を採取し、温度を3 3 ° にシフトし、3 0 m L の5 0 0 g / L グルコースおよび0 . 6 m L の1 0 % 消泡剤（例えば、3 5 % ポリジメチルシロキサンエマルジョン、D o w C o r n i n g 3 6 5 医薬グレードE m u l s i o n ）を採用する。作製全体を通して、p H は、7 . 2 前後に維持されるように必要に応じて調整する。1 0 日後、またはバイアピリティが7 0 % 未満に低下したときまで、細胞培養物を、遠心分離および0 . 2 2  $\mu$  m フィルターに通す濾過によって回収する。濾液は、4 ° で保存するか、または直接、精製用カラム上に負荷するかのいずれかとした。

【 1 8 4 7 】

ポリ - H i s タグ化構築物に関して、タンパク質は、N i - N T A カラム（Q i a g e

10

20

30

40

50

n)を用いて精製する。精製前、イミダゾールをならし培地に5 mMの濃度まで添加する。ならし培地を、20 mM Hepes (pH 7.4) 0.3 M NaClおよび5 mM イミダゾール含有バッファー中で平衡化した6 mL容量のNi-NTAカラム上に、4~5 mL/分の流速で4 にてポンピングする。負荷後、カラムをさらなる平衡化バッファーで洗浄し、タンパク質を、0.25 M イミダゾールを含有する平衡化バッファーで溶出させる。高度に精製されたタンパク質を、続いて、25 mL容量のG25 Superfine (Pharmacia)カラムを用い、10 mM Hepes、0.14 M NaClおよび4%マンニトール(pH 6.8)を含有する保存バッファー中にて脱塩し、-80 で保存する。

#### 【1848】

イムノアドヘシン(Fc含有)構築物をならし培地から、以下のようにして精製する。ならし培地を、20 mMリン酸ナトリウムバッファー(pH 6.8)中で平衡化しておいた5 mL容量のタンパク質Aカラム(Pharmacia)上にポンピングする。負荷後、100 mMクエン酸(pH 3.5)で溶出する前に、カラムを平衡化バッファーで徹底的に洗浄する。溶出させたタンパク質は、1 mLずつの画分を、275 µLの1 M Tris バッファー(pH 9)を入れたチューブ内に収集することにより直ちに中和する。高度に精製されたタンパク質を、続いて、ポリ-Hisタグ化タンパク質について上記の保存バッファー中にて脱塩する。均質性を、SDS ポリアクリルアミドゲルおよびエドマン分解によるN末端アミノ酸配列決定によって評価する。

#### 【1849】

実施例52:

酵母でのPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161の発現

以下の方法は、酵母でのPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161の組換え発現を示す。

#### 【1850】

まず、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1

759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161の細胞内産生または分泌のための酵母発現ベクターを、ADH2 / GAPDHプロモーターから構築する。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161およびプロモーターをコードするDNAを、選択したプラスミドの適当な制限酵素部位内に挿入し、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161の細胞内発現を指向する。

分泌のため、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161をコードするDNAを、選択したプラスミド内に、ADH2 / GAPDHプロモーター、天然のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9

744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161シグナルペプチドまたは他の哺乳動物シグナルペプチド、あるいは、例えば、酵母 - 因子またはインペルターゼ分泌シグナル/リーダー配列、ならびにPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161の発現のためのリンカー配列（必要であれば）をコードするDNAとともにクローニングし得る。

10

20

30

40

50

#### 【1851】

次いで、酵母細胞、例えば酵母菌株AB110などを、上記の発現プラスミドで形質転換し、選択した発酵培地中で培養させ得る。形質転換された酵母の上清みを、10%トリクロロ酢酸を用いた沈殿によって解析し、SDS-PAGEによって分離した後、ゲルをクマシーブルー染色で染色し得る。

#### 【1852】

組換えPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161を、続いて、遠心分離によって発酵培地から酵母細胞を取り出し、次いで、選択したカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することにより単離および精製し得る。

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161を含む濃縮物は、選択したカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製され得る。

#### 【1853】

実施例53：

バキュロウイルス感染昆虫細胞でのPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161の発現

10

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞におけるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161の組換え発現を示す。

20

#### 【1854】

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161をコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクター内に含まれるエピトープタグの上流に融合させる。かかるエピトープタグとしては、ポリ-Hisタグおよび免疫グロブリンタグ(IgGのFc領域など)が挙げられる。さまざまなプラスミド、例えば、市販のプラスミド(例えば、pVL1393(Novagen)など)から誘導されるプラスミドを使用し得る。

30

40

簡単には、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO572

50

90、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161をコードする配列またはPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161のコード配列の所望の部分、例えば、タンパク質が細胞外のものである場合は、膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列または成熟タンパク質をコードする配列を、5'および3'領域に相補的なプライマーを用いるPCRによって増幅させる。5'プライマーは、(選択した)フランキング制限酵素部位を組み込んでよい。次いで、産物を、選択した制限酵素で消化し、発現ベクター内にサブクローニングする。

10

#### 【1855】

組換えバキュロウイルスを、上記のプラスミドおよびBaculoGold(商標)ウイルスDNA(PharMingen)をSpodoptera frugiperda(「Sf9」)細胞(ATCC CRL 1711)内に、リポフェクチン(GIBCO-BRLから市販)を用いてコトランスフェクトすることにより作製する。28℃で4~5日間のインキュベーション後、放出されたウイルスを回収し、さらなる増幅に用いる。ウイルス感染およびタンパク質発現は、O'Reilly et al. Baculovirus 発現ベクター: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載のように行う。

20

#### 【1856】

発現されたポリ-ヒスタグ化PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161は、次いで、例えば、Ni<sup>2+</sup>-キレートアフィニティークロマトグラフィーによって以下のようにして精製され得る。抽出物は、組換えウイルス感染Sf9細胞から、Rupert et al. Nature, 362: 175-179 (1993)に記載のように調製する。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、音波破碎バッファー(25mM Hepes、pH 7.9; 12.5mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1%NP-40; 0.4M KCl)中に再懸濁し、氷上で20秒間、2回音波破碎する。音波破碎物を遠心分離によって清澄化し、上清みを、負荷バッファー(50mM リン酸塩、300mM NaCl、10%グリセロール、pH 7.8)中で50倍に希釈し、0.45μmフィルターに通して濾過する。Ni<sup>2+</sup>NTAアガロースカラム(Qiagenから市販)を5mL容量の床を用いて調製し、25mLの水で洗浄し、25mLの負荷バッファーで平衡化する。濾過した細胞抽出物をカラム上に0.5mL/分で負荷する。カラムをベースラインA<sub>280</sub>まで負荷バッファーで洗浄し、この時点で、画分収集

30

40

50

を開始する。次に、カラムを二次洗浄バッファー（50 mM リン酸塩；300 mM NaCl、10%グリセロール、pH 6.0）で洗浄し、これにより、非特異的結合タンパク質を溶出する。再度  $A_{280}$  ベースラインに達した後、カラムを二次洗浄バッファー中0~500 mM イミダゾールの勾配で展開させる。1 mL ずつの画分を収集し、SDS-PAGE および銀染色または  $Ni^{2+}$ -NTA コンジュゲートアルカリホスファターゼ（Qiagen）を用いたウエスタンブロットによって解析する。

溶出された His<sub>10</sub> タグ化 PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683 または PRO85161 を含む画分をプールし、負荷バッファーに対して透析する。

#### 【1857】

あるいはまた、IgG タグ化（またはFc タグ化）PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683 または PRO85161 の精製が、既知のクロマトグラフィー技術、例えば、プロテインA またはプロテインG カラムクロマトグラフィーなどを用いて行なわれ得る。

#### 【1858】

##### 実施例 54：

##### GeneExpress（登録商標）を用いた組織発現プロファイリング

遺伝子発現情報を含む公的データベース（GeneExpress（登録商標）、Gene Logic Inc.、Gaithersburg、MD）を、その発現が、他の腫瘍（1種類もしくは複数種）および/または正常組織と比べて、目的の特定の腫瘍組織（1種類または複数種）において有意に上方調節されるポリペプチド（およびそのコード核酸）を同定する試みにおいて解析した。具体的には、GeneExpress（登録商標）データベースの解析は、Gene Logic Inc.、Gaithersburg、MD から入手可能な GeneExpress（登録商標）データベースとの使用のためのソフトウェア、または Genentech、Inc. において書き込みおよび開発された GeneExpress（登録商標）データベースとの使用のための公的ソフトウェアのいずれかを用いて行なった。解析における陽性ヒットの評価は、例えば、正常な必須の組織および/または正常な増殖している組織における組織特異性、腫瘍特異性および発現レベルを含むいくつかの基準に基づく。以下は、GeneExpress（登録商標）データベースの解析で測定したその組織発現プロファイルにより、他の腫瘍（1種類もしくは複数種）および/または正常組織と比べ、特定の腫瘍（1種類または複数種）内での高い組織発現および発現の有意な上方調節が証明され、任意選択で、正常な必須の組織お

10

20

30

40

50

よび／または正常な増殖している組織において比較的低い発現が証明される分子の一覧である。組織発現プロファイリングは、いくつかのUNQ遺伝子において行なった。その結果を実施例48に開示する。

#### 【1859】

実施例55：

癌性腫瘍におけるUNQ遺伝子の上方調節を検出するためのマイクロアレイ解析

核酸マイクロアレイは、数千の遺伝子配列を含むものである場合が多く、罹病組織において、その正常対応組織と比べて示差的に発現される遺伝子の同定に有用である。核酸マイクロアレイを用いて、試験および対照組織試料由来の試験および対照mRNA試料を逆転写し、標識してcDNAプローブを作製した。

10

次いで、cDNAプローブを、固相支持体上に固定化した核酸のアレイにハイブリダイズさせる。アレイは、該アレイの各構成員の配列および位置が既知であるように構成される。例えば、ある種の疾患状態で発現されることがわかっている遺伝子の選択肢を、固相支持体上にアレイ状に整列させ得る。

標識プローブとアレイ構成員とのハイブリダイゼーションにより、プローブを誘導した試料が、該遺伝子を発現することが示される。試験（疾患組織）試料由来のプローブのハイブリダイゼーションシグナルが対照（正常組織）試料由来のプローブのハイブリダイゼーションシグナルより大きい場合、該疾患組織で過剰発現される遺伝子（1つまたは複数）が同定される。

この結果が暗示することは、罹病組織で過剰発現されるタンパク質が、疾患状態の存在の診断用マーカーとしてだけでなく、疾患状態の処置ための治療標的としても有用であるということである。

20

#### 【1860】

核酸のハイブリダイゼーションおよびマイクロアレイ技術の方法論は、当該技術分野でよく知られている。一例において、ハイブリダイゼーションのための核酸の具体的な調製物およびプローブ、スライドならびにハイブリダイゼーション条件はすべて、2001年3月30日に出願されたPCT特許出願第PCT/US01/10482号に詳述されており、これは、引用により本明細書に組み込まれる。

#### 【1861】

本発明の実施例では、特定の癌性腫瘍（1種類もしくは複数種）で過剰発現されるポリペプチドを同定する試みにおいて、種々のヒト組織に由来する癌性腫瘍を、異なる組織型および／または非癌性ヒト組織に由来する癌性腫瘍と比べて上方調節される遺伝子発現について試験した。特定のある実験では、同じ組織型（多くの場合、同じ患者由来）の癌性ヒト腫瘍組織および非癌性ヒト腫瘍組織を採取し、UNQポリペプチド発現について解析した。さらに、さまざまな異なる任意のヒト腫瘍に由来する癌性ヒト腫瘍組織を採取し、上皮の起源、例えば、肝臓、腎臓および肺の非癌性ヒト組織をプールすることにより調製した「普遍的」上皮対照試料と比較した。プールした組織から単離されるmRNAは、これらの異なる組織から発現された遺伝子産物の混合物である。プールした対照試料を用いたマイクロアレイハイブリダイゼーション実験により、2色解析において線形プロットを作成した。

30

次いで、2色解析において作成した直線の傾きを用い、各実験での（試験：対照検出）の比を標準化した。次いで、種々の実験の標準化した比を比較し、遺伝子発現のクラスタリングを同定するために使用した。したがって、プールした「普遍的対照」試料により、単純な2試料比較での有効な相対的遺伝子発現の測定が可能になっただけでなく、いくつかの実験間での多試料比較も可能になった。

40

#### 【1862】

本発明の実験では、本明細書に記載のUNQポリペプチドコード核酸配列から誘導した核酸プローブを、マイクロアレイの創製に使用し、種々の腫瘍組織由来のRNAを、該アレイとのハイブリダイゼーションに使用した。以下にこれらの実験の結果を示すが、これは、本発明の種々のUNQポリペプチドが種々のヒト腫瘍組織において、その正常な対応

50



組織（１種類または複数種）と比べて有意に過剰発現されることを示す。さらに、以下に示す分子はすべて、その特異的腫瘍組織（１種類または複数種）で、「普遍的」上皮対照と比べて有意に過剰発現される。

上記のように、これらのデータは、本発明のＵＮＱポリペプチドが、１種類以上の癌性腫瘍の存在の診断用マーカーとして有用であるだけでなく、該腫瘍の処置のための治療標的としての目的を果たすことを示す。マイクロアレイ解析は、いくつかのＵＮＱ遺伝子において行なった。その結果を実施例４８に開示する。

#### 【１８６３】

実施例５６：

ＵＮＱ mRNA 発現の定量的解析

このアッセイでは、５'ヌクレアーゼアッセイ（例えば、TaqMan（登録商標））およびリアルタイム定量的PCR（例えば、ABI Prism 7700 Sequence Detection System（登録商標）（Perkin Elmer、Applied Biosystems Division、Foster City、CA））を使用し、癌性腫瘍（１種類または複数種）において、他の癌性腫瘍または正常な非癌性組織と比べて有意に過剰発現される遺伝子を見出した。５'ヌクレアーゼアッセイ反応は、Taq DNAポリメラーゼ酵素の５'エキソヌクレアーゼ活性を利用して遺伝子発現をリアルタイムでモニターする蛍光PCR系技術である。２種類のオリゴヌクレオチドプライマー（その配列は目的の遺伝子またはEST配列に基づく）を用い、PCR反応に典型的なアンプリコンを作製する。第３のオリゴヌクレオチドまたはプローブは、該２つのPCRプライマー間に位置するヌクレオチド配列が検出されるように設計される。プローブは、Taq DNAポリメラーゼ酵素によって伸長可能でないものであり、レポーター蛍光色素およびクエンチャー蛍光色素で標識されている。レポーター色素からのレーザー誘導型発光はいずれも、該２つの色素がプローブ上で互いに近接した位置になると、該クエンチング色素によって消光される。PCR増幅反応中、Taq DNAポリメラーゼ酵素は、鋳型依存的にプローブを切断する。その結果生じるプローブ断片は溶液中で解離し、放出されたレポーター色素からのシグナルには、第２のフルオロフォアの消光効果はない。１分子のレポーター色素が遊離するごとに新たな分子が合成され、非消光レポーター色素の検出により、データの定量的解釈の根拠が提供される。

#### 【１８６４】

５'ヌクレアーゼ手順は、リアルタイム定量的PCR装置、例えば、ABI Prism 7700TM Sequence Detectionにて行なう。該システムは、サーモサイクラー、レーザー、電荷結合素子（CCD）カメラおよびコンピュータからなる。該システムにより、サーモサイクラーの９６ウェル形式にて試料を増幅させる。増幅中、レーザー誘導型蛍光シグナルを、９６個のウェルすべてについて光ファイバーケーブルによりリアルタイムで収集し、CCDで検出する。該システムは、機器の作動のため、およびデータ解析のためのソフトウェアを含む。

#### 【１８６５】

スクリーニングのための出発材料は、さまざまな異なる癌性組織から単離したmRNAとした。

該mRNAは、例えば、蛍光測定により正確に定量される。

陰性対照として、RNAを、試験対象の癌性組織と同じ組織型の種々の正常組織から単離した。

#### 【１８６６】

５'ヌクレアーゼアッセイデータを、まず、Ctすなわち閾値サイクルで示す。これは、蛍光レポーターシグナルの蓄積がバックグラウンドレベルを超えるサイクルと規定される。Ct値を、癌mRNAの結果を正常なヒトmRNAの結果と比べたときの、核酸試料中の特定の標的配列の相対出発コピー数の定量的測度として用いる。１Ct単位は１PCRサイクルまたは正常に対しておよそ２倍の相対増加に相当するため、２単位は４倍相対増加に相当する、３単位は８倍相対増加に相当するなどであり２種類以上の異なる組織

間での mRNA 発現の相対増加倍数が定量的に測定され得る。この技術を用いて、分子は、特定の腫瘍（１種類もしくは複数種）において、その正常な非癌性対応組織（１種類または複数種）（ともに同じおよび異なる組織ドナー由来）と比べて有意に過剰発現されると同定され、したがって、哺乳動物における癌の診断および治療の優れたポリペプチド標的である。

U N Q 遺伝子に関する具体的な結果実施例 4 8 に開示する。

#### 【 1 8 6 7 】

実施例 5 7 :

#### インサイチュハイブリダイゼーション

インサイチュハイブリダイゼーションは、細胞または組織の調製物中の核酸配列の検出および局在化のための強力な多目的な技術である。これは、例えば、遺伝子発現部位を同定するため、転写の組織分布を解析するため、ウイルス感染を特定および局在化するため、特異的 mRNA 合成の変化を追跡するため、および染色体マッピングを補助するために有用であり得る。

#### 【 1 8 6 8 】

インサイチュハイブリダイゼーションは、L u および G i l l e t t 、 C e l l V i s i o n 1 : 1 6 9 - 1 7 6 ( 1 9 9 4 ) のプロトコルの最適化バージョンに従って、P C R 作製 <sup>3 3</sup> P 標識リボプローブを用いて行なった。簡単には、ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト組織を切片化し、脱パラフィン処理し、プロテイナーゼ K ( 2 0 g / m l ) 中で 1 5 分間 3 7 ° でタンパク質除去し、インサイチュハイブリダイゼーションのために、L u および G i l l e t t ( 前掲 ) に記載のようにしてさらに処理した。[ <sup>3 3</sup> - P ] U T P 標識アンチセンスリボプローブを P C R 産物から作製し、5 5 ° で一晩ハイブリダイズさせた。

スライドを K o d a k N T B 2 核トラック乳剤中に浸漬し、4 週間露光した。

#### 【 1 8 6 9 】

#### <sup>3 3</sup> P - リボプローブ合成

6 . 0 μ l ( 1 2 5 m C i ) の <sup>3 3</sup> P - U T P ( A m e r s h a m B F 1 0 0 2 、 S A < 2 0 0 0 C i / m m o l ) をスピードバック乾燥した。

乾燥 <sup>3 3</sup> P - U T P を入れた各チューブに、以下の成分を添加した :

2 . 0 μ l 5 × 転写バッファー

0 μ l D T T ( 1 0 0 m M )

2 . 0 μ l N T P ミックス ( 2 . 5 m M :

1 0 μ ; 各々 1 0 m M の G T P 、 C T P & A T P + 1 0 μ l H <sub>2</sub> O )

0 μ l U T P ( 5 0 μ M )

0 μ l R n a s i n

0 μ l D N A 鋳型 ( 1 μ g )

0 μ l H <sub>2</sub> O

0 μ l R N A ポリメラーゼ ( 通常、P C R 産物について T 3 = A S 、 T 7 = S )

チューブを 3 7 ° で 1 時間インキュベートした。

1 . 0 μ l の R Q 1 D N アーゼを添加した後、3 7 ° で 1 5 分間インキュベーションした。

9 0 μ l の T E ( 1 0 m M T r i s p H 7 . 6 / 1 m M E D T A p H 8 . 0 ) を添加し、混合物を D E 8 1 紙上にピペティングした。

残留溶液を M i c r o c o n - 5 0 限外濾過ユニットに負荷し、プログラム 1 0 を用いてスピンさせた ( 6 分間 ) 。

この濾過ユニットを第 2 のチューブ上に反転 ( i n v e r t ) させ、プログラム 2 を用いてスピンさせた ( 3 分間 ) 。

最終回収スピン後、1 0 0 μ l T E を添加した。

1 μ l の最終産物を D E 8 1 紙上にピペティングし、6 m l の B i o f l u o r I I 中で計数した。

10

20

30

40

50

プローブを T B E / 尿素ゲル上で泳動させた。

【 1 8 7 0 】

1 ~ 3  $\mu$  l のプローブまたは 5  $\mu$  l の R N A M r k I I I を 3  $\mu$  l の負荷バッファに添加した。9 5 のヒートブロックで 3 分間加熱後、プローブを氷上に直に配置した。

ゲルのウェルをフラッシュ洗浄し、試料を負荷し、1 8 0 ~ 2 5 0 ボルトで 4 5 分間泳動させた。

ゲルをサランラップでラップし、- 7 0 のフリーザー内で 1 時間から一晚、増感スクリーンを有する X A R フィルムに露光させた。

<sup>3</sup> <sup>3</sup> P - ハイブリダイゼーション

10

A . 凍結切片の前処理

スライドをフリーザーから取り出し、アルミニウムトレイ上に置き、室温で 5 分間解凍した。

トレイを 5 5 のインキュベーター内に 5 分間入れ、凝縮を低減させた。

スライドをドラフト内で氷上 4 % パラホルムアルデヒドにて 1 0 分間固定し、0 . 5 x S S C 中で 5 分間、室温にて洗浄した ( 2 5 m l の 2 0 x S S C + 9 7 5 m l の S Q H<sub>2</sub>O ) 。

0 . 5  $\mu$  g / m l のプロテイナーゼ K 中で 1 0 分間 3 7 にてタンパク質除去後 ( 2 5 0 m l の予備加温 R N アーゼ無含有 R N A s e バッファ中 1 2 . 5  $\mu$  l の 1 0 m g / m l のストック)、切片を 0 . 5 x S S C 中で 1 0 分間室温にて洗浄した。

20

切片を 7 0 %、9 5 %、1 0 0 % エタノール中で、各々 2 分間脱水した。

【 1 8 7 1 】

B . パラフィン包埋切片の前処理

スライドを脱パラフィン処理し、S Q H<sub>2</sub>O 中に入れ、2 x S S C 中で室温にて各々 5 分間 2 回リンス処理した。切片を、2 0  $\mu$  g / m l のプロテイナーゼ K ( 2 5 0 m l の R N アーゼ無含有 R N アーゼバッファ中 1 0 m g / m l を 5 0 0  $\mu$  l ; 3 7 、1 5 分間 ) ( ヒト胚 )、または 8 x プロテイナーゼ K ( 2 5 0 m l の R n アーゼバッファ中 1 0 0  $\mu$  l、3 7 、3 0 分間 ) ( ホルマリン組織 ) 中でタンパク質除去した。続いて、0 . 5 x S S C 中でのリンス処理および脱水を上記のようにして行なった。

【 1 8 7 2 】

30

C . プレハイブリダイゼーション

スライドを、内側を B o x バッファ ( 4 x S S C、5 0 % ホルムアミド ) 飽和濾紙で覆ったプラスチックボックス内に並べた。

【 1 8 7 3 】

D . ハイブリダイゼーション

1 . 0 x 1 0<sup>6</sup> c p m のプローブおよび 1 . 0  $\mu$  l の t R N A ( 5 0 m g / m l ストック ) / スライドを 9 5 で 3 分間加熱した。スライドを氷上で冷却し、4 8  $\mu$  l のハイブリダイゼーションバッファをスライドごとに添加した。

ボルテックス後、5 0  $\mu$  l の <sup>3</sup> <sup>3</sup> P ミックスを、スライド上の 5 0  $\mu$  l のプレハイブリダイゼーション液に添加した。スライドを一晚 5 5 でインキュベートした。

40

【 1 8 7 4 】

E . 洗浄

洗浄は、2 x 1 0 分間、2 x S S C、E D T A を用いて室温で行なった ( 4 0 0 m l の 2 0 x S S C + 1 6 m l の 0 . 2 5 M E D T A、V<sub>f</sub> = 4 L ) 後、R N アーゼ A 処理を 3 7 で 3 0 分間行なった ( 2 5 0 m l の R n アーゼバッファ中 1 0 m g / m l を 5 0 0  $\mu$  l = 2 0  $\mu$  g / m l )。スライドを 2 x 1 0 分間、2 x S S C、E D T A を用いて室温で洗浄した。ストリンジェンシー洗浄条件は、以下のとおりとした。

2 時間 5 5 で 0 . 1 x S S C、E D T A ( 2 0 m l の 2 0 x S S C + 1 6 m l の E D T A、V<sub>f</sub> = 4 L )。

【 1 8 7 5 】

50

## F．オリゴヌクレオチド

インサイチュ解析を、本明細書中に開示したさまざまなDNA配列において行なった。これらの解析に用いたオリゴヌクレオチドは、添付の図面に示した核酸（またはその相補配列）に相補的となるように入手した。

## 【1876】

## G．結果

インサイチュ解析を、本明細書中に開示したさまざまなDNA配列において行なった。その結果を実施例48に開示する。

## 【1877】

実施例58：

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161に結合する抗体の調製

この実施例は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161に特異的に結合し得るモノクローナル抗体の調製を示す。

## 【1878】

モノクローナル抗体を作製するための手法は当該技術分野で知られており、例えば、Goding（前出）に記載されている。

使用され得る免疫原としては、精製PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチド、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281

、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドを含む融合タンパク質、および組換えPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドを細胞表面上に発現する細胞が挙げられる。免疫原の選択は、当業者が必要以上に実験を行うことなく行い得る。

10

20

#### 【1879】

Balb/cなどのマウスを、完全フロイントアジュバント中に乳化させたPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161免疫原で免疫処置し、1~100マイクログラムの量で皮下または腹腔内注射する。

30

あるいはまた、免疫原を、MPL-TDMアジュバント(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)中に乳化させ、動物の後肢支脚皿に注射する。次いで、免疫処置されたマウスを10~12日後、選択したアジュバント中に乳化させたさらなる免疫原で追加免疫刺激する。その後、数週間、マウスにさらなる免疫処置注射により追加免疫刺激してもよい。

40

血清試料をマウスから、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、

50

抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683または抗PRO85161抗体を検出するためのELISAアッセイにおける試験のために、眼窩後採血によって定期的に採取され得る。

【1880】

適当な抗体力価が検出された後、抗体に関して「陽性」の動物にPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161の最終の静脈内注射剤が注射され得る。3～4日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を回収する。

次いで、脾臓細胞を、選択したマウス骨髓腫細胞株（例えば、ATCCから番号CRL1597で入手可能なP3X63AgU.1など）に融合させる（35%ポリエチレングリコールを用いて）。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、これは、非融合細胞、骨髓腫ハイブリッドおよび脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害するためのHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン）培地を入れた96ウェル組織培養プレートにプレートングされ得る。

【1881】

ハイブリドーマ細胞はELISAで、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161に対する反応性に関してスクリーニングされる。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「陽性」ハイブリドーマ細胞の決定は、当該技術分野の技量の範囲内である。

【1882】

10

20

30

40

50

陽性ハイブリドーマ細胞を同系 B a l b / c マウスに腹腔内注射すると、抗 P R O 2 2 6、抗 P R O 2 5 7、抗 P R O 2 6 8、抗 P R O 2 9 0、抗 P R O 3 6 0 0 6、抗 P R O 3 6 3、抗 P R O 3 6 5、抗 P R O 3 8 2、抗 P R O 4 4 4、抗 P R O 7 0 5、抗 P R O 1 0 7 1、抗 P R O 1 1 2 5、抗 P R O 1 1 3 4、抗 P R O 1 1 5 5、抗 P R O 1 2 8 1、抗 P R O 1 3 4 3、抗 P R O 1 3 7 9、抗 P R O 1 3 8 0、抗 P R O 1 3 8 7、抗 P R O 1 4 1 9、抗 P R O 1 4 3 3、抗 P R O 1 4 7 4、抗 P R O 1 5 5 0、抗 P R O 1 5 7 1、抗 P R O 1 5 7 2、抗 P R O 1 7 5 9、抗 P R O 1 9 0 4、抗 P R O 3 5 1 9 3、抗 P R O 4 3 4 1、抗 P R O 4 3 4 8、抗 P R O 4 3 6 9、抗 P R O 4 3 8 1、抗 P R O 4 4 0 7、抗 P R O 4 4 2 5、抗 P R O 4 9 8 5、抗 P R O 4 9 8 9、抗 P R O 5 7 3 7、抗 P R O 5 8 0 0、抗 P R O 5 9 9 3、抗 P R O 6 0 1 7、抗 P R O 7 1 7 4、抗 P R O 9 7 4 4、抗 P R O 9 8 2 1、抗 P R O 9 8 5 2、抗 P R O 9 8 7 3、抗 P R O 1 0 1 9 6、抗 P R O 3 4 7 7 8、抗 P R O 2 0 2 3 3、抗 P R O 2 1 9 5 6、抗 P R O 5 7 2 9 0、抗 P R O 3 8 4 6 5、抗 P R O 3 8 6 8 3 または抗 P R O 8 5 1 6 1 モノクローナル抗体を含有する腹水が生成され得る。

あるいはまた、ハイブリドーマ細胞を組織培養フラスコまたはローラーボトル内で培養してもよい。腹水内に産生されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈殿の後ゲル排除クロマトグラフィーを用いて行い得る。あるいはまた、タンパク質 A またはタンパク質 G に対する抗体の結合に基づくアフィニティクロマトグラフィーを使用し得る。

#### 【 1 8 8 3 】

実施例 59 :

特異的抗体を用いた P R O 2 2 6、P R O 2 5 7、P R O 2 6 8、P R O 2 9 0、P R O 3 6 0 0 6、P R O 3 6 3、P R O 3 6 5、P R O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、P R O 1 1 2 5、P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、P R O 1 3 7 9、P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、P R O 1 4 7 4、P R O 1 5 5 0、P R O 1 5 7 1、P R O 1 5 7 2、P R O 1 7 5 9、P R O 1 9 0 4、P R O 3 5 1 9 3、P R O 4 3 4 1、P R O 4 3 4 8、P R O 4 3 6 9、P R O 4 3 8 1、P R O 4 4 0 7、P R O 4 4 2 5、P R O 4 9 8 5、P R O 4 9 8 9、P R O 5 7 3 7、P R O 5 8 0 0、P R O 5 9 9 3、P R O 6 0 1 7、P R O 7 1 7 4、P R O 9 7 4 4、P R O 9 8 2 1、P R O 9 8 5 2、P R O 9 8 7 3、P R O 1 0 1 9 6、P R O 3 4 7 7 8、P R O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9 0、P R O 3 8 4 6 5、P R O 3 8 6 8 3 または P R O 8 5 1 6 1 ポリペプチドの精製

天然または組換え P R O 2 2 6、P R O 2 5 7、P R O 2 6 8、P R O 2 9 0、P R O 3 6 0 0 6、P R O 3 6 3、P R O 3 6 5、P R O 3 8 2、P R O 4 4 4、P R O 7 0 5、P R O 1 0 7 1、P R O 1 1 2 5、P R O 1 1 3 4、P R O 1 1 5 5、P R O 1 2 8 1、P R O 1 3 4 3、P R O 1 3 7 9、P R O 1 3 8 0、P R O 1 3 8 7、P R O 1 4 1 9、P R O 1 4 3 3、P R O 1 4 7 4、P R O 1 5 5 0、P R O 1 5 7 1、P R O 1 5 7 2、P R O 1 7 5 9、P R O 1 9 0 4、P R O 3 5 1 9 3、P R O 4 3 4 1、P R O 4 3 4 8、P R O 4 3 6 9、P R O 4 3 8 1、P R O 4 4 0 7、P R O 4 4 2 5、P R O 4 9 8 5、P R O 4 9 8 9、P R O 5 7 3 7、P R O 5 8 0 0、P R O 5 9 9 3、P R O 6 0 1 7、P R O 7 1 7 4、P R O 9 7 4 4、P R O 9 8 2 1、P R O 9 8 5 2、P R O 9 8 7 3、P R O 1 0 1 9 6、P R O 3 4 7 7 8、P R O 2 0 2 3 3、P R O 2 1 9 5 6、P R O 5 7 2 9 0、P R O 3 8 4 6 5、P R O 3 8 6 8 3 または P R O 8 5 1 6 1 ポリペプチドは、タンパク質精製技術分野のさまざまな標準技術によって精製され得る。

例えば、p r o - P R O 2 2 6、p r o - P R O 2 5 7、p r o - P R O 2 6 8、p r o - P R O 2 9 0、p r o - P R O 3 6 0 0 6、p r o - P R O 3 6 3、p r o - P R O 3 6 5、p r o - P R O 3 8 2、p r o - P R O 4 4 4、p r o - P R O 7 0 5、p r o - P R O 1 0 7 1、p r o - P R O 1 1 2 5、p r o - P R O 1 1 3 4、p r o - P R O 1 1 5 5、p r o - P R O 1 2 8 1、p r o - P R O 1 3 4 3、p r o - P R O 1 3 7 9、p r o - P R O 1 3 8 0、p r o - P R O 1 3 8 7、p r o - P R O 1 4 1 9、p r o -

PRO1433、pro-PRO1474、pro-PRO1550、pro-PRO1571、pro-PRO1572、pro-PRO1759、pro-PRO1904、pro-PRO35193、pro-PRO4341、pro-PRO4348、pro-PRO4369、pro-PRO4381、pro-PRO4407、pro-PRO4425、pro-PRO4985、pro-PRO4989、pro-PRO5737、pro-PRO5800、pro-PRO5993、pro-PRO6017、pro-PRO7174、pro-PRO9744、pro-PRO9821、pro-PRO9852、pro-PRO9873、pro-PRO10196、pro-PRO34778、pro-PRO20233、pro-PRO21956、pro-PRO57290、pro-PRO38465、pro-PRO38683またはpro-PRO85161ポリペプチド、成熟PRO226、成熟PRO257、成熟PRO268、成熟PRO290、成熟PRO36006、成熟PRO363、成熟PRO365、成熟PRO382、成熟PRO444、成熟PRO705、成熟PRO1071、成熟PRO1125、成熟PRO1134、成熟PRO1155、成熟PRO1281、成熟PRO1343、成熟PRO1379、成熟PRO1380、成熟PRO1387、成熟PRO1419、成熟PRO1433、成熟PRO1474、成熟PRO1550、成熟PRO1571、成熟PRO1572、成熟PRO1759、成熟PRO1904、成熟PRO35193、成熟PRO4341、成熟PRO4348、成熟PRO4369、成熟PRO4381、成熟PRO4407、成熟PRO4425、成熟PRO4985、成熟PRO4989、成熟PRO5737、成熟PRO5800、成熟PRO5993、成熟PRO6017、成熟PRO7174、成熟PRO9744、成熟PRO9821、成熟PRO9852、成熟PRO9873、成熟PRO10196、成熟PRO34778、成熟PRO20233、成熟PRO21956、成熟PRO57290、成熟PRO38465、成熟PRO38683または成熟PRO85161ポリペプチド、またはpre-PRO226、pre-PRO257、pre-PRO268、pre-PRO290、pre-PRO36006、pre-PRO363、pre-PRO365、pre-PRO382、pre-PRO444、pre-PRO705、pre-PRO1071、pre-PRO1125、pre-PRO1134、pre-PRO1155、pre-PRO1281、pre-PRO1343、pre-PRO1379、pre-PRO1380、pre-PRO1387、pre-PRO1419、pre-PRO1433、pre-PRO1474、pre-PRO1550、pre-PRO1571、pre-PRO1572、pre-PRO1759、pre-PRO1904、pre-PRO35193、pre-PRO4341、pre-PRO4348、pre-PRO4369、pre-PRO4381、pre-PRO4407、pre-PRO4425、pre-PRO4985、pre-PRO4989、pre-PRO5737、pre-PRO5800、pre-PRO5993、pre-PRO6017、pre-PRO7174、pre-PRO9744、pre-PRO9821、pre-PRO9852、pre-PRO9873、pre-PRO10196、pre-PRO34778、pre-PRO20233、pre-PRO21956、pre-PRO57290、pre-PRO38465、pre-PRO38683またはpre-PRO85161ポリペプチドは、目的のPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、P



PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドに特異的な抗体を用いるイムノアフィニティクロマトグラフィーによって精製される。一般に、イムノアフィニティカラムは、抗PRO226、抗PRO257、抗PRO268、抗PRO290、抗PRO36006、抗PRO363、抗PRO365、抗PRO382、抗PRO444、抗PRO705、抗PRO1071、抗PRO1125、抗PRO1134、抗PRO1155、抗PRO1281、抗PRO1343、抗PRO1379、抗PRO1380、抗PRO1387、抗PRO1419、抗PRO1433、抗PRO1474、抗PRO1550、抗PRO1571、抗PRO1572、抗PRO1759、抗PRO1904、抗PRO35193、抗PRO4341、抗PRO4348、抗PRO4369、抗PRO4381、抗PRO4407、抗PRO4425、抗PRO4985、抗PRO4989、抗PRO5737、抗PRO5800、抗PRO5993、抗PRO6017、抗PRO7174、抗PRO9744、抗PRO9821、抗PRO9852、抗PRO9873、抗PRO10196、抗PRO34778、抗PRO20233、抗PRO21956、抗PRO57290、抗PRO38465、抗PRO38683または抗PRO85161ポリペプチド抗体を、活性化したクロマトグラフィー樹脂に共有結合させることにより構築される。

10

#### 【1884】

ポリクローナル免疫グロブリンを、免疫血清から、硫酸アンモニウムでの沈殿、または固定化したタンパク質A (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.) 上での精製のいずれかによって調製する。同様に、モノクローナル抗体を、マウス腹水から、硫酸アンモニウム沈殿または固定化したタンパク質A上でのクロマトグラフィーによって調製する。部分精製された免疫グロブリンを、CnBr 活性化SEPHAROSE (商標) (Pharmacia LKB Biotechnology) などのクロマトグラフィー樹脂に共有結合させる。抗体を樹脂にカップリングさせ、樹脂をブロックし、誘導体樹脂を、製造業者の使用説明書に従って洗浄する。

20

#### 【1885】

かかるイムノアフィニティカラムは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドを可溶性形態で含む細胞から画分を調製することによる、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドの精製に利用される。

30

40

50

この調製物を、デタージェントの添加による分画遠心分離により得られた完全体細胞または亜細胞画分の可溶化によって、または当該技術分野でよく知られた他の方法によって誘導する。あるいはまた、シグナル配列を含む可溶性ポリペプチドを、有用な量で、該細胞を培養している培地中に分泌し得る。

【 1 8 8 6 】

可溶性の PRO 2 2 6、PRO 2 5 7、PRO 2 6 8、PRO 2 9 0、PRO 3 6 0 0 6、PRO 3 6 3、PRO 3 6 5、PRO 3 8 2、PRO 4 4 4、PRO 7 0 5、PRO 1 0 7 1、PRO 1 1 2 5、PRO 1 1 3 4、PRO 1 1 5 5、PRO 1 2 8 1、PRO 1 3 4 3、PRO 1 3 7 9、PRO 1 3 8 0、PRO 1 3 8 7、PRO 1 4 1 9、PRO 1 4 3 3、PRO 1 4 7 4、PRO 1 5 5 0、PRO 1 5 7 1、PRO 1 5 7 2、PRO 1 7 5 9、PRO 1 9 0 4、PRO 3 5 1 9 3、PRO 4 3 4 1、PRO 4 3 4 8、PRO 4 3 6 9、PRO 4 3 8 1、PRO 4 4 0 7、PRO 4 4 2 5、PRO 4 9 8 5、PRO 4 9 8 9、PRO 5 7 3 7、PRO 5 8 0 0、PRO 5 9 9 3、PRO 6 0 1 7、PRO 7 1 7 4、PRO 9 7 4 4、PRO 9 8 2 1、PRO 9 8 5 2、PRO 9 8 7 3、PRO 1 0 1 9 6、PRO 3 4 7 7 8、PRO 2 0 2 3 3、PRO 2 1 9 5 6、PRO 5 7 2 9 0、PRO 3 8 4 6 5、PRO 3 8 6 8 3またはPRO 8 5 1 6 1ポリペプチド含有調製物をイムノアフィニティカラムに通し、カラムを、PRO 2 2 6、PRO 2 5 7、PRO 2 6 8、PRO 2 9 0、PRO 3 6 0 0 6、PRO 3 6 3、PRO 3 6 5、PRO 3 8 2、PRO 4 4 4、PRO 7 0 5、PRO 1 0 7 1、PRO 1 1 2 5、PRO 1 1 3 4、PRO 1 1 5 5、PRO 1 2 8 1、PRO 1 3 4 3、PRO 1 3 7 9、PRO 1 3 8 0、PRO 1 3 8 7、PRO 1 4 1 9、PRO 1 4 3 3、PRO 1 4 7 4、PRO 1 5 5 0、PRO 1 5 7 1、PRO 1 5 7 2、PRO 1 7 5 9、PRO 1 9 0 4、PRO 3 5 1 9 3、PRO 4 3 4 1、PRO 4 3 4 8、PRO 4 3 6 9、PRO 4 3 8 1、PRO 4 4 0 7、PRO 4 4 2 5、PRO 4 9 8 5、PRO 4 9 8 9、PRO 5 7 3 7、PRO 5 8 0 0、PRO 5 9 9 3、PRO 6 0 1 7、PRO 7 1 7 4、PRO 9 7 4 4、PRO 9 8 2 1、PRO 9 8 5 2、PRO 9 8 7 3、PRO 1 0 1 9 6、PRO 3 4 7 7 8、PRO 2 0 2 3 3、PRO 2 1 9 5 6、PRO 5 7 2 9 0、PRO 3 8 4 6 5、PRO 3 8 6 8 3またはPRO 8 5 1 6 1ポリペプチドの優先的な吸収を許容する条件下（例えば、デタージェントの存在下の高イオン強度バッファー）で洗浄する。

次いで、カラムを、抗体 / PRO 2 2 6、抗体 / PRO 2 5 7、抗体 / PRO 2 6 8、抗体 / PRO 2 9 0、抗体 / PRO 3 6 0 0 6、抗体 / PRO 3 6 3、抗体 / PRO 3 6 5、抗体 / PRO 3 8 2、抗体 / PRO 4 4 4、抗体 / PRO 7 0 5、抗体 / PRO 1 0 7 1、抗体 / PRO 1 1 2 5、抗体 / PRO 1 1 3 4、抗体 / PRO 1 1 5 5、抗体 / PRO 1 2 8 1、抗体 / PRO 1 3 4 3、抗体 / PRO 1 3 7 9、抗体 / PRO 1 3 8 0、抗体 / PRO 1 3 8 7、抗体 / PRO 1 4 1 9、抗体 / PRO 1 4 3 3、抗体 / PRO 1 4 7 4、抗体 / PRO 1 5 5 0、抗体 / PRO 1 5 7 1、抗体 / PRO 1 5 7 2、抗体 / PRO 1 7 5 9、抗体 / PRO 1 9 0 4、抗体 / PRO 3 5 1 9 3、抗体 / PRO 4 3 4 1、抗体 / PRO 4 3 4 8、抗体 / PRO 4 3 6 9、抗体 / PRO 4 3 8 1、抗体 / PRO 4 4 0 7、抗体 / PRO 4 4 2 5、抗体 / PRO 4 9 8 5、抗体 / PRO 4 9 8 9、抗体 / PRO 5 7 3 7、抗体 / PRO 5 8 0 0、抗体 / PRO 5 9 9 3、抗体 / PRO 6 0 1 7、抗体 / PRO 7 1 7 4、抗体 / PRO 9 7 4 4、抗体 / PRO 9 8 2 1、抗体 / PRO 9 8 5 2、抗体 / PRO 9 8 7 3、抗体 / PRO 1 0 1 9 6、抗体 / PRO 3 4 7 7 8、抗体 / PRO 2 0 2 3 3、抗体 / PRO 2 1 9 5 6、抗体 / PRO 5 7 2 9 0、抗体 / PRO 3 8 4 6 5、抗体 / PRO 3 8 6 8 3または抗体 / PRO 8 5 1 6 1ポリペプチド結合を破壊する（例えば、およそ pH 2 ~ 3 などの pH バッファーまたは高濃度のカオトロピック剤（例えば、尿素もしくはチオシアン酸イオンなど）を許容する）条件下で溶出し、PRO 2 2 6、PRO 2 5 7、PRO 2 6 8、PRO 2 9 0、PRO 3 6 0 0 6、PRO 3 6 3、PRO 3 6 5、PRO 3 8 2、PRO 4 4 4、PRO 7 0 5、PRO 1 0 7 1、PRO 1 1 2 5、PRO 1 1 3 4、PRO 1 1 5 5、PRO 1 2 8 1、PRO 1 3 4 3、PRO 1 3 7 9、PRO 1 3 8 0、PRO 1 3 8 7、PRO 1 4 1 9、PRO 1 4 3 3、PRO 1 4 7 4、PRO 1 5 5 0、PRO 1 5 7 1、PRO 1 5 7 2、PRO 1 7 5 9、PRO 1 9 0 4、PRO 3 5 1 9 3、PRO 4 3 4 1、PRO 4 3 4 8、PRO 4 3 6 9、PRO 4 3 8 1、PRO 4 4 0 7、PRO 4 4 2 5、PRO 4 9 8 5、PRO 4 9 8 9、PRO 5 7 3 7、PRO 5 8 0 0、PRO 5 9 9 3、PRO 6 0 1 7、PRO 7 1 7 4、PRO 9 7 4 4、PRO 9 8 2 1、PRO 9 8 5 2、PRO 9 8 7 3、PRO 1 0 1 9 6、PRO 3 4 7 7 8、PRO 2 0 2 3 3、PRO 2 1 9 5 6、PRO 5 7 2 9 0、PRO 3 8 4 6 5、PRO 3 8 6 8 3またはPRO 8 5 1 6 1ポリペプチド含有調製物をイムノアフィニティカラムに通し、カラムを、PRO 2 2 6、PRO 2 5 7、PRO 2 6 8、PRO 2 9 0、PRO 3 6 0 0 6、PRO 3 6 3、PRO 3 6 5、PRO 3 8 2、PRO 4 4 4、PRO 7 0 5、PRO 1 0 7 1、PRO 1 1 2 5、PRO 1 1 3 4、PRO 1 1 5 5、PRO 1 2 8 1、PRO 1 3 4 3、PRO 1 3 7 9、PRO 1 3 8 0、PRO 1 3 8 7、PRO 1 4 1 9、PRO 1 4 3 3、PRO 1 4 7 4、PRO 1 5 5 0、PRO 1 5 7 1、PRO 1 5 7 2、PRO 1 7 5 9、PRO 1 9 0 4、PRO 3 5 1 9 3、PRO 4 3 4 1、PRO 4 3 4 8、PRO 4 3 6 9、PRO 4 3 8 1、PRO 4 4 0 7、PRO 4 4 2 5、PRO 4 9 8 5、PRO 4 9 8 9、PRO 5 7 3 7、PRO 5 8 0 0、PRO 5 9 9 3、PRO 6 0 1 7、PRO 7 1 7 4、PRO 9 7 4 4、PRO 9 8 2 1、PRO 9 8 5 2、PRO 9 8 7 3、PRO 1 0 1 9 6、PRO 3 4 7 7 8、PRO 2 0 2 3 3、PRO 2 1 9 5 6、PRO 5 7 2 9 0、PRO 3 8 4 6 5、PRO 3 8 6 8 3またはPRO 8 5 1 6 1ポリペプチド含有調製物の優先的な吸収を許容する条件下（例えば、デタージェントの存在下の高イオン強度バッファー）で洗浄する。

10

20

30

40

50

33、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドを収集する。

#### 【1887】

##### 実施例60：薬物スクリーニング

本発明は、さまざまな薬物スクリーニング技術のいずれかにおいて、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチドまたはその結合断片を使用することによる化合物のスクリーニングに特に有用である。かかる試験に用いられるPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチドまたは断片は、溶液中で遊離しているか、固相支持体に付着されているか、細胞表面上に存在<born>するか、または細胞内に存在するかのいずれかであり得る。薬物スクリーニング方法の一例では、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチドまたは断片を発現する組換え核酸で安定的に形質転換される真核生物または原核生物の宿主細胞が利用される。薬物は、競合的結合アッセイで、かかる形質転換細胞に対してスクリーニングする。かかる細胞は、バイアブルな状態または固定された形態のいずれかで、標準的な結合ア

10

20

30

40

50

ッセイに使用できる。

例えば、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチドまたは断片と、試験対象の薬剤との複合体の形成が測定され得る。あるいはまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドと、その標的細胞または試験対象の薬剤によってもたらされる標的受容体との複合体形成の減損を調べることができる。

10

20

#### 【1888】

したがって、本発明は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチド関連疾患または障害に影響を与え得る薬物または任意の他の薬剤のスクリーニング方法を提供する。このような方法は、かかる薬剤をPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチドまたはその断片と接触させること、および(Ⅰ)該

30

40

50

薬剤とPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチドまたは断片との複合体の存在について、または(i i) PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチドまたは断片と細胞との複合体の存在について、当該技術分野でよく知られた方法によってアッセイすることを含む。かかる競合的結合アッセイでは、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチドまたは断片は、典型的には標識される。

適当なインキュベーション後、遊離PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチドまたは断片を、結合形態で存在するものから分離し、遊離または非複合体形成標識の量は、具体的な薬剤がPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO44

4、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチドまたはに結合する能力、またはPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチド/細胞複合体に干渉する能力の目安である。

【1889】

薬物スクリーニングのための別の技術は、ポリペプチドに対して適当な結合親和性を有する化合物のハイスループットスクリーニングを提供するものであり、1984年9月13日に公開されたWO84/03564に詳細に記載されている。簡単に述べると、多数の異なる小ペプチド試験化合物を固相基材上、例えば、プラスチックピンまたはなんらかの他の表面上で合成する。

PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドに適用されると、ペプチド試験化合物は、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドと反応し、洗浄される。

結合PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドは、当該技術分野でよく知られた方法によって検出される。精製PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドはまた、前述の薬物スクリーニング技術における使用のためにプレート上に直接コートしてもよい。また、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、固相支持体上に固定化してもよい。

10

20

30

40

50

**【1890】**

本発明ではまた、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドに結合し得る中和抗体が、試験化合物と、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチドまたはその断片に対する結合に関して特異的に競合する競合的薬物スクリーニングアッセイの使用が想定される。このようにして、該抗体は、PRO

226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドと、1つ以上の抗原決定基を共有するペプチドがあればその存在を検出するために使用され得る。

10

#### 【1891】

##### 実施例61：合理的な薬物設計

合理的な薬物設計の目的は、生物学的に活性な目的のポリペプチド（すなわち、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチド）またはこれらと相互作用する低分子、例えばアゴニスト、アンタゴニストもしくはインヒビターの構造的類縁体を作製することである。これらの例の任意のものが、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチドのより活性または安定な形態の薬物、またはPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチドのインビボの機能を

20

30

40

50



増強するか、もしくは外機能に干渉する薬物を構築するために使用され得る (Hodgson、Bio/Technology、9:19-21(1991)参照)。

【1892】

アプローチの一例において、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチド、またはPRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683もしくはPRO85161ポリペプチド-インヒビター複合体の3次元構造は、x線結晶学、コンピュータモデル設計または、最も典型的にはこの2つのアプローチの組合せによって測定される。PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドは、その分子の構造を解明するため、および活性部位(1つまたは複数)を決定するために、形状および変化の両方を確認しなければならない。頻度は低い、PRO226、PRO257、PRO268、PRO290、PRO36006、PRO363、PRO365、PRO382、PRO444、PRO705、PRO1071、PRO1125、PRO1134、PRO1155、PRO1281、PRO1343、PRO1379、PRO1380、PRO1387、PRO1419、PRO1433、PRO1474、PRO1550、PRO1571、PRO1572、PRO1759、PRO1904、PRO35193、PRO4341、PRO4348、PRO4369、PRO4381、PRO4407、PRO4425、PRO4985、PRO4989、PRO5737、PRO5800、PRO5993、PRO6017、PRO7174、PRO9744、PRO9821、PRO9852、PRO9873、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO8

10

20

30

40

50

5 1 6 1 ポリペプチドの構造に関する有用な情報は、相同タンパク質の構造に基づいたモデル設計により取得され得る。どちらの場合も、関連する構造の情報をを用いて、類縁 PRO 2 2 6、PRO 2 5 7、PRO 2 6 8、PRO 2 9 0、PRO 3 6 0 0 6、PRO 3 6 3、PRO 3 6 5、PRO 3 8 2、PRO 4 4 4、PRO 7 0 5、PRO 1 0 7 1、PRO 1 1 2 5、PRO 1 1 3 4、PRO 1 1 5 5、PRO 1 2 8 1、PRO 1 3 4 3、PRO 1 3 7 9、PRO 1 3 8 0、PRO 1 3 8 7、PRO 1 4 1 9、PRO 1 4 3 3、PRO 1 4 7 4、PRO 1 5 5 0、PRO 1 5 7 1、PRO 1 5 7 2、PRO 1 7 5 9、PRO 1 9 0 4、PRO 3 5 1 9 3、PRO 4 3 4 1、PRO 4 3 4 8、PRO 4 3 6 9、PRO 4 3 8 1、PRO 4 4 0 7、PRO 4 4 2 5、PRO 4 9 8 5、PRO 4 9 8 9、PRO 5 7 3 7、PRO 5 8 0 0、PRO 5 9 9 3、PRO 6 0 1 7、PRO 7 1 7 4、PRO 9 7 4 4、PRO 9 8 2 1、PRO 9 8 5 2、PRO 9 8 7 3、PRO 1 0 1 9 6、PRO 3 4 7 7 8、PRO 2 0 2 3 3、PRO 2 1 9 5 6、PRO 5 7 2 9 0、PRO 3 8 4 6 5、PRO 3 8 6 8 3 または PRO 8 5 1 6 1 ポリペプチド様分子を設計するか、または効率的なインヒビターを同定する。

合理的な薬物設計の有用な例としては、Braxton and Wells, Biochemistry, 31:7796-7801 (1992) に示されたような改善された活性もしくは安定性を有する分子、または Athauda et al. J. Biochem., 113:742-746 (1993) に示されたような天然ペプチドのインヒビター、作用剤もしくはアンタゴニストとして作用する分子が挙げられ得る。

#### 【1893】

また、上記のようにして機能アッセイによって選択された標的特異的抗体を単離し、次いで、その結晶構造を解明することも可能である。このアプローチは、原理的には、その後の薬物設計の基礎となり得るファーマコアをもたらす。タンパク質結晶学は、機能性の薬理学的に活性な抗体に対する抗イデオタイプ抗体 (抗 i d) を作製することにより、全く回避することが可能である。鏡像の鏡像として、抗 i d の結合部位は、元の受容体の類縁体であることが予測され得る。次いで、抗 i d を、化学的または生物学的に作製されたペプチドのバンクからペプチドを同定および単離するために使用できる。次いで、単離されたペプチドは、ファーマコアとしての役目を果たし得る。

#### 【1894】

本発明のおかげで、充分な量の PRO 2 2 6、PRO 2 5 7、PRO 2 6 8、PRO 2 9 0、PRO 3 6 0 0 6、PRO 3 6 3、PRO 3 6 5、PRO 3 8 2、PRO 4 4 4、PRO 7 0 5、PRO 1 0 7 1、PRO 1 1 2 5、PRO 1 1 3 4、PRO 1 1 5 5、PRO 1 2 8 1、PRO 1 3 4 3、PRO 1 3 7 9、PRO 1 3 8 0、PRO 1 3 8 7、PRO 1 4 1 9、PRO 1 4 3 3、PRO 1 4 7 4、PRO 1 5 5 0、PRO 1 5 7 1、PRO 1 5 7 2、PRO 1 7 5 9、PRO 1 9 0 4、PRO 3 5 1 9 3、PRO 4 3 4 1、PRO 4 3 4 8、PRO 4 3 6 9、PRO 4 3 8 1、PRO 4 4 0 7、PRO 4 4 2 5、PRO 4 9 8 5、PRO 4 9 8 9、PRO 5 7 3 7、PRO 5 8 0 0、PRO 5 9 9 3、PRO 6 0 1 7、PRO 7 1 7 4、PRO 9 7 4 4、PRO 9 8 2 1、PRO 9 8 5 2、PRO 9 8 7 3、PRO 1 0 1 9 6、PRO 3 4 7 7 8、PRO 2 0 2 3 3、PRO 2 1 9 5 6、PRO 5 7 2 9 0、PRO 3 8 4 6 5、PRO 3 8 6 8 3 または PRO 8 5 1 6 1 ポリペプチドが、X 線結晶学などの解析試験を行なうために利用可能となり得る。また、本明細書に示した PRO 2 2 6、PRO 2 5 7、PRO 2 6 8、PRO 2 9 0、PRO 3 6 0 0 6、PRO 3 6 3、PRO 3 6 5、PRO 3 8 2、PRO 4 4 4、PRO 7 0 5、PRO 1 0 7 1、PRO 1 1 2 5、PRO 1 1 3 4、PRO 1 1 5 5、PRO 1 2 8 1、PRO 1 3 4 3、PRO 1 3 7 9、PRO 1 3 8 0、PRO 1 3 8 7、PRO 1 4 1 9、PRO 1 4 3 3、PRO 1 4 7 4、PRO 1 5 5 0、PRO 1 5 7 1、PRO 1 5 7 2、PRO 1 7 5 9、PRO 1 9 0 4、PRO 3 5 1 9 3、PRO 4 3 4 1、PRO 4 3 4 8、PRO 4 3 6 9、PRO 4 3 8 1、PRO 4 4 0 7、PRO 4 4 2 5、PRO 4 9 8 5、PRO 4 9 8 9、PRO 5 7 3 7、PRO 5 8 0 0、PRO 5 9 9 3、PRO 6 0 1 7、PRO 7 1 7 4、PRO 9 7 4 4、PRO 9 8 2 1、PRO 9 8 5 2、PRO 9 8 7 3

3、PRO10196、PRO34778、PRO20233、PRO21956、PRO57290、PRO38465、PRO38683またはPRO85161ポリペプチドのアミノ酸配列の知得により、x線結晶学の代替的または付加的なコンピュータモデル設計技術を用いるものに対する手引きを提供する。

【図面の簡単な説明】

【1895】

【図1】図1は、ネイティブ配列PRO226cDNAのヌクレオチド配列（配列番号1）を示し、ここで、配列番号1は、本明細書中で「DNA33460-1166」（UNQ200）と称されるクローンである。

【図2】図2は、図1に示される配列番号1のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図3】図3は、ネイティブ配列PRO257cDNAのヌクレオチド配列（配列番号3）を示し、ここで、配列番号3は、本明細書中で「DNA35841-1173」（UNQ224）と称されるクローンである。

【図4】図4は、図3に示される配列番号3のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号4）を示す。

【図5】図5は、ネイティブ配列PRO268cDNAのヌクレオチド配列（配列番号5）を示し、ここで、配列番号5は、本明細書中で「DNA39427-1179」（UNQ235）と称されるクローンである。

【図6】図6は、図5に示される配列番号5のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号6）を示す。

【図7】図7は、ネイティブ配列PRO290cDNAのヌクレオチド配列（配列番号7）を示し、ここで、配列番号7は、本明細書中で「DNA35680-1212」（UNQ253）と称されるクローンである。

【図8】図8は、図7に示される配列番号7のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号8）を示す。

【図9】図9は、ネイティブ配列PRO36006cDNAのヌクレオチド配列（配列番号9）を示し、ここで、配列番号9は、本明細書中で「DNA225543」（UNQ294）と称されるクローンである。

【図10】図10は、図9に示される配列番号9のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号10）を示す。

【図11】図11は、ネイティブ配列PRO363cDNAのヌクレオチド配列（配列番号11）を示し、ここで、配列番号11は、本明細書中で「DNA45419-1252」（UNQ318）と称されるクローンである。

【図12】図12は、図11に示される配列番号11のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号12）を示す。

【図13】図13は、ネイティブ配列PRO365cDNAのヌクレオチド配列（配列番号13）を示し、ここで、配列番号13は、本明細書中で「DNA46777-1253」（UNQ320）と称されるクローンである。

【図14】図14は、図13に示される配列番号13のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号14）を示す。

【図15】図15は、ネイティブ配列PRO382cDNAのヌクレオチド配列（配列番号15）を示し、ここで、配列番号15は、本明細書中で「DNA45234-1277」（UNQ323）と称されるクローンである。

【図16】図16は、図15に示される配列番号15のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号16）を示す。

【図17】図17は、ネイティブ配列PRO444cDNAのヌクレオチド配列（配列番号17）を示し、ここで、配列番号17は、本明細書中で「DNA26846-1397」（UNQ328）と称されるクローンである。

【図18】図18は、図17に示される配列番号17のコード配列から得られるアミノ酸

10

20

30

40

50

配列（配列番号 18）を示す。

【図 19】図 19 は、ネイティブ配列 PRO705 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 19）を示し、ここで、配列番号 19 は、本明細書中で「DNA50914 - 1289」（UNQ369）と称されるクローンである。

【図 20】図 20 は、図 19 に示される配列番号 19 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 20）を示す。

【図 21】図 21 は、ネイティブ配列 PRO1071 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 21）を示し、ここで、配列番号 21 は、本明細書中で「NA58847 - 1383」（NQ528）と称されるクローンである。

【図 22】図 22 は、図 21 に示される配列番号 21 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 22）を示す。

【図 23】図 23 は、ネイティブ配列 PRO1125 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 23）を示し、ここで、配列番号 23 は、本明細書中で「NA60619 - 1482」（UNQ563）と称されるクローンである。

【図 24】図 24 は、図 23 に示される配列番号 23 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 24）を示す。

【図 25】図 25 は、ネイティブ配列 PRO1134 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 25）を示し、ここで、配列番号 25 は、本明細書中で「DNA56865 - 1491」（UNQ572）と称されるクローンである。

【図 26】図 26 は、図 25 に示される配列番号 25 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 26）を示す。

【図 27】図 27 は、ネイティブ配列 PRO1155 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 27）を示し、ここで、配列番号 27 は、本明細書中で「DNA59849 - 1504」（UNQ585）と称されるクローンである。

【図 28】図 28 は、図 27 に示される配列番号 27 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 28）を示す。

【図 29】図 29 は、ネイティブ配列 PRO1281 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 29）を示し、ここで、配列番号 29 は、本明細書中で「DNA59820 - 1549」（UNQ651）と称されるクローンである。

【図 30】図 30 は、図 29 に示される配列番号 29 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 30）を示す。

【図 31】図 31 は、ネイティブ配列 PRO1343 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 31）を示し、ここで、配列番号 31 は、本明細書中で「DNA66675 - 1587」（UNQ698）と称されるクローンである。

【図 32】図 32 は、図 31 に示される配列番号 31 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 32）を示す。

【図 33】図 33 は、ネイティブ配列 PRO1379 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 33）を示し、ここで、配列番号 33 は、本明細書中で「DNA59828 - 1608」（UNQ716）と称されるクローンである。

【図 34】図 34 は、図 33 に示される配列番号 33 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 34）を示す。

【図 35】図 35 は、ネイティブ配列 PRO1380 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 35）を示し、ここで、配列番号 35 は、本明細書中で「DNA60740 - 1615」（UNQ717）と称されるクローンである。

【図 36】図 36 は、図 35 に示される配列番号 35 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 36）を示す。

【図 37】図 37 は、ネイティブ配列 PRO1387 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 37）を示し、ここで、配列番号 37 は、本明細書中で「DNA68872 - 1620」（UNQ722）と称されるクローンである。

【図 38】図 38 は、図 37 に示される配列番号 37 のコード配列から得られるアミノ酸

10

20

30

40

50

配列（配列番号 38）を示す。

【図 39】図 39 は、ネイティブ配列 PRO 1419 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 39）を示し、ここで、配列番号 39 は、本明細書中で「DNA 71290 - 1630」（UNQ 733）と称されるクローンである。

【図 40】図 40 は、図 39 に示される配列番号 39 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 40）を示す。

【図 41】図 41 は、ネイティブ配列 PRO 1433 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 41）を示し、ここで、配列番号 41 は、本明細書中で「DNA 71184 - 1634」（UNQ 738）と称されるクローンである。

【図 42】図 42 は、図 41 に示される配列番号 41 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 42）を示す。

【図 43】図 43 は、ネイティブ配列 PRO 1474 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 43）を示し、ここで、配列番号 43 は、本明細書中で「DNA 73739 - 1645」（UNQ 745）と称されるクローンである。

【図 44】図 44 は、図 43 に示される配列番号 43 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 44）を示す。

【図 45】図 45 は、ネイティブ配列 PRO 1550 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 45）を示し、ここで、配列番号 45 は、本明細書中で「DNA 76393 - 1664」（UNQ 762）と称されるクローンである。

【図 46】図 46 は、図 45 に示される配列番号 45 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 46）を示す。

【図 47】図 47 は、ネイティブ配列 PRO 1571 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 47）を示し、ここで、配列番号 47 は、本明細書中で「DNA 73730 - 1679」（UNQ 777）と称されるクローンである。

【図 48】図 48 は、図 47 に示される配列番号 47 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 48）を示す。

【図 49】図 49 は、ネイティブ配列 PRO 1572 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 49）を示し、ここで、配列番号 49 は、本明細書中で「DNA 73734 - 1680」（UNQ 778）と称されるクローンである。

【図 50】図 50 は、図 49 に示される配列番号 49 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 50）を示す。

【図 51】図 51 は、ネイティブ配列 PRO 1759 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 51）を示し、ここで、配列番号 51 は、本明細書中で「DNA 76531 - 1701」（UNQ 832）と称されるクローンである。

【図 52】図 52 は、図 51 に示される配列番号 51 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 52）を示す。

【図 53】図 53 は、ネイティブ配列 PRO 1904 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 53）を示し、ここで、配列番号 53 は、本明細書中で「DNA 82372」（UNQ 886）と称されるクローンである。

【図 54】図 54 は、図 53 に示される配列番号 53 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 54）を示す。

【図 55】図 55 は、ネイティブ配列 PRO 35193 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 55）を示し、ここで、配列番号 55 は、本明細書中で「DNA 225681」（UNQ 983）と称されるクローンである。

【図 56】図 56 は、図 55 に示される配列番号 55 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 56）を示す。

【図 57】図 57 は、ネイティブ配列 PRO 4341 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 57）を示し、ここで、配列番号 57 は、本明細書中で「DNA 81761 - 2583」（UNQ 1895）と称されるクローンである。

【図 58】図 58 は、図 57 に示される配列番号 57 のコード配列から得られるアミノ酸

10

20

30

40

50

配列（配列番号 58）を示す。

【図 59】図 59 は、ネイティブ配列 PRO4348 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 59）を示し、ここで、配列番号 59 は、本明細書中で「DNA92232 - 2589」（UNQ1902）と称されるクローンである。

【図 60】図 60 は、図 59 に示される配列番号 59 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 60）を示す。

【図 61】図 61 は、ネイティブ配列 PRO4369 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 61）を示し、ここで、配列番号 61 は、本明細書中で「DNA92289 - 2598」（UNQ1911）と称されるクローンである。

【図 62】図 62 は、図 61 に示される配列番号 61 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 62）を示す。

【図 63】図 63 は、ネイティブ配列 PRO4381 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 63）を示し、ここで、配列番号 63 は、本明細書中で「DNA92225 - 2603」（UNQ1916）と称されるクローンである。

【図 64】図 64 は、図 63 に示される配列番号 63 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 64）を示す。

【図 65】図 65 は、ネイティブ配列 PRO4407 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 65）を示し、ここで、配列番号 65 は、本明細書中で「DNA92264 - 2616」（UNQ1932）と称されるクローンである。

【図 66】図 66 は、図 65 に示される配列番号 65 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 66）を示す。

【図 67】図 67 は、ネイティブ配列 PRO4425 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 67）を示し、ここで、配列番号 67 は、本明細書中で「DNA93011 - 2637」（UNQ1942）と称されるクローンである。

【図 68】図 68 は、図 67 に示される配列番号 67 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 68）を示す。

【図 69】図 69 は、ネイティブ配列 PRO4985 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 69）を示し、ここで、配列番号 69 は、本明細書中で「DNA59770 - 2652」（UNQ2426）と称されるクローンである。

【図 70】図 70 は、図 69 に示される配列番号 69 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 70）を示す。

【図 71】図 71 は、ネイティブ配列 PRO4989 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 71）を示し、ここで、配列番号 71 は、本明細書中で「DNA80135 - 2655」（UNQ2429）と称されるクローンである。

【図 72】図 72 は、図 71 に示される配列番号 71 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 72）を示す。

【図 73】図 73 は、ネイティブ配列 PRO5737 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 73）を示し、ここで、配列番号 73 は、本明細書中で「DNA92929 - 2534 - 1」（UNQ2456）と称されるクローンである。

【図 74】図 74 は、図 73 に示される配列番号 73 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 74）を示す。

【図 75】図 75 は、ネイティブ配列 PRO5800 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 75）を示し、ここで、配列番号 75 は、本明細書中で「DNA108912 - 2680」（UNQ2500）と称されるクローンである。

【図 76】図 76 は、図 75 に示される配列番号 75 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 76）を示す。

【図 77】図 77 は、ネイティブ配列 PRO5993 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 77）を示し、ここで、配列番号 77 は、本明細書中で「DNA100276 - 2684」（UNQ2504）と称されるクローンである。

【図 78】図 78 は、図 77 に示される配列番号 77 のコード配列から得られるアミノ酸

10

20

30

40

50

配列（配列番号 78）を示す。

【図 79】図 79 は、ネイティブ配列 PRO 6017 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 79）を示し、ここで、配列番号 79 は、本明細書中で「DNA 96860 - 2700」（UNQ 2524）と称されるクローンである。

【図 80】図 80 は、図 79 に示される配列番号 79 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 80）を示す。

【図 81】図 81 は、ネイティブ配列 PRO 7174 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 81）を示し、ここで、配列番号 81 は、本明細書中で「DNA 96883 - 2745」（UNQ 2784）と称されるクローンである。

【図 82】図 82 は、図 81 に示される配列番号 81 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 82）を示す。

【図 83】図 83 は、ネイティブ配列 PRO 9744 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 83）を示し、ここで、配列番号 83 は、本明細書中で「DNA 136110 - 2763」（UNQ 3003）と称されるクローンである。

【図 84】図 84 は、図 83 に示される配列番号 83 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 84）を示す。

【図 85】図 85 は、ネイティブ配列 PRO 9821 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 85）を示し、ここで、配列番号 85 は、本明細書中で「DNA 108725 - 2766」（UNQ 3023）と称されるクローンである。

【図 86】図 86 は、図 85 に示される配列番号 85 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 86）を示す。

【図 87】図 87 は、ネイティブ配列 PRO 9852 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 87）を示し、ここで、配列番号 87 は、本明細書中で「DNA 129332 - 2775」（UNQ 3037）と称されるクローンである。

【図 88】図 88 は、図 87 に示される配列番号 87 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 88）を示す。

【図 89】図 89 は、ネイティブ配列 PRO 9873 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 89）を示し、ここで、配列番号 89 は、本明細書中で「DNA 143076 - 2787」（UNQ 3054）と称されるクローンである。

【図 90】図 90 は、図 89 に示される配列番号 89 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 90）を示す。

【図 91】図 91 は、ネイティブ配列 PRO 10196 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 91）を示し、ここで、配列番号 91 は、本明細書中で「DNA 144841 - 2816」（UNQ 3115）と称されるクローンである。

【図 92】図 92 は、図 91 に示される配列番号 91 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 92）を示す。

【図 93】図 93 は、ネイティブ配列 PRO 34778 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 93）を示し、ここで、配列番号 93 は、本明細書中で「DNA 220432」（UNQ 3966）と称されるクローンである。

【図 94】図 94 は、図 93 に示される配列番号 93 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 94）を示す。

【図 95】図 95 は、ネイティブ配列 PRO 20233 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 95）を示し、ここで、配列番号 95 は、本明細書中で「DNA 165608」（UNQ 6208）と称されるクローンである。

【図 96】図 96 は、図 95 に示される配列番号 95 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 96）を示す。

【図 97】図 97 は、ネイティブ配列 PRO 21956 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 97）を示し、ここで、配列番号 97 は、本明細書中で「DNA 178511 - 2986」（UNQ 6973）と称されるクローンである。

【図 98】図 98 は、図 97 に示される配列番号 97 のコード配列から得られるアミノ酸

10

20

30

40

50

配列（配列番号 98）を示す。

【図 99】図 99 は、ネイティブ配列 PRO57290 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 99）を示し、ここで、配列番号 99 は、本明細書中で「DNA 269238」（UNQ8782）と称されるクローンである。

【図 100】図 100 は、図 99 に示される配列番号 99 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 100）を示す。

【図 101】図 101 は、ネイティブ配列 PRO38465 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 101）を示し、ここで、配列番号 101 は、本明細書中で「DNA 228002」（UNQ9128）と称されるクローンである。

【図 102】図 102 は、図 101 に示される配列番号 101 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 102）を示す。

【図 103】図 103 は、ネイティブ配列 PRO38683 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 103）を示し、ここで、配列番号 103 は、本明細書中で「DNA 228199」（UNQ9638）と称されるクローンである。

【図 104】図 104 は、図 103 に示される配列番号 103 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 104）を示す。

【図 105】図 105 は、ネイティブ配列 PRO85161 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 105）を示し、ここで、配列番号 105 は、本明細書中で「DNA 329632」（UNQ16168）と称されるクローンである。

【図 106】図 106 は、図 105 に示される配列番号 105 のコード配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 106）を示す。

【図 1】

FIGURE 1

```
CCCAAGCAGCCGAGCCGACAGCCGCGGCGGGGTGTGCGGGGCCCAACCCAGGAGTGTCCCTCCCTGCG  
CCTCCTGCTACCGGGGTCTCTACTGCTCTGGGCGTGTCTACTGTGTCTTGGGATCAGCTTCTCTCAGGAT  
TCTGAAGAGCCGACAGCTACAGGAACTGACAGATGCTATGATGGGACCCAGACAGCCAGCTGCGGGGA  
TGTCAAGAGTGTCTGACCACTCCCTGAGGCTGCAAGGGGAAATGAAGTGCATCAACCACTACGGGGGCTACT  
TGTGCTGCTCCCGCTCCGCTGCTGCTCATCAACCACTAATGCGAGGGGACCCCGCCACAGTGCCTCCGCT  
CAACACCCCAACCCCTGCCACAGGCTATGAGCCGACAGATCAGGACAGCTGTGTGATGTGAGCAGTGTGC  
CCAGCCCTGCAAGCTGTGCGCCGACAGGACTGCACTAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
ATGCTTACCGCAGATGCGGGCCGAGTGTGTGACATAGACGAGTGCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
GTGAACCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
TGATGTGAACAGTGTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
GCTGCCACAGGCTATGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
TACCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
GGCCACAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
TCACTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
CGCTGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
CACCTGAGAGCGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
CTTTTCAGATCCGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
GTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
GAGCTACCGGGCGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
GCCACCTCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
AAGAAAGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
GGGCGAGGCCAAGTTCACCTAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
AGCTGTGACACAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
CAGAGATTTGAGCTTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
TCCATTCCTAATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
ACGAGGCCAAGTGGAAAAA
```

【図 2】

FIGURE 2

```
MLPCASCLPGSLLLWALLLLLLLGSASPQDSSEPDSTECTDGYEWDPDSQHCARDVNECLTI  
PEACKGEMKINHYGGYLCPLPSAAVINDLHGEGPPPPVPPAHPNCPPPGYEPDDQDSCV  
DVDECAQALHDCRPSQDCHNLPGSYQCTCPDGYRKIGPECVDIDECRYRYCQHRVCNLPGS  
FRQCCEPQQLGPNRSCVDVNECDMGAPCEQRCFNSYGTFLCRCHQGYELHRDGFSCSDI  
DECSYSSYLQYRCVNEPGRFSCHPQGYQLLATRLCQDIDECEGHAQCSEAQTVCNPHG  
GYRCVDINRCVBEPIQVSENRLCPASNPLCREQPSSIVHYRMTITERSVPADVFIQAT  
SVYPGAYNAFQIRAGNSQGDFFYIRQINNVSAMLVLARPVTPGREYVLDLEMTNLSMSYR  
ASSVLRLTVFVGAYTF
```

シグナル配列：	アミノ酸	1-25
N-グリコシル化部位：	アミノ酸	198-202; 394-398
N-ミリスチル化部位：	アミノ酸	76-82; 145-151; 182-188; 222-228; 290-296; 305-311; 371-377; 381-387
アスパラギン酸およびアスパラギンヒドロキシル化部位：		140-152; 177-189; 217-229; 258-270



[illegible]

アミノ酸 25-29

[illegible][illegible]

## 【 図 1 2 】

FIGURE 12

```
></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA45419
><subunit 1 of 1, 373 aa, 1 stop
><MW: 41281, pI: 8.33, NX(S/T): 3
MSLLLLLLLSVYVGTGTHTEIKRVAEBKVLTPCHHQLGLPEKDTLDIEWLLTDNEGNQK
VVITYSRRHVYNNLTTEEKGRVAFASNFLAGDASLQIEPLKPSDEGRYTCVKVNSGRYVWS
HVLTKVLVRFPSPKCELEBELTGBSDLTQCBSSSSTGTEPIVYVYQVIREKREGEDERLPPKS
RIDYNHPRVLLQNLMTSYSLVQCTAGNBAGKESCVVRVTQYVQSIGMVAGAVTGIVAG
ALLIFLLVWLLIRKDKERYEERPEIREDAEPKARLVKPPSSSSSGRSSSSSSSTR
STANSASRSQRILTSTDAAPQPLATQAYSILVSGPEVRGSEPKVHHANLTKEATTPSMIPSQ
SRAFQTV

シグナル配列：
アミノ酸 1-16

膜貫通ドメイン：
アミノ酸 232-251
```

## 【 図 1 3 】

FIGURE 13

```
GCGGCACCTGGAAATGCGCCATTGGCTGGTGGCCGTCTCAAGGTGGTGTTCGTGGTCTT
CGCCTCCTTGTGTGCTGTATTCGGGGTACCTGCTCGCAGAGCTCATTCCAGATGCACCC
CTGTCCAGTCTGCTCCTATAGCATCCGAGCATCGGGGAGAGGCTGTCTCAAGCTCCAG
TCCCCTAAAGGCAAAATGTGACCATCGACATCCCTGCTCCATCTGACACCTATGCTACAG
GTTACTCAGCGAGGTGCGAGAGCACTGACCCCAAATCTGCTTTGAGATACCACTTCT
ATGGGAGAACAGCTGGGAAATGTTGCGAGAGGAATAAACAATTGCTCACTATGTAA
CTGGGAATGTGACAGCAACAGATGTTTTGATATGTATGAAGGCGATACTCTGGACCGAT
GACAAAGTTTATTAGAGTGTCTGCTCCAAATCCCTGCTCTCATGGTGACCTATGACGAC
GGAAGCACAGACTGAATAACGATGCCAAGAATGCCATGAAGACACTTGGAAAGTAAGAAA
TCAGGAACATGAATTCAGTCTAGCTGGTATTTATTTGACGACAAAGGCTTGGAACTCCC
TTCCGAATTCGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TGGCTCGCAGAGATCCAGATAGAGGCTGCATACCCAAAGAACGAAGC TGAACCTCGAGG
TCTGATGAATATGTTGTTCTGATATAAACAATGACGCTGGAATGCTCAAGAACTTTATTTT
TCTAAATCCAAAGCCCATATTTGATAGTATTTTGGGTTTGTGTAACCAATGAACATT
TGCTAGTTGATCAAACTCTGTGACGAGATTTTATACCACTATTTTATGTAGTGAAGA
TGTCAATTAGTGAACAACTAAATGATGGAATTTCTTAAAAA
```

## 【 図 1 5 】

FIGURE 15

```
ATGGGAAGCCGATAAAGTGGGCTATCATCTCTTCGGTGGTGCATCTACATTTTGGG
ACTCGGAATTAAGGTAGAGGTGAGGCGGAGCCGGATGTGACAGGTCTCGAAATAGTC
ACCTAGGCGGAAATGATCCGCTGTGTTGAAGCCGCTCTCATCTCGATGCTCTTTTG
GCTTTGATGATTTGAAATAGTCTCTGTTCACAGATGCGATGCTGTTGCTGACAGAT
CCTGTGACTGCTGCCATTTGAATTTTTCACATCATCGCTCATTTGGATCATTTGATGATA
TTAGACTGGCCATTGGTCTGGGCACTCCATCTGACTGCTCAGGGAAGTACAGATGTCGCT
CATCTTTAAGTGTATCGAGCTGATAGCTCGATGTGACGAGTCTCGGATTCGAAAGCGG
GGAAGACGAGTACCGCTGTGTGCGGGTGGTGGTGCAGAAATGCGGTGCTCAGGTGTTCA
GCTGCTTCTGGAAGACCATGTGCTCGGATGACTGGAAGGGTCACTAAGCAATGTTGCT
GTGCGCACTGGGTTTCCAAAGCTATGAGTTCAGATAACCTCAGAGTGTGCTGTGGA
GGGCGAGTTCCGGAGAGGTTGTGTGCTATGATGATCTCTTTCAGAGTACAGAGTGA
GCTTACACCACTCATGATATATGAGGAGGAGGATGTGCTCTTCCGACGCTGTTACCTTGC
AGTGACAGCGCTGTGCTCATGAAGGGGCTACAGCTCACGCACTGCTGGGTGGAACATGTC
CTTGCTCTGCGAGTGGCCCTGACAGGCGAGCTTCACTGCTCAGGCTACCACTGTGCGGG
GGCTCTGTGATCAGCGCCCTGTGGATCATCATCTGCTGACACTGTGTTATGACTTGTACC
TCCCAGATCATGAGCACTCCAGGTGGTGTGATTTTCCCTGTGTGCAATCCAGCCCATC
CATCTGCTGGAGAGGATTTGTTACACAGACAGTACAGAGCCAGAGGCTGGCAATGAC
ATCCCTCTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCCCAACTCTGAAGAGAACTTCCCGATGGAAGATGTGTGACACTCGCTTGTGATGAG
CACAGAGGATGAGGAGTGAAGCCCTCCCTGTGCTGGAACACAGCGGCGCTCCCTTTGATTCC
AACAAGATCTGCAACACAGGGACGTGTGACGTTGATCATCTCTCCCTCCATGCTCTGCG
CGGGCTACCTGACGGGTGGCGTGGACAGTCCAGGGGAGCAGCGGGGGGCGCTGTGTG
TCAAGAGAGGAGGCTGTGGAAGTTAGTGGAGCGACAGCAGCTTGGCATCGGCTGCGCAGAG
GTGAACAAGGCTGAGGTTGACAGCCCTGTGACCTCTCTGACTGGATCCAGAGCAGAG
TGAAGAGACCTGATGAAGCTGAAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
GATGAAGACAGCCGATCTCTCTGAGCTCCCTGTGATGAGAACCTGACAGAGCAGAGC
CCTTGGAGCTCTGAGTTCCGGACACAGTAGCAGGCGGAAAGAGGACCTTCCATCTGAT
TCCAGCAACACTTCAAGCTGCTTTTGTGTTTTTGTGTTTTTGTGAGGTGAGTCTCGCTCTG
TTGCGCAGGCTGAGGTGCACTGGCGAATCCCTGCTCACTGACGCTCGCTTCCCTGTT
TAGCGGATCTCTGCTCAGCTTCCCGAGTAGTGGGACACAGGTGCGCGCCACACAC
CCAACTAATTTTGTATTTTGTAGTAGAGCAGGTTTCAACCATGTTGGCAGGCTGCTCTC
AAACCTGACCTCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TGCGGACACAGGCTGAGCTGAGCTTCTGATCTTCTGATCTTCACTAAGACAAAGAGCAG
AACTGCAAGGGCGGCTTCCCACTGCTCATCTGTTTCTTCCAGGCTCTGCAAAA
TTCTGACAGAGTAAAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
AAGACGACACGCGCAGAGTGCAGAGCTCAGTCACTGACGTTTTCATCTTAGGGACC
AGAACCAAAACCCCTTCTACTTCCAGACTATTTTTCATGTTGGGAGGTAACTCTA
GGAATGACTCGTTTAAAGGCTATTTTATGATTTCTTGTAGCATTTGGTGTGACGAT
TATGTGCTTGTGATTCAAATATATGTTTCTCTCCCTCATTGTGTGCGGTGCTGCGTGG
ACTGGTGAAGTGAATCAAAATCATCCACTGAAA
```

## 【 図 1 6 】

FIGURE 16

```
></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA45234
><subunit 1 of 1, 453 aa, 1 stop
><MW: 49334, pI: 6.32, NX(S/T): 1
MGNDPFAVEAPFSFRSLFGLDDLKISVPADADAVAAQILSLPLKFFPIIVIGIILALILALIGLHFDCS
GKYRCSSFKCIELIARCDVSDCKDEDRYRCVRVGGQNAVLOVPTAASNKTMCSDDWKGHYANVACAGLQFP
SYVSDNLNRVSSLGQCFEBFVSDILLDDPKDYALHHSVYVRBGASGHVYTLQCTACGHRGYSRIVGNM
SLLSQWPAQILGQGVHLLGQVHLLDYLPSKTTQVGLLNDNPAHSLSHVKIVHSKI
KPKRLGNDIALMKLAGPLTFNEMIQPVCLPNSSEFPDGVKWTSGWATGDDGASPVLHAAVPLISNKLIN
HRDVGGIISFPMLCAGYLTGGVDSQDGGGLVCGERRLKLVGATSGPGLCAEVNKPQVYTRVTSFLDWIH
BQMERDLKT

シグナルペプチド：
アミノ酸 1-20

膜貫通ドメイン：
アミノ酸 240-284
```

## 【 図 1 4 】

FIGURE 14

```
></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA46777
><subunit 1 of 1, 235 aa, 1 stop
><MW: 25982, pI: 9.09, NX(S/T): 2
MRPLAGLLKVVVFVVFASLCAWYSGYLLAELIPDAPLSSAAYSIRSIGERPVLKAPVVKRQ
KCDHWTEPCPSDITYAYVRLSSGGGRSKYAKICFEDNLMGEQLGNVARGINIAIVNVYTGNTV
ATRCFDMYEGDNGSPMTKFIQGAAPKSLFLMVTYDDGSTRLNDKNAIEALGSKBIRNMK
FRSSWVFIAAKGLELPSHIREKINHSDAKNNRYSGWPAIRIQEGCIPKERS

シグナル配列
アミノ酸 1-20

N-グリコシル化部位
アミノ酸 120-124, 208-212

グリコサミノグリカン結合部位
アミノ酸 80-84

N-ミリスチル化部位
アミノ酸 81-87, 108-114, 119-125
```

## 【 図 1 7 】

FIGURE 17

```
CCCCGCGCTCCGCGCGCGCTGGCTGCCATCTTTGCGGTCTCTCTCGGACCTGTACAA
AGAGTCCGCGCGCGCGCGCGCTCCCTCCCTCCGCTGCGGCGCGGAGGTAGAGAAAGTCA
GTCCACAGCCCGCGCGCTGCTGCTGCTGAGCGCTGGGACGCGGAAACGCGAGGCTGAG
GTTTGGGACCTCTGTAGGGGAGGGAACAGCCGCTCGAGCTCGGGCGGGCGGACCGGAC
TGGGGCGGGGTAGGCTCTGGAAGGGCCCGGGGAGGAGGTGCGTGTGTGAGAACCTGAG
AAACAGCCGAGAGGTTTTCACCGAGGCGCGCTTGAAGGATCTGAAGAGTTCCTAGAA
GAGGTTTTCCTCTTTCCGGGGTCTCTACAGAGAGGTTTCTTGGGGTCCGCTTCTGA
GAGGCTGCGGCTTACAGAGGCGCCAGAACTGCGATTGAGTGTCCAGAAATCCCTGTAGTTGA
TAATGTTGGGAATGAGCTCTGCAACTTTCTTTGGCATTCAGTTTGAAGAACTAAGGAT
GCAAAATCTCTCACTCAGGTTATGAAGACGTTGAGAACTGAGAACTAAGTAAATG
ATCGTCTTTGGTTGGGCGCTGTTCTTAGCGAGCAGAAAGCTTGGCGAGGCTCTGTGTTGA
CTCTCGAAGAGCACATAGCCCATCTCTTAGGAGCTGAGGTTGCCCTACTACCATGSGTAA
TTCTGTGATCTGCGAGATGACAGTGGAAAGATGACAGTGTGTGACCCCAACAGCAACAG
GCCAGAAACAGTCACTACCTCTGCTGACACAGAGGCGCAACCCAGGGAACCTGTTCGGC
CACCAAGAGGGGCGCGAGGACCTCATGAGCCAGGAGAAAGAAACAAATGTGATGGGCT
AGTGTGGACACACTGCGAGTAAATACGAGCTCTGTAGTAGAGTAACTATCTGACTCAGG
TCACCTCAGTGGAGAAAGATGTTCTGCGCGAGACAGTACTTAGAGACTCTTCACTT
CTTTAGAGCATCTCGCCAGCCCTTGTGCTCAAGGCGCAAGAGAAATTTTAACTGCT
CGCTGATGGCAGATTAATGATAGATTTGATGTTTTTGTCTGTCTGTCACTACTTGTGCT
GGAAATGTCTAAATGTTTCTGTAGCAAAAACAGATAAAGCTATGATCTTTATAGAG
```

## 【 図 1 8 】

FIGURE 18

```
</usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA26846
<subunit 1 of 1, 117 aa, 1 stop
<MW: 12692, pI: 7.50, NX(S/T): 0
MIVFGWAVFLASRLGQGLLLTLREHIAHFLGTGGAATTMGNSICIRDDSGTDDSVDTQQQ
Q
AENSAPVTADTRSGPRDPVRPRRGPHERP RRKKQNVGDLVLDLAVIRTLVDK
```

重要な特徴:

シグナルペプチド:

アミノ酸 1-16

N-ミリスチル化部位

アミノ酸 18-24, 32-38, 34-40, 35-41, 51-57

[illegible]

TGGGATTATTCTGTGCAAGATCGTTTTCCTAGSTGGTGGAGAGTCGCTCATCGCG  
 CGATGTTGGGGCTTTCTCGCAACACGCTCCCTCTGCGACCTCTGTGATGAAGGTTTAA  
 AACATAATTTATATACGACGAAGAAAAGATGCTGCTCCGTAAGTAAACATCATCATCT  
 TGATCTGGCTGGCTTGGCTCTCTCTCTACGTGGTTCACACATCTCTCGAGCTGAGCAG  
 CTGTTTGAAGAAATGAGGTTACAGATTGAGGAATTTAGGGCGCTCAACCTATAGACTGTT  
 CCAATCTGCTCGCATAGATGATGGAGACAGAGAGAGATCTCTGGTGTGATCATGCTG  
 CATCTGGAAGCAGGCTGGGGGGGCCATCTGCACTATAAACAGCATCTGACGACAAACCT  
 CTGCTGTGATGTTTACATGTTGTACTCTTCAGATGACGACGACGACCTCGCGTCTGG  
 CAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG  
 TGTGAAGAAAGAAATGAAGGAGATCTGACAGGCGGAAAGATCCATGAACTCTTAACT  
 AAGGTTCTACTTGCCAACTTGCTGTCTCCAGCGGAAAGAGGCGCATACCTTGATGATG  
 GTAAATTGTCGACGGTGATATCTTGCCCTCTTACAATACAGCATCTGTCAGCGACGACATCGAC  
 CTGCATTTTCAGAGATGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG  
 CAGTATCAAGCATCATGTGTCATCTGACATATAAAAGAGAAAGATTCGTAAGTCTCTCATG  
 AAAGCAGCACTGTGCTCATTTAATCTCGGAGTGTTTTGTGTGAAACCTGCGAAGATGGAAC  
 GAGCAAGATATATCAACCACTCGGAAAATGTGATGAACATCATGTTTGAAGAGGGAGCATCT  
 GATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT  
 CACTCCACATCGATGCTATGTGAAATGCTCCGCACTCTGGTCCAGTGTGCGAAAGCAT  
 ATTAACCTCAGTTTGTAAAGGCTCGCAAGTATCTCCATGATGGAACCTTTGAAGCCATCT  
 GGGACAGGCTGCTCTTATATCATGATTTTGGGAAAATTTGGTATTTCCAGACCCACAGCGC  
 AAAATCAACTATATCCGAGATATACACGAGATCTCAAAATCAATGTCGAAACAGAAATTTGAA  
 CTGTAAAGACGAATTTCTCAGGAAGTCTCGGAAGATGATCATGATGGGAAGTACACAGTTG  
 TAGGCTCTATGATGCTCTATCGTGGACAGGCATGAAAAGATGTGCACTGATGTGAAGATG  
 AACAACTGCCCTCTCGAGCTCAGCTTCGACGACGAGCATAGACATTAATATTTCTCTCC  
 GATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT  
 GCTGATCTCAGCTGCTGTGACAGTATTAACAAAGTCAATGATGATGATGATGATGATGATGAT  
 TTGGGCTCTGCTGGAATTAACATTCATCTTCTC

[illegible]



膜貫通ドメイン:  
アミノ酸 41-55, 75-94, 127-143, 191-213, 249-270, 278-299, 314-330,  
343-359, 379-394, 410-430



シグナルペプチド:  
アミノ酸 1-29

N-グリコシル化部位  
アミノ酸 203-207

N-ミリスチル化部位  
アミノ酸 78-84, 80-86, 91-97, 201-207



## 【 図 6 1 】

FIGURE 61

GGCGTGTGCAAGCCGCGGTCGCGCCCGCGCAGCTCGGGTAAGCGCTCTAGGGCGCTGCGC  
GGCGCAGCGAAATGCGCGCTTCCAGGTGGGCGCGCAAGCCGCTGGTCTCTGCTTTGTGCCT  
CTGACCTCTGCTGCTGCTCTTACTGCTCAACCGCGCTGGGCTCTGCGCGCGCAAGGCTC  
GCCCGGAGCGCCGACGAGTCTTACCCACCTCCCGGAAGAGAGAGGATATTGCGGAT  
TACAATGATGACAGATGCGCGCTCTTCTGGAGCAATGGGAGAGATGATGACATTGAG  
AAGGAGATCTTCCAGAGCACAGAGACCTTTCAGACCTGTGCACTTCTCAAAGATAGACCC  
AAGCAAGCTGAAAGCATTTGAAATGAAGAAAAAGGGAAGACTCTCATGATGTTTGTCT  
ACTGTATCAGGAAGCCCTTATGAGAGAGAGACAGAGAAATTAAGAGCTCTGCGAGGCA  
GCGCTTTCAATGCCAATATTAAGCTCAGAGGTTTCAATTTGGGATCAGACCGTCTATCTT  
CATGCTTCCGATGGAGCTACGCTGGGAGATCAAGGACTTTTGTGCTCGGTCAAGACAGG  
TGTGCTGATGTAACCTGTGGAGGCGAGGTGTACCCCGCAAGAGGAGGAGCAAGAGAG  
AAAAATAAAACAAAGCAAGCAAGGGCAAAAAAGAGAGAGAGATCTGAAATCTCGGTCT  
TTCCAAGGAAGAAAAATCGAGCTGGGAATAAAAAGAGAGACCTGTGATGGGCGAGCAGTGAC  
GCGCTGTGGGGGAGCAGGTGGAAGCTGGAGAGCTTTTGCCAGCTCCTGGGGTGGGAGTGG  
TCTCAGGCAACTGCAACCGGATGACATTTAGTGTCTTAGAAAGGGTCTGCCACATGA  
CCAGTTTGTGGTCAAGAGATTAATCTTAAATAGGCTCTCAAGTAAGAGACAGATTTTTCT  
AATTAATACAGGACCTGACAAATTCATGTTTACTATAAATCTCTTACATGGAAATGTC  
ACTGTGTTGCTTTTCCCACTTACCTTGGTGGTCAATCAACTCTATGAGATTCCACTCC  
CTCCAAAGACCTGCTGTGATTTGGGTGGCGTCTCTGATCAGATAGCAAAATCTGATCAGA  
GAAGACTTTAAAACTCTTGAATTAATGATGAACTCTTCAATGCAATATACATATTTTCA  
TTATGTTAAAGTAAATATGCTTTTGAATCAGATGTCTGTAGCAGGAAGCCAGGGGTG  
TGTAAATCCAAATCTATGSCAGGAATTCGAGAGATAGAAAAATATGTCATTTGAAATCCTA  
AGTAGTTTGAATTTCTTGAATTTGAATTTTCACTCATAGTAAGAGACTCTGTGTTCTG  
TCAGGTTTATGTGTTCTGTAAAGTTTAGGGTTCTGCTTTGTTCTTATTTAGGAAGAG  
TACTGCTGTGTGAGGGGTTATATGTTTCCATTTAATGTGACAGTTTAAAGGATTTTAAGT  
AGGGAATCAGAGTCTTTGAGAGGTGTCAGACGACTCAATAACCTCATTTGTTCTTAA  
CATTTTCTTTGATAAAGTCTGTAATCTGTGCTTTGTGATAGTAAGATGATGTGCTAC  
TGTGTGATGTGATTTTCCGCTCATGTAGAGCTCATGTGATTAAGAGTTAGAAATTT  
ATATACAGATGTCAATTTAGAACTAAAATTTCTTTGGGAAAAACCTTCAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAA

## 【 図 6 2 】

FIGURE 62

```
></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseq.min/ss.DNA92289
><subunit 1 of 1, 234 aa, 1 stop
><MW: 26077, pI: 8.13, WX(S/T): 1
MAASRWARKAVVLLCASDLLLLLLPPPGSCAABGSPGTPDESTPPPRKKKIDRYND
ADMARLLBQWKDDIDEGDLPEHKRPSAPVDFSKIDPSKPSILKMTKTKIMPFVTV
SGSPTEKETESIITLWQSLFNANYDVQRFTVGSRAIPHLRDGSIYAMEIKDFLVGDRIC
ADVTLEQVYFGKGGSSKEKNTKQDKGKKKBGLKSRSSKEKNRAGHERBLL
```

タンパク質の重要な特徴:

シグナルペプチド:

アミノ酸 1-32

N-グリコシル化部位

アミノ酸 201-205

cAMPおよびcGMP依存性タンパクキナーゼリン酸化部位

アミノ酸 85-89

チロシンキナーゼリン酸化部位

アミノ酸 50-59

N-ミリスチル化部位

アミノ酸 30-36;138-144;153-159;176-182

アミド化部位

アミノ酸 207-211

## 【 図 6 3 】

FIGURE 63

ACGTCACTGTCTTGAAGCAGCAGTAGCTGGGAAGTGAGGCGAGGAGGATTTGAGAGGCAGG  
AAGGGNGCTGGAGACACAGCTGAGCCTGGAAATGAGAGTGGGCATCGCGGTGTCATCATG  
ACTCCTCTGCGCGGTGTTCACTGTTGTTGAGGCTCTTATTGACGGGTCTC  
TCTGATGGCTGACCTTGGGTGCGGAGCCCTGCTGGCTCTGAGCCTATCTACCAACCAC  
CTTGAGCTGGGTGCGAGCTGGGGGCTGGTGGGCTGGCGCTGCTGGGAGCCCTGCTCAC  
ACTTGGGTGGGCTGAGCTGACCTGAGCTGGGTCTGGGTCTGAGTGGCTT  
GTGGCTGTGTTGACTACTCTCTGAGGGGCTGCGACTGGGAGGTTTGGTGGGCAAGCC  
TGACAGACACTTCCAGCCTTGCCCTTCTCTGCTGATAGTGGGTCTTACTGGGATCTG  
GCCAGCCTTGGGGGCCCTTGGAGCCCTGGCCAGTGGAGCTGTGCTGAGGAACATGGA  
GGCCACGCTTAATGGGTCTGTCTCGTTTCCCAAGTGCATTAAGGAAGACATATCCCTCCC  
CTGGGCGAGCGAGCTACATGGGAGGAGGAGAACATGGGAGCATGTGAATAAATGGCA  
TTAAATCTGAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

## 【 図 6 4 】

FIGURE 64

MLVHCVGLLLTGLLLGLTGLGALLASBFTYQPPSAWVFAAGLVGLALLGALLTLRNPPTVLGTTLLGSAVL  
VACVYFLBGLALGSWLQRLTLPALPSLC

シグナルペプチド:

アミノ酸 1-20

膜貫通ドメイン:

アミノ酸 38-55, 60-78

N-ミリスチル化部位

アミノ酸 7-13, 12-18, 16-22, 22-28, 41-47, 50-56, 84-90, 88-94

原核生物膜リポタンパク質脂質結合部位

アミノ酸 67-78

## 【 図 6 5 】

FIGURE 65

ATGAAAGTGATAATCAGGCAAGCCAAATGATTGTTAAATAGGATCAATGAGATCGTGAT  
GTGGGTCCAATCAATTGATTCTACACAAAGGAGCTTGGGAGGGGCCATGGTCCAATGCA  
CTTACTGGGAGACTGGAGAACCGCTCTCTCTCTGCTGCTGCGCTCTCTCTCTACTGGGG  
CTGGCTTTGCTGGCATAAAGCGGACATCACTCCCGTGGCTTATTTCTCTCAATTGG  
GTGGCTTCTCTTGTGTGCTATCTCTGGTCCGGTTTCTGGAATGGGGCTCTGGTCCA  
GCTCCAATCAATGTCAGACTGAGAGCCCAAGGCGCTCAGGCAATGCAAGGCAATGAAGCC  
TTTGAAGTGCAGTCTATGAGAGGCGGTGTGGGACTGAATCCAGTGGCGGCCCAAG  
AGTTGGACCAACCCCGCTCAGGCACTGTGTGATACCCCGAGCACTGAGGAGGAACA  
ACCTAGCCATCCAGAGGGGTCCAGAGAGGCAAACTGGAACAGAGGCGAATGGCTCAGAG  
GGGTCCATGGCCAGGAAGGAGCCCTGGAAGAGCTGCAATCAACTCTGGCTTCGGGGAC  
CAGGGCTGTGCTCACTGCTCTGATCTGAGAGAGCTTGGCGGAGTCCCCACATTAAGAGCC  
TCTGATCCACCCCGCTATPAGTGTCTGTTGATGACCTGATGATAGTGTGTTTT  
TATGAGGCAACTGGGCAACCCCTTAAATGACTCTCCCAAGATTCTCTCTCTCCAGCC  
AGACCTCGTTCATTGATCAACATTTTCCAGCGCTCATATGTGTGTCAGAAACAAGTGTTC  
TGCTTGGACATCATAAATGGGACTTTGGACCTGAGGAGGTGAGGCCACGGTAAGCCCTT  
CCGAGCTGAGATAGGGTGGCAATTAATTTGAGTCTCTTGGCAACATTTGGTGACCTACCCCA  
TATCCCAATATTTCCAGGTTAGATTAGGATGAGGTAGGAGGATGATCAGAGAGGCGGA  
GAAGGAAGAGTAACTCTGAGTGGCGGCTATTGCTCTGTTTCCAGGTGCTGTTCCAGCTG  
TTGAACCTTTAGGCTTGAAGCTTTGAGTATTATTGAAAAATGAGGATTTCAAGAGT  
CAGAGGAGTTTGAATATGTGTCAGCGGGGACACTGCTAGTAATAACATTAATAACTG  
ATGAA

## 【 図 6 6 】

FIGURE 66

&gt;&lt;/usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseq.min/ss.DNA92264

&gt;&lt;subunit 1 of 1, 216 aa, 1 stop

&gt;&lt;MW: 23729, pI: 4.73, NX(S/T): 0

MVPMHLGLRLEKPLLLCCASFLGLALLGIKTITPVAYFFLLTGFFFLFAYLLVRF  
LEWGLRSQQLSMQTESPGPSGNARDNEAFVVPVYEEAVVGLSEQRPQLDQPPPY  
STVVPAPPEEQPQSHPEGSRRAKLEQRRMASEGMSAQEGSPGRAPINLRGRPAV  
STAPDLQSLAAVPTLEPLTPPPAYDVCFHPPDDDSVFYEDNWAPP

タンパク質の重要な特徴:

シグナルペプチド:

アミノ酸 1-25

膜貫通ドメイン:

アミノ酸 41-59

N-ミリスチル化部位

アミノ酸 133-139

## 【 図 6 7 】

FIGURE 67

GCGAGGCTGCACCAAGCGCTGGCACCATGAGGAGCGCCTGGGCGCTTGCCTGCTGCTGCT  
GCTCTGCGGGAGCCCCGCGCGCGGCCACTCCCCGACTCTACTCTCCGCAATGCGG  
GCCCTGAGCCAGGAGATACCCGCGACTTCAACTCTCTGAGCTCTGGAGCCCTCGGAGC  
CATGTGTGAGATACCTGCCAGCTGTACTTGGACATACCAATTAATGCTGTGGACAA  
GCTGCGGAGCTTTTGGGCTCTCCCGCTGTGGAAAGTGGCCAGGTAGATCTCTGAG  
GACAAAGCACCGAAGCTGTACACCAATCATGAATCTGTTCTGCGAGGAGATTTGGTATTC  
TGTGGATGACTGCAATGCTTGGAAATACCAATCCAGTGAATCGGTCTTCCAGATCG  
TCAGCGCTTAAAGGAACTGAGACCGAGAGAAAGAACCAAGGAACTAAAGTTATGTGACTA  
CCGAGCTTAATGGSCAGAGCCATGACCTCAGAGTCTTGTGTAGTTATGTCTGAAC  
TGTATGTATCTCTCTACTCTTGGAAACAGGCGCTGTATCTTCAACAGGAACTCTCTT  
TGAGCATAGAGTTAGCAACCATGCTTCTCAATCCCTTGACTCATGTCTTCCAGGATGGTT  
AGATACAGAGCATGTGATTTGGTCAATTAAGAGAGAAAGGACTACAGGCTTCACTTT  
TATGAACACTATTTTGAAGCATGACATAGATGTTTTTATTAAGGTTTAAAGGAT  
AATGGTACTTTTATTTCTTTCTGATAGAAACCTGCTTACATTTAAACAGCTTCTATTG  
CCTTTTTTCAACAGAGCTTTCTTCACTGTCTTCTTCAATTAAGAGAAATTAATGCTTTAA  
GATATATATTTTACGTAGTCTGACAGGACCACTCTTTCAITTAAGAGGTGATGAAATCA  
AATAAGAAATCTCTTCAATGGA

アミノ酸 16-22

アミノ酸 162-164

N-グリコシル化部位  
アミノ酸 17-21, 47-51

【圖 7 6】

**FIGURE 73**

TCGAACCAACGGGTGGTGGTGGTGGTGGACGCAATTCAGTCCCGGTGAGAGTAGTAAATG  
 ACCCTTTCTTCCGAGGTGGTGGAGAACACCACTATGAGAGAGCTCCAGAGAGACCGTAT  
 GTGGAGGAGAGGGCGGTCTATCAATCAATCACTGGTTCTGGTATCAACGATGAGTATCCGAG  
 AGGCTCTTGAGCAAGCAGAGGGAGTCCCATTTATTGGGAATCAGAAATCAGAAAGTGTG  
 TTGTATTTGTGGAGAGGTGGAGAACGACCCACATTCAGCTATAAAGAGCAAGAGATCATG  
 TATCTGATATGGCAACCGAGCGCTGGAAACCTCTTCTTACGCTGGCAGAGCATGGTGA  
 CCGAGGACCTCTCTGGTGGTCTGGGGCTCCCGAGCATGGTTCATGGCTCTCCAGAGAGAG  
 CACGAGGACCTCTCTGGTGGTCTGGGGCTCTCCCGAGCATGATACACAGCTGGCTTTGATTAAT  
 ATAAATACGTAAGCTACGCTGAGCTGAGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
 CCAATGGTCTTGGTCTACATCTTTCTTAGTGTCTATTCAGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
 AAGGCTCTGGTATATCTCTATCTTTATTAAGAAGAGAGCAATCTACTCTACGACACTCA  
 AGAACAGAGCTGGCTCCAGAGACGAGGAGAGCTGGGTGGTATAAGGCTGGTCTCTCAAGT  
 GCGTGCTGTAGGACCAAGAGCATCTGATGAGTGGCTATTAGACTCCAGAGACCAAGCAT  
 GAGCTCTCTCTAGGGGTGGTATGAAGATGCTTCAGAGCTCATGCGCTGGACACCATG  
 CGATGACTACGACAGAGCTATCTCTGGTCTGGTCTTGGTCTTCCCTCTGGAGATGATTA  
 CACGAGCTTTATATGGTGGCAATATACCTCATTTGGTGTATGATAGCTCTCTTAGCAT  
 TAAGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAG  
 GCTGTACCAAGCTGATGACACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC  
 CTTCTGGGATGATCATCTCCAGCTCTTTATATCTGGCAATATCTGCTCATGGTGTGATTA  
 GAACCTCTGATGATTAAGCACTGTGTAACAAAATAATTTAGTCTTAAGTTAATCACT  
 TTGCTCCATATGATATATGATATCTTTAAAGTTAAATAAATCTTTGGTATTTTATATATTA  
 TTAAGCTAAACTGATATATAATAAGAAGAGTAAATCTG

【 図 7 4 】

**FIGURE 74**

MRGTPGDADGGGRAVYQSITVAVITCKYPEALEQGRGDPIYLGIQNPENCLYCEKVGEQPT  
LQLKEQKIMDLYGQPEPVKPFIFYRAKTGRTSTLESVAFPDWFIASSKRDQPIILTSELGK  
SYNTAFELNIND

シグナル配列:

アミノ酸 1-17

N-ミリスチル化部位  
アミノ酸 10-16

細胞結合配列:  
アミノ酸 36-39.

【圖 7 5】

**FIGURE 75**

[illegible]

## 【 図 7 7 】

**FIGURE 77**[illegible]

## 【图 7 8】

FIGURE 78

MLLPGRARQPPTPQPVQHPGLRRQVBFPGQLLRIFYCTVLVCSKEISALTDPSGYITKLLQNHITTYACDGYDYL  
LQCPHRSTISVSQASVAGDQYKQDQCSQKPAKRSDBESLCTVATYTGKVLBDQCNQRACHLLVNSRVFPGDPLCPGS  
SKVLLVSPKCPQHELKNTYCDQELBGLHCHBSKFLMITYATFQRKQVBERDQICSSKAKRLPPDFCLSYALQALV  
SRCKGKQKRCILVNNHFFSGPCLPGVKKLLVTYACVPKNILTAIDPAIANLKPSLKQKDGBYGNDFPSGSK  
VLKRGDGLVNSNLAAFPYIAHRAHRAHLPVSSVICGLATLALVIRSSCAKDFRDLQGRQLVPGQSKVBE  
DSEDEEBEDPSDDPQELSGPRTSPYSSITSIAEALERIIRREQIIOBHMNSGLDTSPLRMNGQF

膜貫通ドメイン:

アミノ酸 32-49, 322-343

N-グリコシル化部位

アミノ酸 62-66, 165-1

チロシンキナーゼリン酸化部位

アミノ酸 280-287

N-ミリストイル化部位

アミノ酸 302-308, 333

アミド化部位

**FIGURE 76**

```
></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA108912
```

&gt;&lt;subunit 1 of 1, 170 aa, 1 s

><MW: 19663, pI: 11.81, NX(S/T): 0

NRRLRLWGLAWLLARAPDAAGTPSASRGPRSPHYPLEGDRVRRFLFSSTHFFLRV  
DPGGRVQGTRWRHQDSILEIRSVHVGVVVIKAVSSGFYVAMNRRGRLYGSRLYT  
VDCRFRIERIEBNGHNTYASQRWRRRGQPMFLALDRRGPRPGGRTRRYHLSAHFL  
PVLVS

タンパク質の重要な特徴:

シグナルペプチド:

1-17

N-ミリストイル化部位

22-28

HBGF/FGF ファミリータンパク質

74-125:139-166

## 【圖 7 9】

**FIGURE 79**

[illegible]

FIGURE 79 CONTINUED

GCCTGCCCCAGGCCACTGGGCCGTTTGTATGACCTCAAGAGTCACAGGCAGAAAAATAGGAGCAGGATTTCGCC  
TGAGGAAAGATTAATCTGGGACATCTCTGCTCTTCGTATCATCTTCATAGTACCAATATACCTCTTACCCAGGCA  
GTGAGTGGCTGAGGCTCTGAGGACGAGCTCTCGTGGCTCCAAATGCGACCTCTGCCATCTGCTCTGTGTAGACAT  
GTGGACCAACCACTGACGCTCTGTGTGCTCCAGTTTTCCTATTGTAAATATAGAGACCATAGTGTGACTATT  
TGAGACATAGTAAAGATTTCAATAAAGAGACATGGCACAGATGAGTCTCATTAATA

【図 8 0】

FIGURE 80

```
></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA96860
><subunit 1 of 1, 528 aa, 1 stop
><NM: 59000, pi: 8.73, NX(S/T): 9
MDIKCARFLCLCLTLQATFTWEEILSYMHMMQVSRGRSSVSSRQLHQLEQMLNLS
FFGYNLQLOTFTTQISLAFKLSCDPSSLSLTSATLKEVPOAGQGHARGQHMQFFAELTSD
ACKTRPRELRILICIYFSNTHFFDKENSSLSLNNYVLGAQLSHGHVNNIRDPVNI SPFWHQ
SLEGYTLTCTVFWKBAKQKQFWGWSFPGCRTEQPSHSQVLCRCHNLTYPFVIMQLSPALV
PAELLAPLTIISLVQCSISIVASLITVLLHPHFPRKQSDSLTRIHMNLHSAVILLINIAFL
SPAFAMSFPVPSACTALAAALIAVALLCLTWMALISGNYLLYLLGRVYNIYIRKYVPLGV
LWGAPALVLVLGLSLVKSSVYGPCTTFVPSDMENGTGQNMISCHWRSPVHSVLMVM3YG
GLTSLFNLVLAVALMTLRLRLRERADAPSVRACHDTVTVLGLTVLLGTTVALAFFSPGVF
LLPQLFLFTIILNSLYGFFLFLMFCQQRCSREABAKQIEAFSSSQTTQ

タンパク質の重要な特徴：
シグナルペプチド：
アミノ酸 1-21
膜貫通ドメイン：
アミノ酸 244-264;290-309;316-344;358-376;411-431;468-491
N-グリコシル化部位
アミノ酸 18-22;58-62;65-69;146-150;147-151;173-177;
179-183;394-398;400-404
cAMPおよびcGMP依存性タンパク質キナーゼリン酸化部位
アミノ酸 274-278
N-ミストイリ化部位
66 GLSLTS
101 GQOHAR
157 GAQLSH
255 GCSISI
311 GSACTA
420 GGLSLT
467 GTTWAL
原核生物膜リポタンパク質脂質結合部位
アミノ酸 246-257;318-329
真核生物チオール(システイン)プロテアーゼヒスチジン活性化部位
アミノ酸 410-421
Gタンパク質共受容体ファミリー-2タンパク質：
アミノ酸 273-302;314-343
```

【図 8 2】

FIGURE 82

```
></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA96883
><subunit 1 of 1, 514 aa, 1 stop
><NM: 55687, pi: 8.78, NX(S/T): 2
NRVAVSGPFLCLILLLLDHPSPQTCPLRRPFXKLSPKSPRLALPQAGTFPWSHCKDAILGLEEVALTFEMR
NRSGAVNSRASPVSAMEVQCMRVITGLGRGAGQGMVYTRGRGHVGSVLGGLASHDIOITPDPSPABITPDS
PATRVLASDGHIFSPQPGDASQGLSQCSDHWFENRPHSPRARIITYMGRQLRMSLNSGLTSPDGPGEFCDVVGPLL
LVPGGFFGVSAATGTLAGHDPTGQVFPQPFLLENQQLRLARQLBGLMARLGLGTREDVTPKSDSEAQGEGERLFD
LZETLGRHRLILQALRGLSKQLAQABERQWKKQIGPQIQARPIQDGNALDASQIIPFTPGRGHLSMSLXKDSAKV
GALLHQQWTLQALQEMDAVPMARAGQVYLPVIGIHEHFLRLDLHLLGLLQBELRGTPAKAAAKAPRPQQPFR
ASSCILQGIPLFYLLIQTVGFPGVHFPRQELNKSLLQCLSTGSLPLGPAHPHTPALGILRRQPLASMPA
```

タンパク質の重要な特徴：  
シグナルペプチド：  
アミノ酸 1-23

膜貫通ドメイン：  
アミノ酸 215-232;450-465

N-グリコシル化部位  
アミノ酸 75-79;476-480

グリコサミノグリカン結合部位：  
アミノ酸 5-9

N-ミストイリ化部位  
アミノ酸 78-84;122-128;126-132;168-174;172-178;  
205-211;226-232;230-236;236-242;356-362

アミド化部位：  
アミノ酸 102-106

【図 8 1】

FIGURE 81

```
CGATGCCGGCGGTCAGTGGTCCAGGTCCTTATTCITGCGCTTCTCCTGCTGCTCTCGGACCC
CCACAGCCCTTGAGAGAGGGGGTTCCTCTCTTACGGCAGGTGTGAGTACAAAGCTCAGCTTCAAA
GGCCCAAGGCTGGCATTGCTCGTGGGCTGGAAATACCTTTCTGGAGCCTATCTGGAGAGGCCA
TCTCTGGGCTTGGAGGAAGTGGGCTGACGCCATCCATGAGGAACCGAGGTGGCGCGTGTG
GAGCAGGGGCTCTGTGCCCTTCTCTGCTGGGAATGAGAGTCCAGATGAGGGTGAAGCGTAG
CTGGGGCGCGGGGAGGCCAGGCGATGGCCGTGTGGTACACCCGGGAGAGGGGCGCTGTAG
GCTCTGTCTTGGGGGCTGCGCTTGTGGGACGGCATCGGATCTTCTTTTGACTCTCCGGC
AGAGGATACTCAGGACAGTCTGCCATCCGTGTGCTGGCGAGCGAGCGGCGACATCCCTCTCT
GAGCAGCTTGGGATGGAGCTAGCCAAAGGCTTGGGCTCTCTGTCATTGGGACTTCCGGAAACC
GGCCACCTCTCTTGGAGCAGCGATCACTATGCGGGGAGAGGCTGGCATGTCTCTTGA
CAGTGGCTTCACTCCAGTGAATCCAGGTGAGTCTGTGTGGATGGGGGCGCTCTGCTTTG
GTCCCTGGAGGTTTCTTTGGGGTCTCAGCAGCCACCGGCACTCTGGCAGGTGAGGATCCCA
CTGGACAGGTTCCCTCTCAGCCCTTCTGGAGATGACAGCTCCGCTGGCGAGGCGAGCT
GGAAAGGCTGTGGGCAAGGCTGGGCTTGGGACACAGGGAAGGTATACCTCCAAATCAGAC
TCTGAAGCTCAAGGAGAAGGGAAAGGCTCTTTTGAACCTGGAGGACAGCTGGGAGAGACCC
GCCGGATCTCTCAGGCTCTTGGGGGTCTCTCCAAAGCAGCTGGCCAGGCTGAGAGCAATG
CAGAGAGCAGCTGGGGGCCCGAGGCCAAGCGAGGCTGAGCGAGGCTGGGGCTTGGATGCT
TCTCTGGCGAGTCTTCCATCCACCCAGGAGAGGGTGGCCACTCTCTCATGTCACTCAATAAGG
ACTCTGCCAAGGTCCGTGSCCTGCTCTCATGGACAGTGGACTGTCTGCCAGGCTGTGAGCA
GATGAGGATGCAGCTGTGCGATGGCTGCAGAGCCAGCCAGTCTCTTACCTGCTGTGGGC
ATTGAGCATCATTTCTTAGAGCTGGACCACTCTGGGCGCTCTGCAGAGGAGGCTTCGGG
GCCCGCGAGGAGCAGCAGCCAAAGGCCCGCCGCCACTGGCGAGCCCAAGGGCTCTGCTC
GTGCTCTGAGCTTGGCATCTTCTGTTCTTACCTCTCTATTGAGCTGTAGGCTTCTTGGG
TAGCTGCACTTTCAGGAGGAGCTGAAACAAGAGCCTTTCAGGAGTGTCTGTCCACAGGCAAGC
TTCTCTTGGGCTTCCACACACACACCCCGAGGCCCTTGGGATTTCTAGGAGGAGCAGCTCTT
CCTTGGCAGCATGCTCTCTTGAACCACTCAGAGGCTGTCTTGTGATCATCTGGAGAGCAGG
ACTGTCTTGGGTGGGGCTTGGCAGTATCTCTCTCGCTTGGGTGGAGCTCCACAGCAC
ACCTGAGCTTTGGGCTGCTCCACCTCGTAAAGGTGATTTCCCTCTCCCAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

【図 8 3】

FIGURE 83

```
GTAGAGGTGAAGCAGCAAGACTGCGAGAGCCTCATCAAGAAGTGTGGAGTGAAGGAAGGCTTCAGATGGACAA
TTTGTGTCTTGGGAAATAAGGAATGGAATTCCTCTGAGTAAGGGTGAAGAGGCTGCTGTGTCAAC
TTTGACCATTTTCAGATTCTCGGGGCATTGCTGAAGAGGATTTGSAALAGFTATCATCTTGACAGAGGAGA
CACTAAGAATAATGATGCAAGAGGATGATGACAGCAGAAAGTGCATCAGAGAGATGAGGTTCGAGATGTTT
TCCGGAGGCTGACAGTCAATGACAGGGCTGGAGACCCCTTCTGCTGCTCACTGTGAGTATCTCTTCCAGATGAG
GAGACATCTTCAATGAGTGTGTGAGCTGTCTCTGGGAGGAGGCTTCCCTTACATCTTCCAGAGATGTGCAATTT
CCAGAGGGGAGTGTGAACCTCTACATCTGTGAGCTGGCAGTGGCCCTGGAGTATCTTCAGATGATCCACATCA
TCACAGAGACATCAAGCCAGACATATCTCTGTGATGAAACAGAGACATGTTTACATTTACAGACTTCAACATA
GACACAGTGTAGTGAAGAGAGAGAGAGGGCTTCTTCCATGCTGGCAGCAGAGCCCTTACCTTCAGAGATGAT
CCGGTGTTCATGACAGAGGCTCCGATCTCTTATCTCTGTGAGCTGTGCTTGGAGATCAGAGCAGT
AGCTGTCTCGGGGCTGGAGGCGGTACGAATCATCTCGTCAAGCCCATGATGAATACCTTAAACATGTTCCAG
GTGAGGCTGTCCACTACTCTCCACGTGTGTGCAAGGGAGTGTGGCCGTGTGAGAGAGCTTCCAGACAGGA
TCTTGAGAGGCGGTGTGAGCCTTCAAGACATAGAGAGAGGTGTGCTTCTGGCAGCATGATCGGAGCCGAG
TGTTCAGAGAGGCGATGTGCCCGCTTGTGCCCAATAGAGGAGGTTGAATGCGAGTCCATCTTTTGTGCT
GAGAGATGATTTCTAGATCCAGGCATTTCAAAAAGAGAGAGGATTTGGCAAGACAGATCCAGGATGG
CACAAAGAGAGCTTCCCTGATGAGACACTGTGAGCAGCTGTTTGGAGACTGTCCGGAGAGATTCATCATAT
TCAACAGAGAGAGTTCAGAGGCGAGAGGACAGGACCCGCTGTGATCCAGCAGACCCAGAGAGAGGAGG
CAGGCCAAAGCAGCTCCAGGAGGGTGCACACACACTCTTCAACACAGCTGCACCGGTGTCAGCAG
CAGGCCACACTTGTGCTGCTCAAGAGAGTGCATGCTCTGTGCCCTGCCACAGAGAGCCCTCTTTGTG
CCTGATGTCCCTCTTCACTCCCTGAAACATCAGAGTCCAGAAAAGCCCTGAGCTTGGAGCTGGAGAGCCTG
GGTCTGTGCTCCACTCCATGAGCATTTCACTGTGAGCTGTGAGCTTGGACAGAGTCACTGTGTGTCTGTGTT
GTGATCTGTCCAGAGGGGTAAACACTTCTGCCCTCACTTCAATTAAGATTTAGGGAGAACCACTTAAGT
AGAAAACATGAAAACCTTTGATATTTATAAATCATTTTAACTGTGCAAAATAAACCTTATATTTGAAGTGA
CTCCCTTTTCCAGAGCATCAAGCCTTCAAGCTTGTGATTTTGGACATCTTACTTGTGTAGAGAGGACTTC
CGAAAACACAGCCTTGACAGCAAAATAAGGCTGTGATATGTGGGCCCTTTCTATGGAACACACCTGCAAAAT
CTTGAGACAAAACCTGAAGTGTCTTCACTGTGATTTCTTGGCAGGCCAGCTCTTGTGAGCTTGTGAATGTGT
CAGCATGTGAGAGTGTGCTGAGCATGTTTACTCTGTGAGCATGTATCAGCACCCCATCACTGAGGCTTGA
TCTTATCTTATGTTTTCAGCAGCTCTCAACACCCATATCCCGATGTGAGTGGAGTGCACAGGTTGCTTAT
CAGATGAGAGTGTGCTGAGCATGTTTACTCTGTGAGCATGTATCAGCACCCCATCACTGAGGCTTGA
AGCCAGACTTGCAGAGACTTCTCACTCTCTATCAGCTTTCAGGGTCTTCTCTCTGGGAGAGGTGTAAAA
TCACTTCTTCAAGTTCTTTTCAAGAGATATCAATGTGTATGGGAGAGGAGTCTCCCTATTAACATAAG
AAGCATGGGTGCTTAGAAGTTTATTTTCAAGAGAAATGGTTCACAGAAAAGAGAACTACATCTCTGATCTG
CTCAGGAGAGGCTTGGCTTTGAACCTGGAGAGATGTTGGATGAGCAGGAAAGCTTGAATCTTGGAGTCAGGTT
TGTGTGAGATCAGCCTCTGTGTATCTATCACTAGCTGGAGAGCTTAGGCAAGAGATGAATGCTCTGAT
GGCAGTTTCTCTTATTTAAACAGGAGATTAATACTAATATGAGAGAGTTCAGGAGTGTAAATAGATCT
GTGTGAACCCAGCATTTGAGTGTCTAGAGAAAGGCTTTTGTGAGCATATCTGTATCTATTTAGAT
ACTTCTTCTCTTCACTCAACCCAGAGGTCAAGTTTCTGTGCAAAACAACTGTTTAGAGATCTTCCAAATGTC
TCTCTGGGCTTGTATATTTGTGTGTGTGACACCTGTGAGTGTGACAGTGTGTATTTTATTTTCACTCACT
CCATTTTCACTTTTACATGATTACTCAATCTTGGGGCTGTCCATGTGATCTTGTAGATTTCTTAAGAGCA
TTTAAATGATGTGTAGGTTTATATTTTATTTTAAATAAGAAATGATCAGTGTCTTCTCTTCAACCG
AGAC
```

FIGURE 83 CONTINUED

```
TATTTCTGAGTGTGTGCTCTCTGTGAGTGTGCTTGTGCACTGCTTTTCTTACTTCACTGTCCCATCAACA
ACCTGCTGTGCTCCCATCTCCCAAGAGAAATAGAGGAGCTGTGCTCTGCTTCCCTTGTGAGCTGTGAGCTCTTA
AGATGATGTGGGTGTTTATTTGTGTGAGTGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAG
CAGATTTCTGCTTCTTCAAGTGTGCTTCTTGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAG
```

## 【 図 8 4 】

FIGURE 84

```
</usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA136110
<subunit 1 of 1, 364 aa, 1 stop
<MW: 42195, pI: 7.40, NX(S/T): 1
MKYMNKQKCIERDEVNRNVPREIQIMQGLEHPLVNLWYSFQDEEDMFVVDLLLGGDLRY
HLQQNVHFTEGTVKLYICELALALEYLQRVHIIHRDIKPDNILLDEHGHVHITDFNIATV
VKGAERASSMAGTKPYMAPEVQVYMDRPGQSYYPVDWWSLGIYAYELLGRWRFVETHSV
TFIDEILNMFKVERVHYSSTWCKGMVALRLKLI/TKDPESEVSSLDHIQSVPLADMMWDA
VFKKALMPGFVPNKGRNLNCDPTFEEBEMILBSKPLHKKKRLAKNRSRDGTADKSDCLNGLH
LQHCLETVREEFIIFNREKLRRQGGQGSOLLDTDSRGGGQAKSLQDGCNNNLLTH7CTTR
GCSS
```

タンパク質の重要な特徴:

N-グリコシル化部位  
アミノ酸 285-289

N-ミリスチル化部位  
アミノ酸 123-129;290-296;337-343;339-345;348-354

セリン/スレオニンタンパク質キナーゼ活性化部位シグニチャー  
アミノ酸 92-105

## 【 図 8 5 】

FIGURE 85

```
CTGAGCTCCCGGGCTCCGGCAGCGCGCTGGGGGGGGCCCGCATTTGCACACTTGGGGGGG
CCGACATGTTTCTGGGGATGGGGCAGCGCGCTGACGCTGGGGCCCGGATCCGCGCGCGACG
CGGGTCCAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
ACACTTCAGTCTGCGC
AGGAACTTGGCCCTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AAAGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
ACACCATATCTCTGGGTGGATTAAATGTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TGCAACCATGGGCTCTGAGCATCTACTGCGCTCTGAGAGACCGAGATCTGCTACACTCAG
CAGCATGTCGAGATCTCGGAAACAGATATCTGAGATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GAGTGTCTTATCCACTGCTGGCTCAGAGACTCTCGAGCATGAGGGCACAAGGTCTGCACTTCT
TGTGTGAGGAATAATCTGTAACTTGCCACTGCGCGCCGAAATGAAACTGATGTCACATTTCT
CCGACACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TCTGTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TAGCATCTCAGTGGGATCTGATGTGTCACAGACTGTCATGAGTCAATGGCGTGCAGATTA
ATTACATGTGAGACACACACTCTTGAGGTCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
ATGAGGAATAAATGTGTCTCTCATTTGAGCCATTTTGAGTCTAACCGAGACTCTCTAAGGC
CTCTCTCTCAGTACGCGCCAGTTCATACCATAAAGCTTTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TCTGCACTTATCTGAGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AGTCTCTGAGACTGTAAAGATTAGAGATATGTTATAGGGCATGTTATAGATGTGGGCTTCT
TTCAGGGAATAATGATCACTTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TTTTAAACATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TGGAGAGATAGTAAATTCGAACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AAAGTGTCTTATATGTTGGGGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
ACTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTTGACCATTAATGATGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GCTTCGAAACGAGATGAGATGTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TCTAGACAGAGAGATTCTGAAATGAAAGAAATGTTGTGGAGATTGATCTCTCTCTCTCTCT
TGAGGGCCGACTTAAAGTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GAGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TCTGATGATGAGTGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAA
TGATTCAGAGCTAAACAGAGAGACTCAATGGGAGATTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TCTGATGATGAGTGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAA
TTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
ACTAAATATATTTCTAAAGAAATTCATTAATCTGACAGAGATGATCAATTAGAATACATA
TTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
ACCATGTTGTAAAGAAATTAACATGATGAGCAGAGCAATATGTTGTCTCTCTCTCTCTCT
CCATGTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AGTTTGTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AAGAGAGACTGTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
ATGAGAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTAAATGTCACAGAGAGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AATTTGGGTGGGAGATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
CCAGGCACTATGCTTAAGCACTTTACATAAGTTAGGATTAATCCCTGCAAGAAATCTCTATA
```

FIGURE 85 CONTINUED

```
AGAAATGTTACTAGCATTTACACTTCCAAATGAAGTCAAAAGCTCAAAACGATTTGTTG
TGAAGTCTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AGTGTGGATTTATCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TATCATGTGGAGTTTATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TGATGTTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AGGAGATGTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
ATACCTACAGATACCATTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
ATGTGATTTGATATAGAAACAGAGAGATGACACACACAGAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GATCTAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
ATAGATGTTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AGAAATGATTTTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GAGGTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTCACTATTTGATTAAGTCTTAAAGTAAAGGCAATGATGTGTATTAAGGATGTTGCTGCT
ACATATTTATTTTGTAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TTTTAAATTTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AAAAA
```

## 【 図 8 6 】

FIGURE 86

```
></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA108725
>subunit 1 of 1, 171 aa, 1 stop
>MW: 19118, pI: 5.99, NX(S/T): 2
MEFQPALAWLLLSLLADCLKAAGSRDFTVKDIIYLHPSTTPYPGGFKPTCTCKAADNYS
CNRWAPDIYCPRETRYCYTQHTMIVTGNISVTKKCVPLERCLSTGCRDSEHGHKVTCS
CCBGNI CNLPLPBNBTDATFATTSPIQNTNGHFERCNSVIVSLMLMLGLML
```

タンパク質の重要な特徴:

シグナルペプチド:  
1-22

膜貫通ドメイン:

なし

N-グリコシル化部位  
134-138  
147-151

N-ミリスチル化部位  
45-51  
87-93  
106-112  
124-130

Ity-6 / u-PAR ドメインタンパク質  
115-128

## 【 図 8 7 】

FIGURE 87

```
ATGGCCCGGGGACAACTGGCTGGCGCCGACATAGGGCTGGTGTGTGGAGCTTGGCGCTG
AGTGTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AGGAGGCCCGGGGACCGGTGGGGCGCGGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CCGACGCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
ACGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTCTCTGGATTTATCAATGGGCGAGATGATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTGGAGGAGAGTACTTACTTGTATGCTCTTTTACATGGATGCTTAAAGTCACTGATACG
AATTTGAGAGTTTGTGAACTCACTGCGCTATTTGAGAGAGCTTGGAGATTTGAGGAGCT
CTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CAGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
ACTCTACTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GTCTGGAGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AGCATTAAGCCCAATTTGCGAGGGCGAGTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TCCAGAGACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TGGGAGACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CGCTTAACCCAAAGTCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TGTGCTACTAGTCTCCCAAGATGATCTATGATCCCTATTTCTCAAGATGTTGGATCTGAGATG
TUNAGAGACACAGAGCAGAGAGAGTGGAGGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TAGCTGAGCATGCGCATGTCGCTATGAGATTTGAGATTTGAGATTTGAGATTTGAGATTTG
GATGTGTAGTTTAAAGAAAATAGATTGCTCTCAACACACATTTGCTGTAGCTTACTCTCA
TGAGGCAACATGAGCCAGACTCCACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
CTTGTGAGAGGCACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GGCTTTGAGATGTCGAAACAGAGATGATAGCATAAAGTTAAAGATGGGCTCTCTCTCTCTCT
ACAGACTTGTGTTCAAAATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CCCCATGAAAGATGGAGAGACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GTGGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AGGCCATGTCATTTTGAAGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AAACGACTAAATGCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTGAAAGATGTCGAGCTGAGAGACAGAGAGATTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GACTCCAAGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TCTGGGCTTTGGCAGACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
GATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AGATCTTACCTCTGATTTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TATACCTCTTACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
ACTTATTAATAATTAATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GACACCATGTCGAAATTAATAATTTTGGTGGGAGTGGAGAGATTTGTTCTCTCTCTCTCT
```

FIGURE 87 CONTINUED

```
ATGTGAAAGTTTAAAGCTATATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GAAAGATTAAGAGAGATTAATAATCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GCAATTTATCTGAGGTTTCCCGAGGGTGAATTCATAGTGAATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TGATGCTTTTAACTTATGATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GGATTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GCTTATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GCTTATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
ATTAGCAAGATTAAGCAATGGAGCATTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GAATAGACATGTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GAGGATATATATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AATATTAAGTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
CAGGGTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AAGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
ACAAAAAATAGCGGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTCAGGAGAAATGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
```



## 【 図 9 8 】

FIGURE 98

MRPPFALALAGLCLEALPAAASYFGLTGREVLTPFFGLGTAAAPQGGAHLKQCDLLKLSRQKGLCRREFPGLAETLRDAHLGLLECCQFPHERWNCSLBGRMLKQFKPFTAFLYAVSSAALTHTLARASCAGRMRECTDDSPGLESQRAGWGVCDGNLDKSTPLKPNLPGSKRGNKDLRARADAHNTHVGIKAVKSGRLRTCKCHGVSGSCAVRTCKWQLSPFFRETQGVLLKLYSDAVKVSATNSALGRBLWPAQVGSLLTKGLAPRSGDLVYMEDSPFCRPSKYSPTAGRVCSREASCSNLCGGRGYDTSRLVAFSLCHQVQWCCYCEQCCQVSELYVTCKH

膜貫通ドメイン:

N-グリコシル化部位

— 2 —

73-78

205-210

Wnt-1 ファミリータンパク質

171-213

310-355

54-356

## 【 ㄨ 9 9 】

**FIGURE 99**

[illegible]

## 【图 103】

**FIGURE 103**

[illegible]

AGGTCCCTGTTCAAGAGCACC  
CTCAGGCCTGAAAAGGATGGG  
GACCCCAAAGCCCTAGGCTG

CCACCAGCACTCCTGGGACCC  
TATTTGGCCCTTCAGCTGCCAG

[illegible]

TGGCTGGGCTCCACCTACCAG  
TATCAACCAACAGCAGCTCC

CTGTCCCCAACAGGCACCCACAC  
GGAGAGTAAACAGAGTTGCCAT

TTCTGGGGCTGTGATCTTCATCCGGCTTGGCAGGAGCTCTGGGAGCTCATCATGCCGATG  
TGGCGGTCTCTTGGTGACCAACCCGGCCGGCAGAGGAGGAGGAGGATACACCGCTCCAGCA  
CAGTGCCCCAGGCTACTACCACTCACACCTAGACCTGGAGGATCTGCAATGCACTGGAACT  
CGCGGTCTCTGGGGGTCTCTTCCCCCAGCCAGGGTCCAAAGAGCTTGGCTGGGGCAGAT  
ATAAACCATCTTGGTGG

【 図 1 0 6 】

FIGURE 106

```
>>Sequence Version 1, Thu Jul 10 07:39:37 2003 DNA329632 [mln]
<</usr/seqdb2/ss/DNA/dnaseqs.mln/ss.DNA329632
>>subunit 1 of 1, 248 aa, 1 stop
<<MW: 27496, pI: 10.24, NX(S/T): 0
MAPKAPK4PEPAAPPAPPPGAKKDKGKGESDPKQKAVQDKHSPSKPKQKAVQPKH
VSTGRSCREYRNELNKSINKSEFVLGHARIKIKRSLGCLTAAAILLSLTVFLIRLITL
RISFTSPFLLLYSFAIHRVYFPLFPLMISDNLNDLACPLVGVAVFVRSRRSMNHYLL
AVTLIGAAGVFAPFIVDCLRHNPRGKKAKKHMLVPPPGKKBGKQKQKGPETAKFPFPGPK
PFGPKAGK
```

FIGURE 105

2009504183000001.app



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/027777

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/85 C12N5/06 A01K67/027 A61K49/00 A61K38/00		
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) C12N A01K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/194791 A1 (BAKER KEVIN P [US] ET AL) 16 October 2003 (2003-10-16)	1, 2, 22, 46-49, 52-55, 63-66, 86-90, 92-95, 98-102, 139-143
Y	paragraphs [0343], [0344], [0708] - [0714], [0718], [0719], [0742] - [0794]; claims; figures 217, 218	1-149
Y	US 2004/185531 A1 (ASHKENAZI AVI [US] ET AL) 23 September 2004 (2004-09-23) figure 81	1-149
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  8 February 2007		Date of mailing of the international search report  15/05/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  CHAMBONNET, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/027777

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/058028 A2 (GENENTECH INC [US]; LEXICON GENETICS INC [US]; ANDERSON STEPHEN [US];) 30 June 2005 (2005-06-30) the whole document	1-149

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2006/027777

**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 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:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 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.:

1-149 (all partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2006/027777

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-149 (all partially)

A method of identifying a phenotype associated with a disruption of a gene which encodes for a PR0226 polypeptide; an isolated cell derived from a non-human transgenic animal whose genome comprises a disruption of the genes which encodes for such a polypeptide; methods for identifying an agent that modulates a phenotype, a physiological characteristic, or a behavior associated with a disruption of a gene encoding for such a polypeptide; an agent identified by such methods; a method for identifying an agent that ameliorates or modulates a disorder associated with a disruption in the gene which encodes for such a polypeptide; an agent or therapeutic agent identified by such a method; a method of identifying an agent that modulates the expression of a PR0226 polypeptide; an agent identified by such a method; a method for evaluating a therapeutic agent capable of affecting a condition associated with a disruption of a gene encoding a PR0226 polypeptide; a therapeutic agent identified by such a method; a pharmaceutical composition comprising such a therapeutic agent; a method for treating or preventing or ameliorating a disorder using such a therapeutic agent, or agonists or antagonists thereof; a method of identifying an agent that ameliorates or modulates a disorder associated with a disruption in the gene encoding PR0226; an agent or therapeutic agent identified by such a method; methods of modulating a phenotype, a physiological characteristic, or a behavior associated with a disruption of a gene encoding a PR0226 polypeptide based on the use of the agent of claims 46, 52 or 63, or agonists or antagonists thereof; a method of modulating the expression of a PR0226 polypeptide based on the use of the agent of claim 92, or agonists or antagonists thereof; a method of modulating a condition associated with a disruption of a gene encoding a PR0226 polypeptide based on the use of the agent of claim 98, or agonists or antagonists thereof; and a method of treating or preventing or ameliorating a disorder associated with the disruption of a gene encoding a PR0226 polypeptide based on the use of the agent of claim 139, or agonists or antagonists thereof.

2. claims: Claims 1-149 (all partially):

International Application No. PCT/US2006 /027777

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## Inventions 2-53

A method of identifying a phenotype associated with a disruption of a gene which encodes for a PROX polypeptide; an isolated cell derived from a non-human transgenic animal whose genome comprises a disruption of the gene which encodes for such a polypeptide; methods for identifying an agent that modulates a phenotype, a physiological characteristic, or a behavior associated with a disruption of a gene encoding for such a polypeptide; a method for identifying an agent that ameliorates or modulates a disorder associated with a disruption in the gene which encodes for such a polypeptide; a method of identifying an agent that modulates the expression of a PROX polypeptide; a method for evaluating a therapeutic agent capable of affecting a condition associated with a disruption of a gene encoding a PROX polypeptide; a therapeutic agent identified by such a method; a pharmaceutical composition comprising such a therapeutic agent; a method for treating or preventing or ameliorating a disorder using such a therapeutic agent, or agonists or antagonists thereof; a method of identifying an agent that ameliorates or modulates a disorder associated with a disruption in the gene encoding PROX polypeptide; an agent or therapeutic agent identified by such a previous method; methods of modulating a phenotype, a physiological characteristic, or a behavior associated with a disruption of a gene encoding a PROX polypeptide based on the use of the agent of claims 46, 52 or 63, or agonists or antagonists thereof; a method of modulating the expression of a PROX polypeptide based on the use of the agent of claim 92, or agonists or antagonists thereof; a method of modulating a condition associated with a disruption of a gene encoding a PROX polypeptide based on the use of the agent of claim 98, or agonists or antagonists thereof; and a method of treating or preventing or ameliorating a disorder associated with the disruption of a gene encoding a PROX polypeptide based on the use of the agent of claim 139, or agonists or antagonists thereof; wherein in inventions 2-53 X is 257, 268, 290, 36006, 363, 365, 382, 444, 705, 1071, 1125, 1134, 1155, 1281, 1343, 1379, 1380, 1387, 1419, 1433, 1474, 1550, 1571, 1572, 1759, 1904, 35193, 4341, 4348, 14369, 4381, 4407, 4425, 4985, 4989, 5737, 5800, 5993, 6017, 7174, 9744, 9821, 9852, 9873, 10196, 34778, 20233, 21956, 57290, 38465, 38683 and 85161 respectively.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/027777

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003194791 A1	16-10-2003	US 2003082759 A1	01-05-2003
		US 2003077776 A1	24-04-2003
		US 2003096386 A1	22-05-2003
		US 2003077777 A1	24-04-2003
		US 2003190717 A1	09-10-2003
		US 2003073210 A1	17-04-2003
		US 2003077778 A1	24-04-2003
		US 2003199051 A1	23-10-2003
		US 2003054516 A1	20-03-2003
		US 2003092147 A1	15-05-2003
		US 2003199052 A1	23-10-2003
		US 2003199053 A1	23-10-2003
		US 2003199054 A1	23-10-2003
		US 2003190718 A1	09-10-2003
		US 2003082760 A1	01-05-2003
		US 2003190719 A1	09-10-2003
		US 2003190720 A1	09-10-2003
		US 2003190721 A1	09-10-2003
		US 2003190722 A1	09-10-2003
		US 2003082761 A1	01-05-2003
		US 2003077779 A1	24-04-2003
		US 2003199055 A1	23-10-2003
		US 2003068793 A1	10-04-2003
		US 2003190723 A1	09-10-2003
		US 2003190724 A1	09-10-2003
		US 2003068794 A1	10-04-2003
		US 2003194792 A1	16-10-2003
		US 2003190725 A1	09-10-2003
		US 2003199056 A1	23-10-2003
		US 2003199057 A1	23-10-2003
		US 2003194793 A1	16-10-2003
		US 2003077780 A1	24-04-2003
		US 2003082762 A1	01-05-2003
		US 2003068795 A1	10-04-2003
		US 2003068796 A1	10-04-2003
		US 2003049816 A1	13-03-2003
		US 2003199058 A1	23-10-2003
		US 2003073211 A1	17-04-2003
		US 2003199059 A1	23-10-2003
		US 2003199060 A1	23-10-2003
		US 2003077781 A1	24-04-2003
		US 2003073212 A1	17-04-2003
		US 2003022328 A1	30-01-2003
		US 2003190726 A1	09-10-2003
		US 2003077782 A1	24-04-2003
		US 2003077783 A1	24-04-2003
		US 2003077784 A1	24-04-2003
		US 2003199061 A1	23-10-2003
		US 2003100087 A1	29-05-2003
US 2004185531 A1	23-09-2004	NONE	
WO 2005058028 A2	30-06-2005	AU 2004299044 A1	30-06-2005
		CA 2550117 A1	30-06-2005
		EP 1694116 A2	30-08-2006

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード ( 参考 )

A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 25/22 (2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 25/24 (2006.01)	A 6 1 P 25/22
A 6 1 P 25/20 (2006.01)	A 6 1 P 25/24
A 6 1 P 25/18 (2006.01)	A 6 1 P 25/20
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/18
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 27/12 (2006.01)	A 6 1 P 27/06
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 27/12
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/04
A 6 1 P 9/08 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 3
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/08
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/10
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/06
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/08
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 6 1 P 11/02
	A 6 1 P 11/00
	A 6 1 P 37/06
	A 0 1 K 67/027

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,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,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,L,C,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

( 特許庁注 : 以下のものは登録商標 )

1 . サランラップ

- (74)代理人 100062409  
弁理士 安村 高明
- (74)代理人 100113413  
弁理士 森下 夏樹
- (72)発明者 ホーナー, アリソン アン バイヤーズ  
アメリカ合衆国 テキサス 77539, ディキンソン, フォーク クレスト レーン 433
- (72)発明者 コームズ, キャサリン イー.  
アメリカ合衆国 テキサス 77380, スプリング, カントリー フォレスト コート 52
- (72)発明者 カルバートソン, リン リン  
アメリカ合衆国 テキサス 77386, スプリング, フォックス リバー レーン 2434
- (72)発明者 デルマス - マータ, ファン  
アメリカ合衆国 テキサス 77386, スプリング, フォックス ラビン ドライブ 2827
- (72)発明者 デソベージュ, フレデリック  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404, フォスター シティ, シューティング スター アイル 187
- (72)発明者 ファン, リアンフェン  
アメリカ合衆国 テキサス 77388, スプリング, ハノーバー ウェイ 2508
- (72)発明者 フランツ, グレッチェン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94123, サンフランシスコ, ブキャナン ストリート 2819
- (72)発明者 グリーン, レスリー ジェーン  
アメリカ合衆国 テキサス 77304, コンロー, モンゴメリー パーク ブールバード 2201, アpartment 315
- (72)発明者 マシー, エリン マリー  
アメリカ合衆国 テキサス 77384, コンロー, マンションズ ビュー ドライブ 15000, アpartment 2201
- (72)発明者 マクレイン, ディナ レベッカ  
アメリカ合衆国 テキサス 78229, サン アントニオ, ハミルトン ウルフ ロード 5303, アpartment 204
- (72)発明者 モンゴメリー, チャールズ エー.  
アメリカ合衆国 オクラホマ 74346, ジェイ, ピー.オー. ボックス 527
- (72)発明者 ペイン, ボビー ジョー  
アメリカ合衆国 テキサス 77381, ザ ウッドランズ, エイコーン クラスター コート 23
- (72)発明者 ピール, フランクリン ジュニア  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, パール アベニュー 416
- (72)発明者 フィリップス, ハイディ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94303, パロ アルト, ウォールナット ドライブ 1511
- (72)発明者 ローラー, ミシェル  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, ダートマス アベニュー 550
- (72)発明者 シー, チェン - チェン  
アメリカ合衆国 テキサス 77382, ザ ウッドランズ, シルバー クレセント コート 53



- (72)発明者 スパークス, メアリー ジーン  
アメリカ合衆国 テキサス 77354, マグノリア, ブラック フォレスト ドライブ 7  
218
- (72)発明者 スタラ, ジョイ アン  
アメリカ合衆国 テキサス 75204, ダラス, クラーク ストリート 2409, ナン  
バー 313
- (72)発明者 タン, トレーシー ツー - リン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94065, レッドウッド シティ, リボルノ ウェイ  
107
- (72)発明者 フォーゲル, ピーター  
アメリカ合衆国 テキサス 77382, ザ ウッドランズ, グレイリン ウッズ プレイス  
7
- (72)発明者 ワン, チン - ユン  
アメリカ合衆国 テキサス 77382, ザ ウッドランズ, ホワイト ウィング コート  
3
- (72)発明者 セボー, トレーシー エレン ウィリス  
アメリカ合衆国 テキサス 77304, コンロー, レークショア ドライブ 205
- (72)発明者 ション, ウェン  
アメリカ合衆国 テキサス 77377, トンボール, レーク ビスタ ドライブ 1241  
5

F ターム(参考) 2G045 AA40

4B024 AA01 AA11 CA04 DA02 EA02 EA04 FA20 GA11  
4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 CA44 CA46  
4C084 AA17 NA14 ZA011 ZA031 ZA051 ZA121 ZA151 ZA181 ZA331 ZA361  
ZA401 ZA421 ZA441 ZA451 ZA551 ZA661 ZA751 ZA811 ZA891 ZA961  
ZA971 ZB071 ZB081 ZB111 ZB131 ZB151 ZB261 ZC022 ZC351  
4C085 AA13 AA14 CC21