(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-500046
(P2004-500046A)
(43)公表日　平成16年1月8日(2004.1.8)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	2G045
A61K 38/00	A61K 39/395	D	4B024
A61K 39/395	A61K 39/395	N	4B063
A61K 48/00	A61K 48/00		4B064
A61P 7/00	A61P 7/00		4B065

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 194 頁）　最終頁に続く

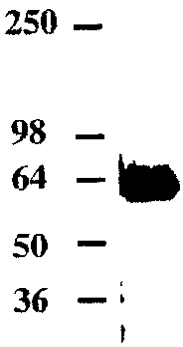
(21)出願番号　特願2001-532200(P2001-532200)
(86)(22)出願日　平成12年10月13日(2000.10.13)
(85)翻訳文提出日　平成14年4月12日(2002.4.12)
(86)国際出願番号　PCT/US2000/028474
(87)国際公開番号　WO2001/029217
(87)国際公開日　平成13年4月26日(2001.4.26)
(31)優先権主張番号　60/159,805
(32)優先日　平成11年10月15日(1999.10.15)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/159,992
(32)優先日　平成11年10月18日(1999.10.18)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/160,952
(32)優先日　平成11年10月22日(1999.10.22)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　500056297
キュラジェン　コーポレイション
アメリカ合衆国　コネチカット州　０６５１１　ニュー　ヘイブン　ロング　ウォーフ　ドライブ　５５５
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規ポリペプチドおよびそれをコードするポリヌクレオチド

(57)【要約】
本発明は、新規なヒト核酸配列を開示する。上記核酸配列によってコードされるポリペプチド、およびこのポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体、ならびに上記ポリペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体の誘導体、改変体、変異体もしくはフラグメントがまた、開示される。本発明はさらに、これらの新規な核酸およびタンパク質を含む、診断、処置、および予防のための、治療方法、診断方法および調査方法を開示する。本発明は、一般的に、核酸およびそれによってコードされるポリペプチドに関する。より詳細には、本発明は、膜結合および分泌ポリペプチドをコードする核酸、ならびにこれらの核酸およびポリペプチドを産生するためのベクター、宿主細胞、抗体および組換え方法に関する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
単離されたポリペプチドであって、以下：
（ａ）配列番号２、５、および７からなる群より選択されるアミノ酸配列の成熟形態；
（ｂ）配列番号２、５、および７からなる群より選択されるアミノ酸配列の成熟形態の改変体であって、ここで、該改変体中の１以上のアミノ酸残基は、該成熟形態のアミノ酸配列と異なり、ただし、該改変体は、該成熟形態のアミノ酸と１５％以下のアミノ酸残基において異なる、改変体；
（ｃ）配列番号２、５、および７からなる群より選択されるアミノ酸配列；ならびに
（ｄ）配列番号２、５、および７からなる群より選択されるアミノ酸配列の改変体であって、ここで、該改変体中の１以上のアミノ酸残基は、該成熟形態のアミノ酸配列と異なり、ただし、該改変体は、該アミノ酸配列と１５％以下のアミノ酸残基において異なる、改変体；
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。
【請求項２】
請求項１に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドが、配列番号２、５、および７からなる群より選択されるアミノ酸配列の天然に存在する対立遺伝子改変体のアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。
【請求項３】
請求項２に記載のポリペプチドであって、ここで、前記対立遺伝子改変体が、配列番号１、４、および６からなる群から選択される核酸配列と単鎖ヌクレオチドで異なる核酸配列の翻訳である、アミノ酸配列を含む、ポリペプチド。
【請求項４】
前記改変体のアミノ酸配列が、保存的アミノ酸置換含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項５】
単離された核酸分子であって、以下：
（ａ）配列番号２、５、および７からなる群から選択されるアミノ酸配列の成熟形態；
（ｂ）配列番号２、５、および７からなる群より選択されるアミノ酸配列の成熟形態の改変体であって、ここで、該改変体の１以上のアミノ酸残基は、該成熟形態のアミノ酸配列と異なり、ただし、該改変体は、該成熟形態のアミノ酸配列と１５％以下のアミノ酸残基において異なる、改変体；
（ｃ）配列番号２、５、および７からなる群より選択されるアミノ酸配列；
（ｄ）配列番号２、５、および７からなる群より選択されるアミノ酸配列の改変体であって、ここで、該改変体の１以上のアミノ酸残基は、該成熟形態のアミノ酸配列と異なり、ただし、該改変体は、該アミノ酸配列と１５％以下のアミノ酸残基において異なる、改変体；
（ｅ）配列番号２、５、および７からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドの改変体の、少なくとも一部をコードする核酸フラグメントであって、ここで、該改変体の１以上のアミノ酸残基は、該成熟形態のアミノ酸配列と異なり、ただし、該改変体は、該アミノ酸配列と１５％以下のアミノ酸残基において異なる、核酸フラグメント；ならびに
（ｆ）　（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）または（ｅ）の相補体を含む、核酸分子、
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチドをコードする核酸配列を含む、核酸分子。
【請求項６】
請求項５に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子が天然に存在する対立遺伝子核酸改変体のヌクレオチド配列を含む、核酸分子。
【請求項７】
請求項５に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子が、天然に存在するポリペプチ

ド改変体のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、核酸分子。
【請求項８】
請求項５に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子が、配列番号１、４、および６からなる群から選択される核酸配列と単鎖ヌクレオチドで異なる、核酸分子。
【請求項９】
請求項５に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子が以下：
（ａ）配列番号１、４、および６からなる群より選択されるヌクレオチド配列；
（ｂ）配列番号１、４、および６からなる群より選択されるヌクレオチド配列と１つ以上のヌクレオチドで異なる、ヌクレオチド配列であって、ただし、２０％以下のヌクレオチドが、該ヌクレオチド配列と異なる、ヌクレオチド配列；
（ｃ）（ａ）の核酸フラグメント；ならびに
（ｄ）（ｂ）の核酸フラグメント；
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。
【請求項１０】
請求項５に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子が、配列番号１、４、および６からなる群より選択されるヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列の相補鎖にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、核酸分子。
【請求項１１】
請求項５に記載の核酸分子であって、該核酸分子は、以下：
（ａ）第１ヌクレオチド配列であって、前記アミノ酸配列をコードするコード配列と１以上のヌクレオチド配列で異なるコード配列を含み、ただし、該第１ヌクレオチド配列中のコード配列における２０％以下のヌクレオチドが、該コード配列と異なる、第１ヌクレオチド配列；
（ｂ）該第１ポリヌクレオチドの相補体である、単離された第２ポリヌクレオチド；ならびに
（ｅ）（ａ）または（ｂ）の核酸フラグメント；
からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。
【請求項１２】
請求項１１に記載の核酸分子を含む、ベクター。
【請求項１３】
前記核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む、請求項１２に記載のベクター。
【請求項１４】
請求項１２に記載のベクターを含む、細胞。
【請求項１５】
請求項１に記載のポリペプチドに免疫特異的に結合する、抗体。
【請求項１６】
前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項１５に記載の抗体。
【請求項１７】
前記抗体がヒト化抗体である、請求項１５に記載の抗体。
【請求項１８】
サンプル中の請求項１に記載のポリペプチドの存在または量を測定するための方法であって、該方法は、以下：
（ａ）該サンプルを提供する工程；
（ｂ）該サンプルを該ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体と接触させる工程；および
（ｃ）該ポリペプチドに結合する抗体の存在または量を測定して、それによって該サンプル中のポリペプチドの存在または量を測定する工程；
を包含する、方法。
【請求項１９】

サンプル中の請求項５に記載の核酸分子の存在または量を測定するための方法であって、該方法は、以下：
（ａ）該サンプルを提供する工程；
（ｂ）該サンプルを該核酸分子に結合するプローブと接触させる工程；および
（ｃ）該核酸分子に結合する該プローブの存在または量を測定して、それによって該サンプル中の該核酸分子の存在または量を測定する工程
を包含する、方法。
【請求項２０】
請求項１９に記載の方法であって、前記核酸が、配列番号１またはその改変体を含み、そして前記サンプルが、ポストメトチックハポリドスペラチド（ｐｏｓｔｍｅｔｏｔｉｃ　ｈａｐｏｌｉｄ　ｓｐｅｒａｔｉｄｅ）、発生組織もしくは胚性組織、腫瘍細胞、またはＴ細胞型からなる群から選択される、方法。
【請求項２１】
請求項１９に記載の方法であって、前記核酸が、配列番号４またはその改変体を含み、そして前記サンプルが、ＧＰＩ－固定エフェリン－Ａリガンドまたはその模倣物を発現する細胞からなる群から選択される、方法。
【請求項２２】
請求項１９に記載の方法であって、前記核酸が、配列番号６またはその改変体を含み、そして前記サンプルが、脳または腎臓由来の組織からなる群から選択される、方法。
【請求項２３】
請求項１に記載のポリペプチドに結合する因子を同定する方法であって、該方法は、以下：
（ａ）該ポリペプチドを該因子と接触させる工程；および
（ｂ）該因子が該ポリペプチドに結合するか否かを測定する工程；
を包含する、方法。
【請求項２４】
請求項２３に記載の方法であって、前記ポリペプチドは、配列番号２またはその改変体を含み、そして前記因子は、アクチン重合化または配列番号２もしくはその改変体とのアクチン錯体の形成および安定性を調節し得る化合物である、方法。
【請求項２５】
請求項１のポリペプチドの発現または活性を調節する因子を同定するための方法であって、該方法は、以下：
（ａ）該ポリペプチドを発現する細胞を提供する工程；
（ｂ）該因子と該細胞を接触させる工程；および
（ｃ）該因子により該ポリペプチドの発現または活性を調節するか否かを測定し、これによって、該ペプチドの発現または活性における改変が、該ポリペプチドの発現または活性を調節する因子を示す、工程；
を包含する、方法。
【請求項２６】
請求項１に記載のポリペプチドの活性を調節するための方法であって、該方法は、請求項１に記載のポリペプチドを発現する細胞サンプルを、該ポリペプチドの活性を調節するのに十分な量で該ポリペプチドに結合する化合物とを接触させる工程を包含する、方法。
【請求項２７】
ＮＯＶと関連する障害を処置または予防する方法であって、該方法が、そのような処置または予防が所望される被験体に、該被験体の該ＮＯＶと関連する障害を処置または予防するに十分な量で請求項１に記載のポリペプチドを投与する工程を包含する、方法。
【請求項２８】
前記被験体がヒトである、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
ＮＯＶと関連する障害を処置または予防する方法であって、該方法が、そのような処置ま

たは予防が所望される被験体に、該被験体の該ＮＯＶと関連する障害を処置または予防するに十分な量で請求項５に記載の核酸を投与する工程を包含する、方法。
【請求項３０】
前記被験体がヒトである、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
ＮＯＶと関連する障害を処置または予防する方法であって、該方法が、そのような処置または予防が所望される被験体に、該被験体の該ＮＯＶと関連する障害を処置または予防するに十分な量で請求項１５に記載の抗体を投与する工程を包含する、方法。
【請求項３２】
前記被験体がヒトである、請求項１５に記載の方法。
【請求項３３】
請求項１に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含有する、薬学的組成物。
【請求項３４】
請求項５に記載の核酸分子および薬学的に受容可能なキャリアを含有する、薬学的組成物。
【請求項３５】
請求項１５に記載の抗体および薬学的に受容可能なキャリアを含有する、薬学的組成物。
【請求項３６】
請求項３３に記載の薬学的組成物を１つ以上の容器に含む、キット。
【請求項３７】
請求項３４に記載の薬学的組成物を１つ以上の容器に含む、キット。
【請求項３８】
請求項３５に記載の薬学的組成物を１つ以上の容器に含む、キット。
【請求項３９】
ヒトの疾患、ＮＯＶと関連する障害から選択される疾患と関連する症候群を処置するための医薬品の製造における治療剤の使用であって、ここで、該治療剤が、ＮＯＶポリペプチド、ＮＯＶ核酸、およびＮＯＶ抗体からなる群から選択される、使用。
【請求項４０】
ＮＯＶと関連する障害に対する活性もしくは潜伏のモジュレーターまたは該障害の性質をスクリーニングするための方法であって、該方法が、以下：
（ａ）ＮＯＶと関連する障害に対する増加した危険性の試験動物に試験化合物を投与する工程であって、ここで、該試験動物は請求項１に記載のポリペプチドを組み換え発現する、工程；
（ｂ）工程（ａ）の該化合物を投与する工程の後に該試験動物中の該ポリペプチドの活性を測定する工程；および
（ｃ）該試験動物における該タンパク質の活性を、該ポリペプチドが投与されていないコントロール動物における該ポリペプチドの活性と比較する工程であって、ここで、該コントロール動物と比較した該試験動物中の該ポリペプチドの活性における変化は、該試験化合物がＮＯＶ関連障害の潜伏のモジュレーターまたは該障害の性質であることを示す、工程；
を包含する、方法。
【請求項４１】
請求項４０に記載の方法であって、ここで、前記試験動物が、野生型試験動物と比較して増加したレベルで、試験タンパク質導入遺伝子を発現するかまたはプロモーターの制御下で該導入遺伝子を発現する、組換え試験動物であり、ここで、該プロモーターは、該導入遺伝子のネイティブな遺伝子プロモーターではない、方法。
【請求項４２】
第１の哺乳動物被験体における請求項１に記載のポリペプチドの変化したレベルと関連する疾患の存在または該疾患の性質を決定するための方法であって、該方法が、以下：

（ａ）該第１の哺乳動物被験体由来のサンプル中の該ポリペプチドの発現レベルを測定する工程；および
（ｂ）工程（ａ）の該サンプル中の該ポリペプチドの量を、該疾患を有さないことが既知であるかまたは該疾患にかかりにくいことが既知の、第２の哺乳動物被験体由来のコントロールサンプル中に存在する該ポリペプチドの量と比較する工程であって、
ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の該第１の被験体における該ポリペプチドの発現レベルにおける変化が、該疾患の存在または該疾患の性質を示す、工程；
を包含する、方法。
【請求項４３】
第１の哺乳動物被験体における請求項５に記載の核酸分子の変化したレベルと関連する疾患の存在または該疾患の性質を決定するための方法であって、該方法が、以下：
（ａ）該第１の哺乳動物被験体由来のサンプル中の該核酸の量を測定する工程；および
（ｂ）工程（ａ）の該サンプル中の該核酸の量を、該疾患を有さないことが既知であるかまたは該疾患にかかりにくいことが既知の、第２の哺乳動物被験体由来のコントロールサンプル中に存在する該核酸の量と比較する工程であって、
ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の該第１の被験体における該核酸のレベルにおける変化が、該疾患の存在または該疾患の性質を示す、工程
を包含する、方法。
【請求項４４】
前記疾患が、癌のタイプである、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
配列番号１に記載の代替レベルまたはその改変体を使用して、肺癌の存在または該肺癌の性質を決定する、請求項４５に記載の方法。
【請求項４６】
配列番号４に記載の代替レベルまたはその改変体を使用して、前立腺癌の存在または該前立腺癌の性質を決定する、請求項４４に記載の方法。
【請求項４７】
哺乳動物において病理学的状態を処置する方法であって、該方法が、該病理状態を緩和するに十分な量でポリペプチドを該哺乳動物に投与する工程を包含し、ここで、該ポリペプチドが、配列番号２、５、および７の少なくとも１つのアミノ酸配列またはそれらの生物学的に活性なフラグメントを含むポリペプチドと少なくとも９５％同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドである、方法。
【請求項４８】
哺乳動物の病理学的状態を処置する方法であって、該方法が、該病理学的状態を緩和するに十分な量で請求項１５に記載の抗体を該哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
（発明の背景）
本発明は、一般的に、核酸およびそれによってコードされるポリペプチドに関する。より詳細には、本発明は、膜結合および分泌ポリペプチドをコードする核酸、ならびにこれらの核酸およびポリペプチドを産生するためのベクター、宿主細胞、抗体および組換え方法に関する。
【０００２】
（発明の要旨）
本発明は、ポリペプチドをコードする新規な核酸配列の発見に一部基づく。これらのポリペプチドおよびそれらの誘導体およびフラグメントをコードする核酸は、本明細書中以下で、総称して「ＮＯＶ」と表される。
【０００３】
１つの局面において、本発明は、小さなアクチン隔離ペプチドサイモシン－β－１０についてのポリペプチド配列に対して同一性を有するＮＯＶ１ポリペプチドをコードする単離

されたＮＯＶ１核酸分子を提供する。別の局面において、本発明は、ｅｐｈｒｉｎ型－Ａレセプター８に対して同一性を有するＮＯＶ２ポリペプチドをコードする単離されたＮＯＶ２核酸分子を提供する。なお別の局面において、本発明は、プロテオグリカンのファミリーに対して相同性を有するＮＯＶ３ポリペプチドをコードする単離されたＮＯＶ３核酸分子を提供する。

【０００４】

幾つかの実施形態において、ＮＯＶ核酸分子は、厳密な条件下で、核酸配列のタンパク質コード配列を含む核酸分子に対して相補的な核酸配列にハイブリダイズし得る。本発明にはまた、オリゴヌクレオチド、例えば、ＮＯＶ核酸（例えば、配列番号１、４、または６）の少なくとも６個の連続したヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド、またはこのオリゴヌクレオチドの相補体が含まれる。

【０００５】

本発明にはまた、実質的に精製されたＮＯＶポリペプチド（配列番号２、５、または７）が含まれる。本発明はまた、ＮＯＶポリペプチドに対して免疫選択的に結合する抗体を特徴とする。

【０００６】

別の局面において、本発明は、治療有効量または予防有効量の治療的かつ薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物を含む。この治療剤は、ＮＯＶ核酸、ＮＯＶポリペプチド、またはＮＯＶポリペプチドに対して特異的な抗体であり得る。さらなる局面において、本発明は、１以上の容器中に、治療有効量または予防有効量のこの薬学的組成物を含む。

【０００７】

さらなる局面において、本発明は、ＤＮＡによってコードされるＮＯＶポリペプチドの発現を可能にする条件下で、ＮＯＶ核酸を含む細胞を培養することによってポリペプチドを産生する方法を包含する。所望の場合、ＮＯＶポリペプチドは、回収され得る。

【０００８】

別の局面において、本発明は、サンプル内のＮＯＶポリペプチドの存在を検出する方法を包含する。この方法において、サンプルは、ポリペプチドとこの化合物との間の複合体の形成を可能にする条件下で、ポリペプチドに選択的に結合する化合物と接触される。この複合体は検出され、存在する場合、それによって、サンプル内のＮＯＶポリペプチドを同定する。

【０００９】

本発明にはまた、サンプルをＮＯＶ核酸プローブまたはプライマーと接触させることによって、サンプル中のＮＯＶ核酸分子の存在を検出する方法、および核酸プローブまたはプライマーがサンプル中のＮＯＶ核酸分子に結合したかどうかを検出する方法が包含される。

【００１０】

さらなる局面において、本発明は、ＮＯＶポリペプチドを含む細胞サンプルを、このポリペプチドの活性を調節するのに十分な量のＮＯＶポリペプチドに結合する化合物と接触させることによって、ＮＯＶポリペプチドの活性を調節するための方法を提供する。この化合物は、本明細書中にさらに記載されるように、例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、糖質、脂質または他の有機分子（炭素を含む）もしくは無機分子のような低分子であり得る。

【００１１】

本発明の範囲にはまた、以下の好ましい実施形態に概略された障害または症候群を処置または防止するための医薬の製造における治療剤の使用がある。この治療剤は、例えば、ＮＯＶ核酸、ＮＯＶポリペプチド、またはＮＯＶ特異的抗体、もしくはそれらの生物学的に活性な誘導体もしくはフラグメントであり得る。

【００１２】

好ましい実施形態において、本発明は、障害または症候群のモジュレーターをスクリーニ

ングするための方法をさらに包含し、これらの障害または症候群として、例えば、胸腺免疫細胞の発生、分化、および活性に関する障害または症候群；精子形成および男性不妊症に関する症状；幾つかのヒト新形成の診断；赤血球および血小板のような血液循環内の細胞の疾患または症状；神経性症状、心臓症状および血管症状；慢性関節リウマチ；先天性筋肉異常行動；種々の筋肉障害；固定した奇形（関節拘縮）；小細胞肺癌ＮＣＩ－Ｈ２３；前立腺癌；および異常白質が挙げられる。この方法は、試験化合物をＮＯＶポリペプチドと接触させる工程、および試験化合物がＮＯＶポリペプチドに結合するかどうかを決定する工程、を包含する。試験化合物のＮＯＶポリペプチドへの結合は、試験化合物が上記の障害もしくは症候群に対する活性、または潜伏もしくは素因のモジュレーターであることを示す。

【００１３】

本発明の範囲には、上記の障害または症候群について増加した危険性にある試験動物に、試験化合物を投与することによって、上に列挙した障害または症候群に対する活性、または潜伏もしくは素因のモジュレーターについてスクリーニングするための方法がある。試験動物は、ＮＯＶ核酸によってコードされる組換えポリペプチドを発現する。次いで、ＮＯＶポリペプチドを組換え発現し、障害または症候群についての増加した危険性を有しないコントロール動物中のタンパク質の発現または活性と同様に、ＮＯＶポリペプチドの発現または活性を測定した。次に、試験動物およびコントロール動物の両方におけるＮＯＶポリペプチドの発現が比較される。コントロール動物に対する試験動物におけるＮＯＶポリペプチドの活性の変化は、この試験化合物が障害または症候群のモジュレーターであることを示す。

【００１４】

なお別の局面において、本発明は、被験体（例えば、ヒト被験体）におけるＮＯＶポリペプチド、ＮＯＶ核酸、または両方の変更したレベルに関連した疾患に対する素因の存在を決定するための方法を含む。この方法は、被験体からの試験サンプル中のＮＯＶポリペプチドの量を測定する工程、およびコントロールサンプル中に存在するＮＯＶポリペプチドの量に対して試験サンプル中のポリペプチドの量を比較する工程を包含する。コントロールサンプルと比較した試験サンプル中のＮＯＶポリペプチドのレベルの変動は、被験体の疾患に対する素因の存在を示す。好ましくは、この素因は、上記の好ましい実施形態に列挙された素因を含む。

【００１５】

さらなる局面において、本発明は、病理学的状態を緩和または防止するのに十分な量で、ＮＯＶポリペプチド、ＮＯＶ核酸、またはＮＯＶ特異的抗体を被験体（例えば、ヒト被験体）に投与することによって哺乳動物の障害に関する病理学的状態を処置または防止する方法を含む。

【００１６】

他に規定されない限り、本明細書中で使用される全ての学術用語および科学用語は、本発明が属する当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載されるものと同じまたは等価な方法および物質は、本発明の実施または試験に使用され、適切な方法および物質が以下に記載される。本明細書中で言及される全ての公報、特許出願、特許、および他の引用文献は、全体を通して、参考として援用される。矛盾する場合、本明細書（定義を含む）は、調整する。さらに、物質、方法、および実施例は、単に例示の目的に過ぎず、任意の様式で制限することを意図しない。本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。

【００１７】

（発明の詳細な説明）

本発明は、新規なヌクレオチドおよびそれらによってコードされるポリペプチドを提供する。本発明には、新規な核酸配列およびそれらのポリペプチドが含まれる。この配列は、総称して「ＮＯＶ核酸」または「ＮＯＶポリヌクレオチド」とよばれ、対応するコードされたポリペプチドは、「ＮＯＶポリペプチド」または「ＮＯＶタンパク質」と呼ばれる。

他に示されない限り、「ＮＯＶ」は、本明細書中に開示される新規な配列のいずれかをさすことを意味する。表１１は、ＮＯＶ核酸およびそれらのコードされたポリペプチドの要約を提供する。

【００１８】

ＮＯＶ核酸およびそれらのコードされたポリペプチドは、種々の適用および状況において有用である。本発明に従う種々のＮＯＶ核酸およびポリペプチドは、前に記載されたタンパク質に対してドメイン関連性および配列関連性の存在に従うタンパク質ファミリーの新規なメンバーとして有用である。

【００１９】

例えば、ＮＯＶ１は、タンパク質のサイモシンβ１０ファミリーのメンバーに対して相同性である。結果として、ＮＯＶ１は、本明細書中に記載されるような種々のマーカー有用性を有する。また、ＮＯＶ１は、胸腺免疫細胞の発生、分化、および活性化に関する状態の処置；精子形成および男性不妊症に関連する症状の処置；幾つかのヒト新形成の診断；赤血球および血小板のような血液循環内の細胞の疾患または症状の処置；および小細胞肺癌の検出；において効力を有する。ＮＯＶ２は、ｅｐｈｒｉｎ　Ａレセプターファミリーのメンバーに対して相同性である。結果として、ＮＯＶ２は、本明細書中に記載されるような種々のマーカー有用性を有する。ＮＯＶ２は、神経性症状、心臓症状および血管症状に関する状態の処置において効力を有する。ＮＯＶ２はまた、前立腺癌の検出において有用性を有する。ＮＯＶ３は、プロテオグリカンファミリーのメンバーに対して相同性である。結果として、ＮＯＶ３は、本明細書中に記載されるような種々のマーカー有用性を有する。ＮＯＶ３はまた、慢性関節リウマチ；先天性筋肉異常行動；種々の筋肉障害；固定した奇形（関節拘縮）；および異常白質に関する状態の処置において効力を有する。本発明に従うＮＯＶ核酸およびポリペプチドについてのさらなる有用性はまた、本明細書中に開示される。

【００２０】

（ＮＯＶ１）

本発明に従うＮＯＶ１核酸配列は、小アクチン隔離ペプチドサイモシン－β－１０に関するポリペプチドをコードする核酸を含む。この核酸およびそのコードされたポリペプチドの例は、表１に示される。開示された核酸（配列番号１）は、４３０ヌクレオチド長であり、そしてヌクレオチド６１～６３のＡＴＧ開始コドンで開始し、ヌクレオチド２３５～２３７のＴＡＧ終止コドンで終結するオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含む。

【００２１】

代表的なＯＲＦは、５８アミノ酸ポリペプチド（配列番号２）を含み、表１で下線が引かれた、推定の上流非翻訳領域および下流非翻訳領域によって隣接される。このコードされたポリペプチドは、ヒト由来のサイモシンβ１０と高度な相同性（およそ８５％の同一性）を有する（表２）。タンパク質ファミリーおよびドメインのＰＲＯＳＩＴＥデータベースのサーチは、ＮＯＶ１ポリペプチドがサイモシンβファミリーのメンバーであることを確証し、これは、サイモシンβタンパク質の中央部分に位置する、以下：

【００２２】

【化１】

K-L-K-K-T-[EまたはN]-T-[QまたはE]-E-K-N（配列番号　3）

の１１の高度に保存されたアミノ酸残基の伸長（ｓｔｒｅｔｃｈ）を含むポリペプチドによって規定される（表２）。ＰＲＯＳＩＴＥデータベースは、新規な配列が属する公知のタンパク質ファミリーに対して確実に同一となることを助ける生物学的に重要な部位、パターンおよびプロファイルからなる。

【００２３】

さらに、ＰＦＡＭデータベースのサーチは、ＮＯＶ１ポリペプチドが、タンパク質のサイモシンβファミリーの配列プロファイルに従うことを明らかにする（表３）。この表の照会配列は、ＮＯＶ１ポリペプチドであり、この対象は、タンパク質のサイモシンβファミリーから形成されたコンセンサス配列である。ここで開示されるＮＯＶ１ポリペプチドは、コンセンサスサイモシンβ配列に対して、その全長にわたって８４％の同一性を有する（表４）。ＮＯＶ１ポリペプチドは、ファミリーの多くの他のメンバーより、コンセンサスサイモシンβ配列に対してより相同性を有する。また、ＮＯＶ１ポリペプチドとサイモシンβコンセンサスとの間のこの程度の相同性（長さおよび複雑性の両方の点で）は、変動単独によって起こったという見込みはほとんどない（表３の期待値は、変動による５×10^{10}中１未満である）。Ｐｆａｍは、多くの共通のタンパク質ドメインファミリーをカバーするＭａｒｋｏｖモデルを含む複数の配列アラインメントおよびプロファイルの大きな収集である。それは、相同性を決定するための正確かつ総合的な方法であるように設計される。サイモシン－βファミリーの複数のアラインメントは、表３に示される。サイモシン－β－１０タンパク質に対するその関連性に基づいて、ＮＯＶ１タンパク質は、アクチン隔離タンパク質ファミリーの新規なメンバーである。

【００２４】

チモシンβは、アクチンを隔離しそして細胞中のアクチン動力学を制御する、構造的に関連する高度に保存された酸性ポリペプチドのファミリーを含む。胚形成の間、アクチン重合の制御が、細胞の移動、抗脈管形成および神経発生のようなプロセスにおいて必須である。アクチンフィラメントの直接の可視化および定量により、チモシンβが、アゴニストのように、エキソサイトーシスが生じる頂端膜でアクチン脱重合を誘導したことが示された（Ｍｕａｌｌｅｍ　Ｓ．、Ｋｗｉａｔｋｏｗｓｋａ　Ｋ、Ｘｕ　Ｘ、Ｙｉｎ　ＨＬ、Ｊ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ　１９９５　Ｆｅｂ；１２８（４）：５８９～９８）。チモシンβ－１０は、哺乳動物組織（神経系を含む）において広範に分布し、そしてラット前脳の種々の領域（海馬、新皮質およびいくつかの脳核を含む）におけるこの転写産物の存在は、ニューロンにて生じるアクチン動力学の制御においてチモシンβ－１０の関与についての証拠を提供する。チモシンβ－１０は、胚性組織および発生中の組織において比較的高レベルで発現され（Ｈａｌｌ　ＡＫ　Ｃｅｌｌ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　Ｒｅｓ　１９９５；４１（３）：１６７～８０）、そしてチモシンβ－１０がアクチン重合の阻害に関与するならば、チモシンβ－１０タンパク質様タンパク質は初期発生において重要な役割を果たし得る。

【００２５】

チモシンβ－１０をコードする同様の分子量のｍＲＮＡ種が、ラットのほとんどの組織において見出される；しかし、ＬｉｎおよびＭｏｒｒｉｓｏｎ－Ｂｏｇｏｒａｄ（Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．１９９１　Ｄｅｃ　５；２６６（３４）２３３４７－５３）は、性的に成熟したラットの精巣において高分子量のさらなるチモシンβ－１０　ｍＲＮＡを同定した。後者のｍＲＮＡは、その５’非翻訳領域（翻訳開始コドンの１４ヌクレオチド上流で始まる）においてのみ遍在形態と異なる。この知見は、プライマーエクステンション実験と合わせると、この２つのｍＲＮＡ型は、差次的プロモーター利用および選択的スプライシングの組み合わせを介して同じ遺伝子から転写されることを示唆した。両方のｍＲＮＡは、パキテン期精母細胞に存在し；精巣特異的ｍＲＮＡのみが、後減数期ハプロイド精子細胞において検出された。免疫組織化学分析により、このタンパク質が、分化中の精子細胞に存在することが示された。このことは、この精巣特異的チモシンβ－１０　ｍＲＮＡが、ハプロイド雄性生殖細胞において翻訳されることを示唆する。特異的抗体を使用する免疫ブロット分析により、成体精巣において合成されるチモシンβ－１０タンパク質が、脳において合成されるものとサイズが同一であることが示された。

【００２６】

チモシンβ－１０タンパク質はまた、リンパ球のいくつかの特性（環状ヌクレオチドレベル、移動阻害因子産生、Ｔ依存性抗体産生、ならびに種々の細胞表面成熟／分化マーカーの発現を含む）に影響する（Ｂｏｄｅｙ　Ｂ、Ｂｏｄｅｙ　Ｂ　Ｊｒ、Ｓｉｅｇｅｌ　Ｓ

Ｅ、Ｋａｉｓｅｒ ＨＥ、Ｉｎｔ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｐｈａｒｍａｃｏｌ ２０００ Ａｐｒ；２２（４）：２６１～７３）。これらおよび他の観察は、チモシンβ－１０が、（ａ）おそらくアクチン媒介性腫瘍サプレッサーとして作用することにより、アポトーシスを制御する細胞プロセスにおいて重要かつおそらく必須の役割を果し、（ｂ）胚形成の間に新アポトーシス影響因子（ｉｎｆｌｕｅｎｃｅ）として機能し、そして（ｃ）レチノイドのプロアポトーシス抗癌作用のいくつかを媒介し得ることを示唆する。チモシンβ－１０ ｍＲＮＡはまた、種々の腫瘍および腫瘍細胞株において豊富である。

【００２７】

チモシンβ－１０遺伝子過剰発現は、ヒト発癌現象における一般的事象である。ヒトの結腸癌、種々の組織型の生殖細胞腫瘍、乳癌、卵巣癌、子宮癌、結腸および食道の癌細胞株におけるチモシンβ－１０ ｍＲＮＡレベルの分析はすべて、チモシンβ－１０が、各正常組織と比較してこれら新形成組織および細胞株のすべてにおいて過剰発現されたことを示した。従って、チモシンβ－１０様発現の検出は、いくつかのヒト新形成の診断のための可能な道具と見なされ得る（Ｓａｎｔｅｌｌｉ Ｇ、Ｃａｌｉｆａｎｏ Ｄ、Ｃｈｉａｐｐｅｔｔａ Ｇ、Ｖｅｎｔｏ ＭＴ、Ｂａｒｔｏｌｉ ＰＣ、Ｚｕｌｌｏ Ｆ、Ｔｒａｐｐａｓｏ Ｆ、Ｖｉｇｌｉｅｔｔｏ Ｇ、Ｆｕｓｃｏ Ａ、Ａｍ Ｊ Ｐａｔｈｏｌ １９９９ Ｓｅｐ；１５５（３）：７９９～８０４）。チモシンβ－１０のようなチモシンが、新形成の早期検出および診断のために使用され得るだけでなく、胸腺ホルモンの（主にチモシンの）誘導体もまた、最近の臨床試験において、新形成の処置を補助するために使用されている（Ｂｏｄｅｙ Ｂ、Ｂｏｄｅｙ Ｂ Ｊｒ、Ｓｉｅｇｅｌ ＳＥ、Ｋａｉｓｅｒ ＨＥ、Ｉｎｔ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｐｈａｒｍａｃｏｌ．２０００ Ａｐｒ；２２（４）：２６１～７３）。胸腺ホルモンは、免疫不全、自己免疫疾患、および新形成悪性疾患において免疫調節因子の効果を強める。併用型の化学－免疫療法的抗癌処置は、化学療法単独よりも有効であるようであり、そしてほとんどの化学療法臨床試験に関係する重要な造血毒性が、免疫療法の付加により有意に減少され得る。

【００２８】

チモシンβ－１０タンパク質への関連性に基づいて、このＮＯＶ１タンパク質は、アクチン隔離（ｓｅｑｕｅｓｔｅｒｉｎｇ）タンパク質ファミリーの新規なメンバーである。チモシンβ－１０に関連する分子の発見は、チモシンβ－１０様タンパク質のメンバーの発現における変化に関係する障害の処置において有用な、新規な診断組成物もしくは治療組成物を提供することにより、当該分野における需要を満たす。本発明の核酸、ポリペプチド、抗体および他の組成物は、種々の疾患および病理（非限定的例として、胸腺免疫細胞の発生、分化および活性化に関与する疾患および病理、精子形成および雄性不妊に関連する病理、いくつかのヒト新形成の診断、ならびに血液循環における細胞（例えば、赤血球および血小板）の疾患もしくは病理が挙げられる）において有用である。

【００２９】

ＮＯＶ１核酸は、特定の細胞型を検出するために有用である。例えば、本発明に従うＮＯＶ１核酸の改変体スプライス形態が、後減数期ハプロイド精子細胞において種々のレベルで存在し得る。また、本発明により、ＮＯＶ１核酸の発現は、他の組織型から発生中の組織および胚性組織を同定する際に有用性を有する。チモシンβ－１０ ｍＲＮＡは、種々の腫瘍および腫瘍細胞株において過剰発現される。チモシンβ－１０様核酸（例えば、ＮＯＶ１）の発現レベルもまた、種々の細胞表面／分化マーカーの発現がチモシンβ－１０様タンパク質（例えば、ＮＯＶ１ポリペプチド）により影響されるならば、Ｔ細胞型を区別する際に有用である。ＮＯＶ１核酸は、特定の癌細胞株（特に、非小細胞肺癌ＮＣＩ－Ｈ２３）において増強した発現を有するが、対応する正常組織由来の細胞株においては増強した発現を有さず；従って、ＮＯＶ１核酸は、このような組織における癌特異的マーカーとして有用である（実施例１）。

【００３０】

チモシンβ－１０関連タンパク質がアクチンを隔離し得そして細胞におけるアクチン動力学を調節し得るならば、ＮＯＶ１ポリペプチドに関連するタンパク質は、アクチンの重合

またはアクチン－チモシンβ－１０複合体の形成もしくは安定性を調節し得る試験化合物についてスクリーニングする際に有用である。最後に、胸腺ホルモンは、免疫不全、自己免疫疾患、および新形成悪性疾患における免疫調節因子の効果を強めるので、ＮＯＶ１関連タンパク質は、併用型化学－免疫療法的抗癌処置において使用され得る。

【００３１】

（表１）

（本発明に従うチモシンβ－１０様タンパク質をコードする代表的ｃＤＮＡ配列）

推定非翻訳領域に下線を付す。開始コドンおよび終止コドンは太字である。

【００３２】

【化２】

GCCAGCAGGAGTGCCATGGTGAGAGGCACTGGCAGGGAATGCTAGGATTGTTTTAAGAAAATGGCAGACAAACCAGACATAGGG
GAAATCGCCAGCTTCAATAAGGCCAAGCTGAAGAAAACAGAGATGCAGGAGAACACCCTGCTGACCAAAGAGGCCATTGAGCAG
GAGAAGCGGGTGAAATTTCCTAAGAGCCTGGAGGATTCCCTACCCCTGTCATCTTCGAGACCCCAGTAGTAATGTGGAGGAAGA
ATCACCACAAGATGGACACAAGCCACAAACTGTGACGTGAACCTGGGCACTCCGTGCTGATGCCACCAGCCTGAGGGTCCCTAT
GGGTCCAATCAGACTGCCAAATTCTCTGGTTTGCCCTGGGATATTATAGAAAATTATTTGCGTGAATAATGAAAACACAGCTCA
TGGCAAAAAA

（配列番号１）。

【００３３】

（本発明に従うチモシンβ－１０様タンパク質の代表的アミノ酸配列）

【００３４】

【化３】

MADKPDIGEIASFNKAKLKKTEMQENTLLTKEAIEQEKRVKFPKSLEDSLPLSSSRPQ

（配列番号２）。

【００３５】

（表２）

（ＮＯＶ１ポリペプチドとヒト由来のチモシンβ－１０との間の比較）

【００３６】

【化４】

```
>gb|AAA36746.1| (M92383) thymosin beta-10 [Homo sapiens]
          Length = 49

 Score = 84.5 bits (192), Expect = 3e-16
 Identities = 34/40 (85%), Positives = 36/40 (90%), Gaps = 1/40 (2%)

NOV1 : 1  MADKPDIGEIASFNKAKLKKTEMQE-NTLLTKEAIEQEKR 39
          ||||||+||||||+|||||||| || ||| ||| ||||||

Sbjct: 6  MADKPDMGEIASFDKAKLKKTETQEKNTLPTKETIEQEKR 45
```

。

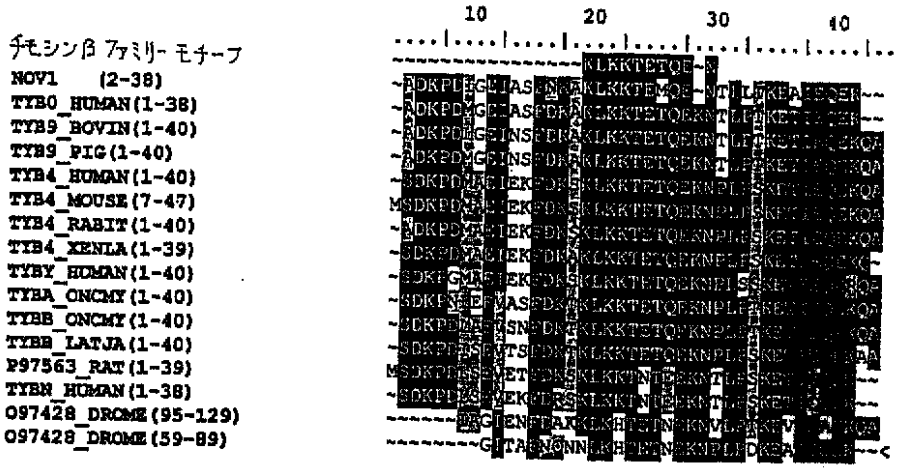
【００３７】

（表３）

（ＮＯＶ１ポリペプチドとチモシンβファミリーの多重配列アラインメント）　（黒で輪郭をとられているアミノ酸は、潜在的保存配列領域を示す；灰色塗りしてあるアミノ酸は、保存的に置換されたアミノ酸を示す；そして強調されていないアミノ酸は、広範囲の代替的アミノ酸残基への変異が生じる位置を示す。配列は、ＳＷＩＳＳＰＲＯＴもしくはＴＲＥＭＢＬ　ＩＤにより参照され得る）

【００３８】

【化５】



。

【００３９】

（表４）

チモシンβファミリーのコンセンサス配列に対するＮＯＶ１ポリペプチドのＰＦＡＭアラインメント）

【００４０】

【化６】

```
>PD005116 (Closest domain: TYB0_HUMAN 1-38)
Number of sequences in family: 16
Most frequent protein names:   TYB4(4) TYB9(2) TYBB(2)
Commentary (automatic):
          THYMOSIN ACETYLATION T-CELL DIFFERENTIATION
          IMMUNOPOTENTIATION THYMUS BETA-4 ACTIN-BINDING PROTEIN
          BETA
          Length = 38
  Score = 145  (60.9 bits), Expect = 5e-10
 Identities = 32/38 (84%), Positives = 34/38 (89%), Gaps = 1/38 (2%)

NOV1:     2 ADKPDIGEIASFNKAKLKKTEMQE-NTLLTKEAIEQEK 38
            |||||+|||||||+|||||||| || ||| ||| |||||
Sbjct:    1 ADKPDMGEIASFDKAKLKKTETQEKNTLPTKETIEQEK 38
```

（ＮＯＶ２）

本発明に従うＮＯＶ２核酸は、エフリン（ｅｐｈｒｉｎ）Ａ型レセプターに関連するポリペプチドをコードする核酸を含む。核酸およびそのコードされたポリペプチドの例は、表５に示される。開示される核酸（配列番号４）は、３０１８ヌクレオチド長であり、そしてヌクレオチド１～３のＡＴＧ開始コドンで開始し、そしてヌクレオチド２９７４～２９７６で終止するオープンリーディングフレームを含む。

【００４１】

代表的なＯＲＦは、９９２アミノ酸ポリペプチド（配列番号５）を含む。コードされるポリペプチドは、マウスエフリンＡ型レセプター８前駆体と高度の相同性（約９５％同一性）を有する（表６）（ＳＷＩＳＳＰＲＯＴ　ＡＣＣ：Ｏ０９１２７、１００５残基中９５６残基）。ＮＯＶ２ポリペプチドもまた、エフリンレセプターＥｐｈＡ８として公知のヒトｅｐｈおよびｅｌｋ関連キナーゼに対してなお高度の相同性（１００％同一性）を有する（表６Ａ、Ｃｈａｎら（１９９１）Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　６、１０５７～１０６１に開示される部分配列；全長ヒトエフリンレセプターＥｐｈＡ８全長配列は、登録番号ＮＰ＿０６５３８７．１として２０００年９月１４日にＧｅｎｂａｎｋに預けられた）。類似のタンパク質との多重アラインメントは、マウス由来のエフリンレセプター（ＥＰＡ８＿マウ

ス）、ヒト由来のエフリンレセプター（ＥＰＡ５＿ヒト）、およびニワトリ由来のエフリンレセプター（ＥＰＡ５＿ニワトリ）に対する匹敵する程度の類似性を示した（表７）。推定細胞外ドメインにおいて、システインリッチな領域およびタンデムフィブロネクチンＩＩＩ型反復が存在する一方、触媒ドメインが細胞内ドメインに存在する。これらの特徴は、Ｅｐｈファミリーの他のメンバーと一致する。その関連性に基づいて、ＮＯＶ２タンパク質は、エフリンＡ型レセプターチロシンタンパク質キナーゼファミリーのメンバーである。

【００４２】

これらのＥｐｈレセプターは、レセプタータンパク質チロシンキナーゼの最も大きな公知のファミリーを構成する。これらは、発生事象（特に神経系において）を媒介することに関連している。Ｅｐｈサブファミリーにおけるレセプターは、代表的には、単一のキナーゼドメインならびに、Ｃｙｓリッチドメインと２つのフィブロネクチンＩＩＩ型反復とを含む細胞外領域を有する。これらのレセプターは、そのリガンド（エフリンと呼ばれる）とともに、神経発生、新脈管形成、および脈管ネットワークアセンブリにおいて重要な役割を果す（Ｃｈｏｉ　Ｓ、Ｊｅｏｎｇ　Ｊ、Ｋｉｍ　Ｔ、Ｐａｒｋ　Ｓ．、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌｓ　９（４）４４０～４５（１９９９））。

【００４３】

エフリンＡ型レセプター８（ＥＣ２．７．１．１１２）（チロシンタンパク質キナーゼレセプターｅｅｋ）（ｅｐｈおよびｅｌｋ関連キナーゼ）（フラグメント）は、遺伝子ｅｐｈ８もしくはｅｅｋの遺伝子産物として示される。これは、Ｉ型膜結合レセプターであり、その機能は、エフリン－ａファミリーのメンバーのレセプターとして作用することである。その触媒活性は、タンパク質チロシンキナーゼとして、適切な標的タンパク質中のチロシンをリン酸化することである。これは、触媒ドメインにおいて他のタンパク質チロシンキナーゼと類似し、そしてエフリンレセプターファミリーに属する。

【００４４】

Ｅｐｈレセプターは、チロシンキナーゼ活性を有し、そしてそのエフリンリガンドとともに、遊走細胞および神経成長円錐を特定の目的地に導く、相反機構に関与する接触依存性細胞相互作用を媒介する。Ｅｐｈレセプターおよびエフリンは、胚形成の間に多くの組織において相補的発現を有するので、Ｅｐｈレセプターの二方向性活性化が、それらの発現ドメインの境界面（例えば、脊椎動物菱脳における分節（ｓｅｇｍｅｎｔ）境界）にて生じ得る。実際、Ｅｐｈレセプターは、神経系の発生および新脈管形成において重要な役割を果す。神経系において、それらは、遊走細胞と成長する軸索との相反に関する機構を使用することにより、位置情報を提供する（Ｆｒｉｓｅｎら、ＥＭＢＯ　Ｊ．１８（１９）５１５９～５１６５）。また、Ｅｐｈレセプターおよびエフリンの重要な機能は、細胞接触依存性相反を媒介することである。

【００４５】

本発明に従うＮＯＶ２配列は、ＧＰＩ固定エフリンＡリガンドを発現する細胞を検出するために有用である。例えば、ＮＯＶ２核酸もしくはＮＯＶ２タンパク質のいずれかを発現する細胞は、ＧＰＩ固定エフリンＡリガンドまたはその模倣物を発現する他の細胞についてのスクリーニングの際において有用性を有する。結果として、ＮＯＶ２配列は、細胞上で発現される新規なエフリンＡリガンドについてスクリーニングするために有用である。ＮＯＶ２は、多くの外科的腫瘍サンプル、特に前立腺癌において、高度に発現されるが、すぐ隣接する正常組織においては最小限に発現されるかまたは検出可能に発現されず；従って、ＮＯＶ２発現は、特定の癌、特に前立腺癌についてのマーカーとして使用され得る（実施例１）。

【００４６】

また、本発明に従うＮＯＶ２配列は、動脈と静脈との間の境界を調節することにより、神経系の発生および新脈管形成を指令するために有用である。例えば、ＮＯＶ２配列に類似する欠損Ｅｐｈレセプターを発現するマウスは、新脈管形成が欠損しそして妊娠中期で死ぬことが示された（Ｗａｎｇら、１９９８、Ｃｅｌｌ　９３、７４１～７５３）。本発明

のタンパク質は、種々の疾患および病理（非限定的例として、神経学的病理、心臓病理および脈管病理に関する疾患および病理が挙げられる）において有用である。

【００４７】

（表５）

（本発明のエフリンＡ型レセプター８様タンパク質をコードする代表的ＤＮＡ配列）

【００４８】

【化７】

ATGGCCCCCGCCCGGGGCCGCCTGCCCCCTGCGCTCTGGGTCGTCACGGCCGCGGCGGCGGCGCCACCT
GCGTGTCCGCGGCGCGCGGCGAAGTGAATTTGCTGGACACGTCGACCATCCACGGGGACTGGGGCTGGCT
CACGTATCCGGCTCATGGGTGGGACTCCATCAACGAGGTGGACGAGTCCTTCCAGCCCATCCACACGTAC
CAGGTTTGCAACGTCATGAGCCCCAACCAGAACAACTGGCTGCGCACGAGCTGGGTCCCCCGAGACGGCG
CCCGGCGCGTCTATGCTGAGATCAAGTTTACCCTGCGCGACTGCAACAGCATGCCTGGTGTGCTGGGCAC
CTGCAAGGAGACCTTCAACCTCTACTACCTGGAGTCGGACCGCGACCTGGGGGCCAGCACACAAGAAAGC
CAGTTCCTCAAAATCGACACCATTGCGGCCGACGAGAGCTTCACAGGTGCCGACCTTGGTGTGCGGCGTC
TCAAGCTCAACACGGAGGTGCGCAGTGTGGGTCCCCTCAGCAAGCGCGGCTTCTACCTGGCCTTCCAGGA
CATAGGTGCCTGCCTGGCCATCCTCTCTCTCCGCATCTACTATAAGAAGTGCCCTGCCATGGTGCGCAAT
CTGGCTGCCTTCTCGGAGGCAGTGACGGGGGCCGACTCGTCCTCACTGGTGGAGGTGAGGGGCCAGTGCG
TGCGGCACTCAGAGGAGCGGGACACACCCAAGATGTACTGCAGCGCGGAGGGCGAGTGGCTCGTGCCCAT
CGGCAAATGCGTGTGCAGTGCCGGCTACGAGGAGCGGCGGGATGCCTGTGTGGCCTGTGAGCTGGGCTTC
TACAAGTCAGCCCCTGGGGACCAGCTGTGTGCCCGCTGCCCTCCCCACAGCCACTCCGCAGCTCCAGCCG
CCCAAGCCTGCCACTGTGACCTCAGCTACTACCGTGCAGCCCTGGACCCGCCGTCCTCAGCCTGCACCCG
GCCACCCTCGGCACCAGTGAACCTGATCTCCAGTGTGAATGGGACATCAGTGACTCTGGAGTGGGCCCCT
CCCCTGGACCCAGGTGGCCGCAGTGACATCACCTACAATGCCGTGTGCCGCCGCTGCCCCTGGGCACTGA
GCCGCTGCGAGGCATGTGGGAGCGGCACCCGCTTTGTGCCCCAGCAGACAAGCCTGGTGCAGGCCAGCCT
GCTGGTGGCCAACCTGCTGGCCCACATGAACTACTCCTTCTGGATCGAGGCCGTCAATGGCGTGTCCGAC
CTGAGCCCCGAGCCCCGCCGGGCCGCTGTGGTCAACATCACCACGAACCAGGCAGCCCCGTCCCAGGTGG
TGGTGATCCGTCAAGAGCGGGCGGGGCAGACCAGCGTCTCGCTGCTGTGGCAGGAGCCCGAGCAGCCGAA
CGGCATCATCCTGGAGTATGAGATCAAGTACTACGAGAAGGACAAGGAGATGCAGAGCTACTCCACCCTC
AAGGCCGTCACCACCAGAGCCACCGTCTCCGGCCTCAAGCCGGGCACCCGCTACGTGTTCCAGGTCCGAG
CCCGCACCTCAGCAGGCTGTGGCCGCTTCAGCCAGGCCATGGAGGTGGAGACCGGGAAACCCCGGCCCCG
CTATGACACCAGGACCATTGTCTGGATCTGCCTGACGCTCATCACGGGCCTGGTGGTGCTTCTGCTCCTG
CTCATCTGCAAGAAGAGGCACTGTGGCTACAGCAAGGCCTTCCAGGACTCGGACGAGGAGAAGATGCACT
ATCAGAATGGACAGGCACCCCCACCTGTCTTCCTGCCTCTGCATCACCCCCCGGGAAAGCTCCCAGAGCC
CCAGTTCTATGCGGAACCCCACACCTACGAGGAGCCAGGCCGGGCGGGCCGCAGTTTCACTCGGGAGATC
GAGGCCTCTAGGATCCACATCGAGAAAATCATCGGCTCTGGAGACTCCGGGGAAGTCTGCTACGGGAGGC
TGCGGGTGCCAGGGCAGCGGGATGTGCCCGTGGCCATCAAGGCCCTCAAAGCCGGCTACACGGAGAGACA
GAGGCGGGACTTCCTGAGCGAGGCGTCCATCATGGGGCAATTCGACCATCCCAACATCATCCGCCTCGAG
GGTGTCGTCACCCGTGGCCGCCTGGCAATGATTGTGACTGAGTACATGGAGAACGGCTCTCTGGACACCT
TCCTGAGGACCCACGACGGGCAGTTCACCATCATGCAGCTGGTGGGCATGCTGAGAGGAGTGGGTGCCGG
CATGCGCTACCTCTCAGACCTGGGCTATGTCCACCGAGACCTGGCCGCCCGCAACGTCCTGGTTGACAGC
AACCTGGTCTGCAAGGTGTCTGACTTCGGGCTCTCACGGGTGCTGGAGGACGACCCGGATGCTGCCTACA
CCACCACGGGCGGGAAGATCCCCATCCGCTGGACGGCCCCAGAGGCCATCGCCTTCCGCACCTTCTCCTC
GGCCAGCGACGTGTGGAGCTTCGGCGTGGTCATGTGGGAGGTGCTGGCCTATGGGGAGCGGCCCTACTGG
AACATGACCAACCGGGATGTGATCAGCTCTGTGGAGGAGGGGTACCGCCTGCCCCGCACCCATGGGCTGCC
CCCACGCCCTGCACCAGCTCATGCTCGACTGTTGGCACAAGGACCGGGCGCAGCGGCCTCGCTTCTCCCA
GATTGTCAGTGTCCTCGATGCGCTCATCCGCAGCCCTGAGAGTCTCAGGGCCACCGCCACAGTCAGCAGG
TGCCCACCCCCTGCCTTCGTCCGGAGCTGCTTTGACCTCCGAGGGGGCAGCGGTGGCGGTGGGGGCCTCA
CCGTGGGGGACTGGCTGGACTCCATCCGCATGGGCCGGTACCGAGACCACTTCGCTGCGGGCGGATACTC
CTCTCTGGGCATGGTGCTACGCATGAACGCCCAGGACGTGCGCGCCCTGGGCATCACCCTCATGGGCCAC
CAGAAGAAGATCCTGGGCAGCATTCAGACCATGCGGGCCCAGCTGACCAGCACCCAGGGGCCCCGCCGGC
ACCTCTGA

（配列番号４）。

【００４９】

（本発明のエフリンＡ型レセプター８様タンパク質の代表的アミノ酸配列）

【００５０】

【化８】

MAPARGRLPPALWVVTAAAAAATCVSAARGEVNLLDTSTIHGDWGWLTYPAHGWDSINEVDESFQPIHTYQVCNVMSPNQNNWL
RTSWVPRDGARRVYAEIKFTLRDCNSMPGVLGTCKETFNLYYLESDRDLGASTQESQFLKIDTIAADESFTGADLGVRRLKLNT
EVRSVGPLSKRGFYLAFQDIGACLAILSLRIYYKKCPAMVRNLAAFSEAVTGADSSSLVEVRGQCVRHSEERDTPKMYCSAEGE
WLVPIGKCVCSAGYEERRDACVACELGFYKSAPGDQLCARCPPHSHSAAPAAQACHCDLSYYRAALDPPSSACTRPPSAPVNLI
SSVNGTSVTLEWAPPLDPGGRSDITYNAVCRRCPWALSRCEACGSGTRFVPQQTSLVQASLLVANLLAHMNYSFWIEAVNGVSD
LSPEPRRAAVVNITTNQAAPSQVVVIRQERAGQTSVSLLWQEPEQPNGIILEYEIKYYEKDKEMQSYSTLKAVTTRATVSGLKP
GTRYVFQVRARTSAGCGRFSQAMEVETGKPRPRYDTRTIVWICLTLITGLVVLLLLLICKKRHCGYSKAFQDSDEEKMHYQNGQ
APPPVFLPLHHPPGKLPEPQFYAEPHTYEEPGRAGRSFTREIEASRIHIEKIIGSGDSGEVCYGRLRVPGQRDVPVAIKALKAG
YTERQRRDFLSEASIMGQFDHPNIIRLEGVVTRGRLAMIVTEYMENGSLDTFLRTHDGQFTIMQLVGMLRGVGAGMRYLSDLGY
VHRDLAARNVLVDSNLVCKVSDFGLSRVLEDDPDAAYTTTGGKIPIRWTAPEAIAFRTFSSASDVWSFGVVMWEVLAYGERPYW
NMTNRDVISSVEEGYRLPAPMGCPHALHQLMLDCWHKDRAQRPRFSQIVSVLDALIRSPESLRATATVSRCPPPAFVRSCFDLR
GGSGGGGGLTVGDWLDSIRMGRYRDHFAAGGYSSLGMVLRMNAQDVRALGITLMGHQKKILGSIQTMR

10

（配列番号５）。

【００５１】

（表６）

（ＮＯＶ２ポリペプチドとマウスエフリンＡ型レセプター８前駆体との間の比較）

【００５２】

【化９】

```
>ref|NP_031965.1| Eph receptor A8
 sp|O09127|EPA8_MOUSE EPHRIN TYPE-A RECEPTOR 8 PRECURSOR (TYROSINE-PROTEIN KINASE
          RECEPTOR EEK) (EPH-AND ELK-RELATED KINASE)
 gb|AAB39218.1| (U72207) Eph-and Elk-related kinase [Mus musculus]
          Length = 1004

 Score = 3036 bits (7128), Expect = 0.0
 Identities = 945/992 (95%), Positives = 964/992 (96%), Gaps = 1/992 (0%)

NOV2:  1   MAPARGRLPPALWVVTAAAAAATCVSAARGEVNLLDTSTIHGDWGWLTYPAHGWDSINEV 60
           ||||| || |||||||||||| |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1   MAPARARLSPALWVVTAAAAA-TCVSAGRGEVNLLDTSTIHGDWGWLTYPAHGWDSINEV 59

NOV2:  61  DESFQPIHTYQVCNVMSPNQNNWLRTSWVPRDGARRVYAEIKFTLRDCNSMPGVLGTCKE 120
           ||||+|||||||||||||||||||||+||||||||||||||||||||+|||||||||||
Sbjct: 60  DESFRPIHTYQVCNVMSPNQNNWLRTNWVPRDGARRVYAEIKFTLRDCNSIPGVLGTCKE 119

NOV2:  121 TFNLYYLESDRDLGASTQESQFLKIDTIAADESFTGADLGVRRLKLNTEVRSVGPLSKRG 180
           ||||+|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 120 TFNLHYLESDRDLGASTQESQFLKIDTIAADESFTGADLGVRRLKLNTEVRGVGPLSKRG 179

NOV2:  181 FYLAFQDIGACLAILSLRIYYKKCPAMVRNLAAFSEAVTGADSSSLVEVRGQCVRHSEER 240
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 180 FYLAFQDIGACLAILSLRIYYKKCPAMVRNLAAFSEAVTGADSSSLVEVRGQCVRHSEER 239

NOV2:  241 DTPKMYCSAEGEWLVPIGKCVCSAGYEERRDACVACELGFYKSAPGDQLCARCPPHSHSA 300
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||+|||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 240 DTPKMYCSAEGEWLVPIGKCVCSAGYEERRDACMACELGFYKSAPGDQLCARCPPHSHSA 299

NOV2:  301 APAAQACHCDLSYYRAALDPPSSACTRPPSAPVNLISSVNGTSVTLEWAPPLDPGGRSDI 360
           |||| | |||||||||||||||+|||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 300 TPAAQTCRCDLSYYRAALDPPSAACTRPPSAPVNLISSVNGTSVTLEWAPPLDPGGRSDI 359

NOV2:  361 TYNAVCRRCPWALSRCEACGSGTRFVPQQTSLVQASLLVANLLAHMNYSFWIEAVNGVSD 420
           |||||||||||||| ||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||+
Sbjct: 360 TYNAVCRRCPWALSHCEACGSGTRFVPQQTSLAQASLLVANLLAHMNYSFWIEAVNGVSN 419

NOV2:  421 LSPEPRRAAVVNITTNQAAPSQVVVIRQERAGQTSVSLLWQEPEQPNGIILEYEIKYYEK 480
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 420 LSPEPRSAAVVNITTNQAAPSQVVVIRQERAGQTSVSLLWQEPEQPNGIILEYEIKYYEK 479

NOV2:  481 DKEMQSYSTLKAVTTRATVSGLKPGTRYVFQVRARTSAGCGRFSQAMEVETGKPRPRYDT 540
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 480 DKEMQSYSTLKAVTTRATVSGLKPGTRYVFQVRARTSAGCGRFSQAMEVETGKPRPRYDT 539

NOV2:  541 RTIVWICLTLITGLVVLLLLLICKKRHCGYSKAFQDSDEEKMHYQNGQAPPPVFLPLHHP 600
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||+||
Sbjct: 540 RTIVWICLTLITGLVVLLLLLICKKRHCGYSKAFQDSDEEKMHYQNGQAPPPVFLPLNHP 599

NOV2:  601 PGKLPEPQFYAEPHTYEEPGRAGRSFTREIEASRIHIEKIIGSGDSGEVCYGRLRVPGQR 660
           ||| || || |||||||||||||||||||||||||||||||||||||+|||||||||+|||
Sbjct: 600 PGKFPETQFSAEPHTYEEPGRAGRSFTREIEASRIHIEKIIGSGESGEVCYGRLQVPGQR 659

NOV2:  661 DVPVAIKALKAGYTERQRRDFLSEASIMGQFDHPNIIRLEGVVTRGRLAMIVTEYMENGS 720
           |||||||||||||||||+|||||||+|||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 660 DVPVAIKALKAGYTERQRQDFLSEAAIMGQFDHPNIIRLEGVVTRGRLAMIVTEYMENGS 719

NOV2:  721 LDTFLRTHDGQFTIMQLVGMLRGVGAGMRYLSDLGYVHRDLAARNVLVDSNLVCKVSDFG 780
           || ||||||||||+|||||||||||||||||||||+|||||||||||  |||||||||
Sbjct: 720 LDAFLRTHDGQFTIVQLVGMLRGVGAGMRYLSDLGYIHRDLAARNVLVDGRLVCKVSDFG 779

NOV2:  781 LSRVLEDDPDAAYTTTGGKIPIRWTAPEAIAFRTFSSASDVWSFGVVMWEVLAYGERPYW 840
           ||| |||||+|||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 780 LSRALEDDPEAAYTTAGGKIPIRWTAPEAIAFRTFSSASDVWSFGVVMWEVLAYGERPYW 839

NOV2:  841 NMTNRDVISSVEEGYRLPAPMGCPHALHQLMLDCWHKDRAQRPRFSQIVSVLDALIRSPE 900
           ||||+|||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||+ +|||||||+ |||
Sbjct: 840 NMTNQDVISSVEEGYRLPAPMGCPRALHQLMLDCWHKDRAQRPRFAHVVSVLDALVHSPE 899

NOV2:  901 SLRATATVSRCPPPAFVRSCFDLRGGSGGGGGLTVGDWLDSIRMGRYRDHFAAGGYSSLG 960
           |||||||||||||||| |||||| |  | | ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 900 SLRATATVSRCPPPAFARSCFDLRAGGSGNGDLTVGDWLDSIRMGRYRDHFAAGGYSSLG 959

NOV2:  961 MVLRMNAQDVRALGITLMGHQKKILGSIQTMR 992
           |||||||||.|||||||||||||||||||||
Sbjct: 960 MVLRMNAQDVRALGITLMGHQKKILGSIQTMR 991
```

。

【００５３】

（表６Ａ）

（ＮＯＶ２ポリペプチドとヒトエフリンＡ型レセプターＥｐｈＡ８との間の比較）

【００５４】

【化１０】

```
>ref|NP_065387.1| EphA8; Ephrin receptor EphA8 (eph- and elk-related kinase); Hek3;
          eph-, elk-related tyrosine kinase; ephrin receptor EphA8
 emb|CAB81612.1| (AL035703) dJ61A9.1 (tyrosine kinase ) [Homo sapiens]
          Length = 1005

 Score = 2054 bits (5262), Expect = 0.0
 Identities = 992/992 (100%), Positives = 992/992 (100%)

NOV2 : 1   MAPARGRLPPALWVVTAAAAAATCVSAARGEVNLLDTSTIHGDWGWLTYPAHGWDSINEV 60
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1   MAPARGRLPPALWVVTAAAAAATCVSAARGEVNLLDTSTIHGDWGWLTYPAHGWDSINEV 60

NOV2 : 61  DESFQPIHTYQVCNVMSPNQNNWLRTSWVPRDGARRVYAEIKFTLRDCNSMPGVLGTCKE 120
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 61  DESFQPIHTYQVCNVMSPNQNNWLRTSWVPRDGARRVYAEIKFTLRDCNSMPGVLGTCKE 120

NOV2 : 121 TFNLYYLESDRDLGASTQESQFLKIDTIAADESFTGADLGVRRLKLNTEVRSVGPLSKRG 180
           TFNLYYLESDRDLGASTQESQFLKIDTIAADESFTGADLGVRRLKLNTEVRSVGPLSKRG
Sbjct: 121 TFNLYYLESDRDLGASTQESQFLKIDTIAADESFTGADLGVRRLKLNTEVRSVGPLSKRG 180

NOV2 : 181 FYLAFQDIGACLAILSLRIYYKKCPAMVRNLAAFSEAVTGADSSSLVEVRGQCVRHSEER 240
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 181 FYLAFQDIGACLAILSLRIYYKKCPAMVRNLAAFSEAVTGADSSSLVEVRGQCVRHSEER 240

NOV2 : 241 DTPKMYCSAEGEWLVPIGKCVCSAGYEERRDACVACELGFYKSAPGDQLCARCPPHSHSA 300
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 241 DTPKMYCSAEGEWLVPIGKCVCSAGYEERRDACVACELGFYKSAPGDQLCARCPPHSHSA 300

NOV2 : 301 APAAQACHCDLSYYRAALDPPSSACTRPPSAPVNLISSVNGTSVTLEWAPPLDPGGRSDI 360
           APAAQACHCDLSYYRAALDPPSSACTRPPSAPVNLISSVNGTSVTLEWAPPLDPGGRSDI
Sbjct: 301 APAAQACHCDLSYYRAALDPPSSACTRPPSAPVNLISSVNGTSVTLEWAPPLDPGGRSDI 360

NOV2 : 361 TYNAVCRRCPWALSRCEACGSGTRFVPQQTSLVQASLLVANLLAHMNYSFWIEAVNGVSD 420
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 361 TYNAVCRRCPWALSRCEACGSGTRFVPQQTSLVQASLLVANLLAHMNYSFWIEAVNGVSD 420

NOV2 : 421 LSPEPRRAAVVNITTNQAAPSQVVVIRQERAGQTSVSLLWQEPEQPNGIILEYEIKYYEK 480
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 421 LSPEPRRAAVVNITTNQAAPSQVVVIRQERAGQTSVSLLWQEPEQPNGIILEYEIKYYEK 480

NOV2 : 481 DKEMQSYSTLKAVTTRATVSGLKPGTRYVFQVRARTSAGCGRFSQAMEVETGKPRPRYDT 540
           DKEMQSYSTLKAVTTRATVSGLKPGTRYVFQVRARTSAGCGRFSQAMEVETGKPRPRYDT
Sbjct: 481 DKEMQSYSTLKAVTTRATVSGLKPGTRYVFQVRARTSAGCGRFSQAMEVETGKPRPRYDT 540

NOV2 : 541 RTIVWICLTLITGLVVLLLLLICKKRHCGYSKAFQDSDEEKMHYQNGQAPPPVFLPLHHP 600
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 541 RTIVWICLTLITGLVVLLLLLICKKRHCGYSKAFQDSDEEKMHYQNGQAPPPVFLPLHHP 600

NOV2 : 601 PGKLPEPQFYAEPHTYEEPGRAGRSFTREIEASRIHIEKIIGSGDSGEVCYGRLRVPGQR 660
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 601 PGKLPEPQFYAEPHTYEEPGRAGRSFTREIEASRIHIEKIIGSGDSGEVCYGRLRVPGQR 660

NOV2 : 661 DVPVAIKALKAGYTERQRRDFLSEASIMGQFDHPNIIRLEGVVTRGRLAMIVTEYMENGS 720
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 661 DVPVAIKALKAGYTERQRRDFLSEASIMGQFDHPNIIRLEGVVTRGRLAMIVTEYMENGS 720

NOV2 : 721 LDTFLRTHDGQFTIMQLVGMLRGVGAGMRYLSDLGYVHRDLAARNVLVDSNLVCKVSDFG 780
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 721 LDTFLRTHDGQFTIMQLVGMLRGVGAGMRYLSDLGYVHRDLAARNVLVDSNLVCKVSDFG 780

NOV2 : 781 LSRVLEDDPDAAYTTTGGKIPIRWTAPEAIAFRTFSSASDVWSFGVVMWEVLAYGERPYW 840
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 781 LSRVLEDDPDAAYTTTGGKIPIRWTAPEAIAFRTFSSASDVWSFGVVMWEVLAYGERPYW 840

NOV2 : 841 NMTNRDVISSVEEGYRLPAPMGCPHALHQLMLDCWHKDRAQRPRFSQIVSVLDALIRSPE 900
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 841 NMTNRDVISSVEEGYRLPAPMGCPHALHQLMLDCWHKDRAQRPRFSQIVSVLDALIRSPE 900

NOV2 : 901 SLRATATVSRCPPPAFVRSCFDLRGGSGGGGGLTVGDWLDSIRMGRYRDHFAAGGYSSLG 960
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 901 SLRATATVSRCPPPAFVRSCFDLRGGSGGGGGLTVGDWLDSIRMGRYRDHFAAGGYSSLG 960

NOV2 : 961 MVLRMNAQDVRALGITLMGHQKKILGSIQTMR 992
           ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 961 MVLRMNAQDVRALGITLMGHQKKILGSIQTMR 992
```

。

【００５５】

（表７）

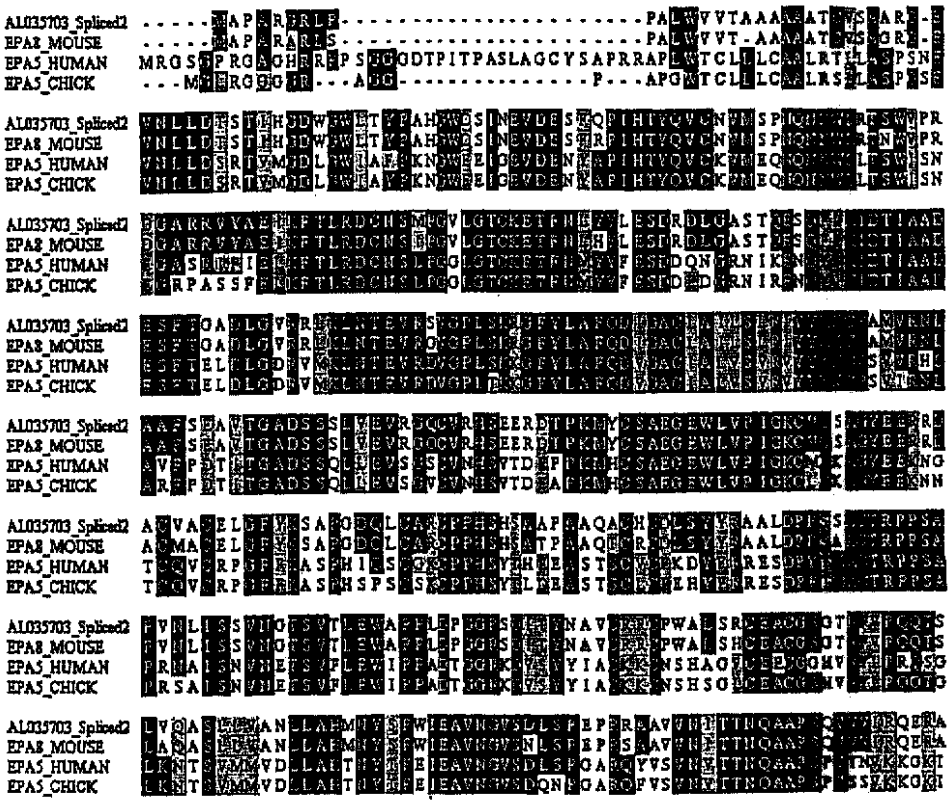
（本発明のＮＯＶ２エフリンＡ型レセプター８様タンパク質（ＡＬ０３５７０３　Ｓｐｌｉｃｅｄ２として示される）と類似のタンパク質との多重アラインメント）

（黒で輪郭をとられているアミノ酸は、潜在的保存配列領域を示す；灰色塗りしてあるアミノ酸は、保存的に置換されたアミノ酸を示す；そして強調されていないアミノ酸は、広

範囲の代替的アミノ酸残基への変異が生じる位置を示す）

【００５６】

【化１１】



。

【００５７】

（ＮＯＶ３）

本発明に従うＮＯＶ３核酸配列は、フィブロモジュリンおよびフィブロネクチンのような、プロテオグリカンに関連するポリペプチドをコードする核酸を含む。この核酸およびそのコードされるポリペプチドの例は、表８に示される。開示される核酸配列（配列番号６）は、２０２５ヌクレオチド長であり、そしてヌクレオチド１～３のＡＴＧ開始コドンで開始し、そしてヌクレオチド２０２３～２０２５のＴＧＡ終止コドンで終止するオープンリーディングフレームを含む。

【００５８】

代表的なＯＲＦは、６７４アミノ酸ポリペプチド（配列番号７）を含む。コードされるポリペプチドは、細胞外基質にて見出されるプロテオグリカンファミリーのいくつかのロイシンリッチ反復メンバー（フィブロネクチン（表９、ヒトフィブロネクチン様タンパク質、ＡＡＦ２８４５９．１（Ｌａｎｃｙら（１９９９）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　６２、４１７～４２６）に対して９９％）およびフィブロモジュリン（表１０、種々のフィブロモジュリンもしくはフィブロモジュリン様タンパク質）を含む）に対する高度の相同性を有する。

【００５９】

細胞外基質（ＥＣＭ）は、接着、移動およびシグナル伝達のための機械的足場を細胞および組織に提供する、コラーゲン、プロテオグリカン（ｐｒｏｔｏｇｌｙｃａｎ）、および非膠原性糖タンパク質から構成される（ＡｕｍａｉｌｌｅｙおよびＧａｙｒｕａｄ（１９９８）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．７６（３～４）２５３～２６５）。これらの種々でそして複雑な機能は、ＥＣＭ成分と細胞レセプター（例えば、細胞表面上に位置するプロテオグリカン（ｐｒｏｔｏｇｌｙｃａｎ））との間の相互作用に依存する。フィブロネクチンおよびフィブロモジュリンは、両方とも、細胞外基質を含むプロテオグリカン（ｐｒｏｔｏｇ

ｌｙｃａｎ）である。基質タンパク質の遺伝子における変異に起因する細胞－基質相互作用の破壊は、すべての組織における機能的不全を生じ得る（Ｂｒｕｃｋｎｅｒ－ＴｕｄｅｒｍａｎおよびＢｒｕｃｋｎｅｒ（１９９８）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．７６（３～４）２２６～２３７）。これらの障害に、先天性筋ジストロフィー、種々の筋肉障害、固定された変形（関節拘縮症）、および頭蓋ＭＲＩによる異常な白質が含まれる。

【００６０】

フィブロネクチンは、各々ジスルフィド結合で結合した２本の鎖を有する糖タンパク質であり、動物組織の細胞外基質において不溶性原線維形態で存在しそして血漿において可溶性であり、後者は、冷（ｃｏｌｄ）不溶性グロブリンとして以前に公知である。種々のわずかに異なる形態のフィブロネクチンが、単一の遺伝子から転写された、フィブロネクチンｍＲＮＡの組織特異的差次的スプライシングにより生成されるようである。フィブロネクチンは、多くの細胞外物質（例えば、コラーゲン、フィブリンおよびヘパリン）と相互作用する能力そしてまた応答性細胞上の特定の膜レセプターと相互作用する能力を付与する、複数のドメインを有する。インテグリンにより認識されるＲＧＤドメインと、ＥＧＦ様ドメインの２回反復とが注目される。表面に吸着されたフィブロネクチンとの細胞のフィブロネクチンレセプター（インテグリンファミリーのメンバー）の相互作用は、細胞の接着および拡散を生じる。

【００６１】

フィブロモジュリンは、細胞外基質にて見出されるプロテオグリカンのコラーゲン結合タンパク質成分である。これは、主に、関節の軟骨、腱、および靭帯において発現され、そしてロイシンリッチ反復（ＬＲＲ）ドメインを有するタンパク質のグループのメンバーであり；フィブロモジュリンは、１０個ほどの多さのこのようなモチーフを含む。このファミリーの他の成分としては、デコリン、ビグリカン、およびルミカンが挙げられる。このファミリーのタンパク質は、他の基質高分子に結合し、それによりその基質を安定化するのを補助する。これらのタンパク質はまた、軟骨細胞の機能に影響し得、そして増殖因子に結合し得る。

【００６２】

これらのプロテオグリカンのコアタンパク質は、構造的に関連し、ジスルフィド結合した末端ドメインが隣接するロイシンリッチ反復から構成される中心領域からなる。フィブロモジュリンの中心領域は、そのロイシンリッチドメイン内に４つまでのケラタン硫酸鎖を有する。フィブロモジュリンは、広範な組織分布を示し、関節の軟骨、腱および靭帯において最も豊富に観察される。フィブロモジュリンが、Ｉ型およびＩＩ型の膠原原線維と相互作用する能力およびインビトロで原線維発生を阻害する能力によって、細胞外基質のアセンブリに関与することが示唆された。フィブロモジュリンＤＮＡ３’非翻訳領域は、以前にクローニングされ、そして蛍光インサイチュハイブリダイゼーションによりその遺伝子を１ｑ３２にマッピングするために使用された（Ｓｚｔｒｏｌｏｖｉｃｓら、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ２３：７１５～７１７（１９９４））。この研究において、二次シグナルが、９ｑ３４．１で検出されたが；体細胞ハイブリッドのＰＣＲ分析により、第１染色体への位置付けが確認された。

【００６３】

小さいプロテオグリカン（デコリン、ビグリカン、およびフィブロモジュリンを含む）は、他の基質高分子に結合し、それによりその基質を安定化するのを補助する。それらはまた、軟骨細胞の機能に影響し得そして増殖因子に結合し得る。 ウシ鼻軟骨培養系において、インターロイキン－１で刺激された軟骨異化が、小さいロイシンリッチ反復プロテオグリカンであるデコリン、ビグリカンおよびルミカンが培養期間中タンパク質分解性切断および遊離の両方に対する耐性を示した効果を含むことが見出された。対照的に、フィブロモジュリンは、おそらくタンパク質分解性改変に起因して、４日目以後にサイズの顕著な減少を示した（Ｓｚｔｒｏｌｏｖｉｃｓ Ｒら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ、３３９（Ｐｔ３）：５７１～５７７、１９９９）。

【００６４】

本発明の核酸およびタンパク質は、種々の整形外科的障害および／または損傷に関与する、可能性のある治療適用において有用である。これらは、軟骨および靭帯に対する損傷の修復補助、ならびに関節修復に対する治療適用において、潜在的に有用である。さらに、これらは、結合組織の炎症疾患（非限定的例として、慢性関節リウマチ、先天性筋ジストロフィー、種々の筋肉障害、固定された変形（関節拘縮症）、および異常な白質が挙げられる）の処置において使用され得る。例えば、プロテオグリカン様タンパク質をコードするｃＤＮＡは、遺伝子治療において有用であり得、そしてプロテオグリカン様タンパク質は、その必要がある被験体に投与される場合に有用であり得る。本発明のプロテオグリカン様タンパク質をコードする新規な核酸およびプロテオグリカン様タンパク質、またはそのフラグメントは、その核酸またはタンパク質の存在または量が評価される、診断適用においてさらに有用であり得る。例えば、腎臓もしくは脳由来の組織を同定する際である。これらの物質は、治療法もしくは診断法における使用のための、本発明の新規な物質に免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。

【００６５】

（表８）

（本発明のプロテオグリカン様タンパク質をコードする代表的ＤＮＡ配列）

【００６６】

【化１２】

```
ATGGTGGTGGCACACCCCACCGCCACTGCCACCACCACGCCCACTGCCACTGTCACGGCCACCGTTGTGA
TGACCACGGCCACCATGGACCTGCGGGACTGGCTGTTCCTCTGCTACGGGCTCATCGCCTTCCTGACGGA
GGTCATCGACAGCACCACCTGCCCCTCGGTGTGCCGCTGCGACAACGGCTTCATCTACTGCAACGACCGG
GGACTCACATCCATCCCCGCAGATATCCCTGATGATGCCACCACCCTCTACCTGCAGAACAACCAGATCA
ACAACGCCGGCATCCCCCAGGACCTCAAGACCAAGGTCAACGTGCAGGTCATCTACCTATACGAGAATGA
CCTGGATGAGTTCCCCATCAACCTGCCCCGCTCCCTCCGGGAGCTGCACCTGCAGGACAACAATGTGCGC
ACCATTGCCAGGGACTCGCTGGCCCGCATCCCGCTGCTGGAGAAGCTGCACCTGGATGACAACTCCGTGT
CCACCGTCAGCATTGAGGAGGACGCCTTCGCCGACAGCAAACAGCTCAAGCTGCTCTTCCTGAGCCGGAA
CCACCTGAGCAGCATCCCCTCGGGGCTGCCGCACACGCTGGAGGAGCTGCGGCTGGATGACAACCGCATC
TCCACCATCCCGCTGCATGCCTTCAAGGGCCTCAACAGCCTGCGGCGCCTGGTGCTGGACGGTAACCTGC
TGGCCAACCAGCGCATCGCCGACGACACCTTCAGCCGCCTACAGAACCTCACAGAGCTCTCGCTGGTGCG
CAATTCGCTGGCCGCGCCACCCCTCAACCTGCCCAGCGCCCACCTGCAGAAGCTCTACCTGCAGGACAAT
GCCATCAGCCACATCCCCTACAACACGCTGGCCAAGATGCGTGAGCTGGAGCGGCTGGACCTGTCCAACA
ACAACCTGACCACGCTGCCCCGCGGCCTGTTCGACGACCTGGGGAACCTGGCCCAGCTGCTGCTCAGGAA
CAACCCTTGGTTTTGTGGCTGCAACCTCATGTGGCTGCGGGACTGGGTGAAGGCACGGGCGGCCGTGGTC
AACGTGCGGGGCCTCATGTGCCAGGGCCCTGAGAAGGTCCGGGGCATGGCCATCAAGGACATTACCAGCG
AGATGGACGAGTGTTTTGAGACGGGGCCGCAGGGCGGCGTGGCCAATGCGGCTGCCAAGACCACGGCCAG
CAACCACGCCTCTGCCACCACGCCCCAGGGTTCCCTGTTTACCCTCAAGGCCAAAAGGCCAGGGCTGCGC
CTCCCCGACTCCAACATTGACTACCCCATGGCCACGGGTGATGGCGCCAAGACCCTGGCCATCCACGTGA
AGGCCCTGACGGCAGACTCCATCCGCATCACGTGGAAGGCCACGCTCCCCGCCTCCTCTTTCCGGCTCAG
TTGGCTGCGCCTGGGCCACAGCCCAGCCGTGGGCTCCATCACGGAGACCTTGGTGCAGGGGGACAAGACA
GAGTACCTGCTGACAGCCCTGGAGCCCAAGTCCACCTACATCATCTGCATGGTCACCATGGAGACCAGCA
ATGCCTACGTAGCTGATGAGACACCCGTGTGTGCCAAGGCAGAGACAGCCGACAGCTATGGCCCTACCAC
CACACTCAACCAGGAGCAGAACGCTGGCCCCATGGCGAGCCTGCCCCTGGCGGGCATCATCGGCGGGGCA
GTGGCTCTGGTCTTCCTCTTCCTGGTCCTGGGGGCCATCTGCTGGTACGTGCACCAGGCTGGCGAGCTGC
TGACCCGGGAGAGGGCCTACAACCGGGGCAGCAGGAAAAAGGATGACTATATGGAGTCAGGGACCAAGAA
GGATAACTCCATCCTGGAAATCCGCGGCCCTGGGCTGCAGATGCTGCCCATCAACCCGTACCGCGCCAAA
GAGGAGTACGTGGTCCACACTATCTTCCCCTCCAACGGCAGCAGCCTCTGCAAGGCCACACACACCATTG
GCTACGGCACCACGCGGGGCTACCGGGACGGCGGCATCCCCGACATAGACTACTCCTACACATGA
```

（配列番号６）。

【００６７】

（本発明のプロテオグリカン様タンパク質の代表的アミノ酸配列）

【００６８】

【化１３】

MVVAHPTATATTTPTATVTATVVMTTATMDLRDWLFLCYGLIAFLTEVIDSTTCPSVCRCDNGFIYCNDR
GLTSIPADIPDDATTLYLQNNQINNAGIPQDLKTKVNVQVIYLYENDLDEFPINLPRSLRELHLQDNNVR
TIARDSLARIPLLEKLHLDDNSVSTVSIEEDAFADSKQLKLLFLSRNHLSSIPSGLPHTLEELRLDDNRI
STIPLHAFKGLNSLRRLVLDGNLLANQRIADDTFSRLQNLTELSLVRNSLAAPPLNLPSAHLQKLYLQDN
AISHIPYNTLAKMRELERLDLSNNNLTTLPRGLFDDLGNLAQLLLRNNPWFCGCNLMWLRDWVKARAAVV
NVRGLMCQGPEKVRGMAIKDITSEMDECFETGPQGGVANAAAKTTASNHASATTPQGSLFTLKAKRPGLR
LPDSNIDYPMATGDGAKTLAIHVKALTADSIRITWKATLPASSFRLSWLRLGHSPAVGSITETLVQGDKT
EYLLTALEPKSTYIICMVTMETSNAYVADETPVCAKAETADSYGPTTTLNQEQNAGPMASLPLAGIIGGA
VALVFLFLVLGAICWYVHQAGELLTRERAYNRGSRKKDDYMESGTKKDNSILEIRGPGLQMLPINPYRAK
EEYVVHTIFPSNGSSLCKATHTIGYGTTRGYRDGGIPDIDYSYT

（配列番号７）。

【００６９】

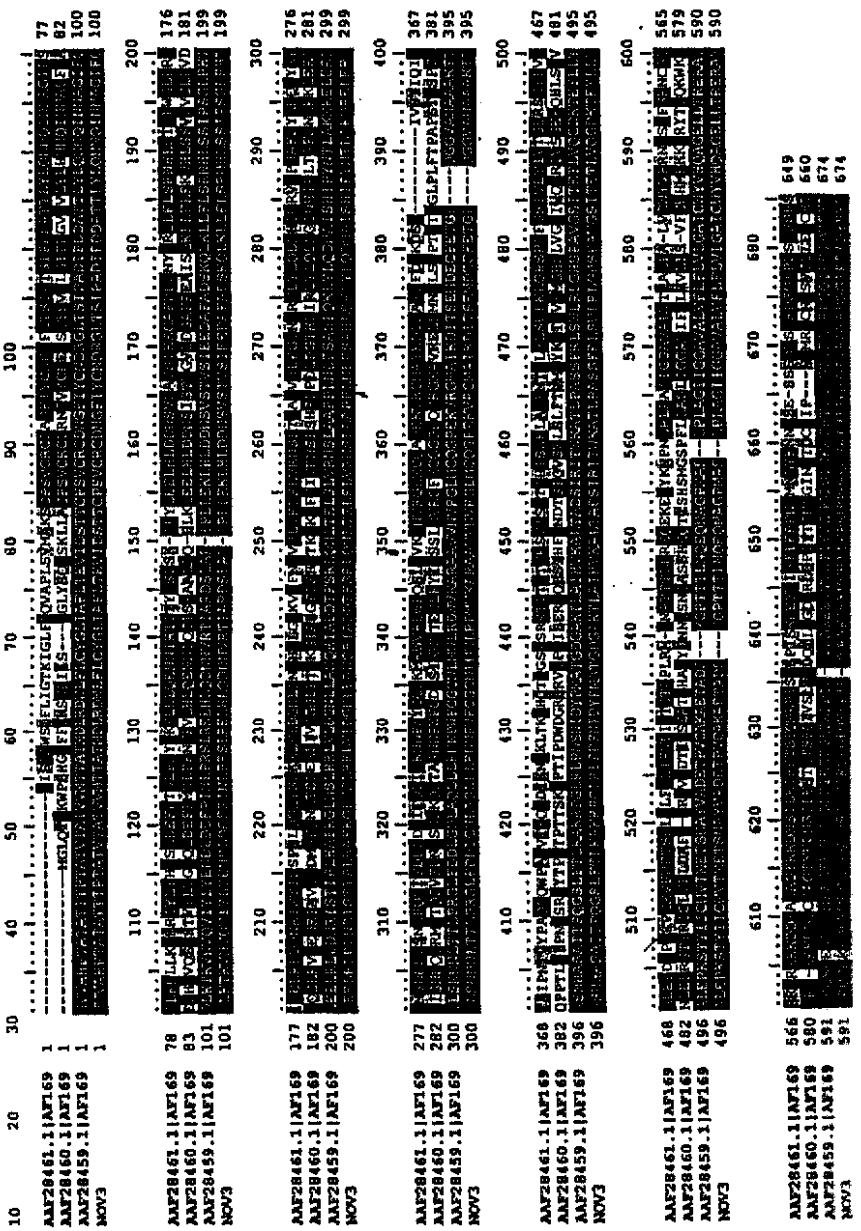
（表９）

（ＮＯＶ３ポリペプチドとヒトフィブロネクチンロイシン反復膜貫通ファミリーとの多重配列およびＢＬＡＳＴアラインメント）

（黒で輪郭をとられているアミノ酸は、潜在的保存配列領域を示す；灰色塗りしてあるアミノ酸は、保存的に置換されたアミノ酸を示す；そして強調されていないアミノ酸は、広範囲の代替的アミノ酸残基への変異が生じる位置を示す）

【００７０】

【化１４】



（表９の続き）

【００７１】

【化１５】

```
>ref|NP_037412.1| fibronectin leucine rich transmembrane protein 1
 gb|AAF28459.1|AF169675_1 (AF169675) leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT1
[Homo
          sapiens]
         Length = 674

 Score = 1365 bits (3494), Expect = 0.0
Identities = 673/674 (99%), Positives = 674/674 (99%)

NOV3:  1   MVVAHPTATATTTPTATVTATVVMTTATMDLRDWLFLCYGLIAFLTEVIDSTTCPSVCRC 60
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1   MVVAHPTATATTTPTATVTATVVMTTATMDLRDWLFLCYGLIAFLTEVIDSTTCPSVCRC 60

NOV3:  61  DNGFIYCNDRGLTSIPADIPDDATTLYLQNNQINNAGIPQDLKTKVNVQVIYLYENDLDS 120
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 61  DNGFIYCNDRGLTSIPADIPDDATTLYLQNNQINNAGIPQDLKTKVNVQVIYLYENDLDS 120

NOV3:  121 FPINLPRSLRELHLQDNNVRTIARDSLARIPLLEKLHLDDNSVSTVSIEEDAFADSKQLK 180
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 121 FPINLPRSLRELHLQDNNVRTIARDSLARIPLLEKLHLDDNSVSTVSIEEDAFADSKQLK 180

NOV3:  181 LLFLSRNHLSSIPSGLPHTLEELRLDDNRISTIPLHAFKGLNSLRRLVLDGNLLANQRIA 240
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 181 LLFLSRNHLSSIPSGLPHTLEELRLDDNRISTIPLHAFKGLNSLRRLVLDGNLLANQRIA 240

NOV3:  241 DDTFSRLQNLTELSLVRNSLAAPPLNLPSAHLQKLYLQDNAISHIPYNTLAKMRELERLD 300
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 241 DDTFSRLQNLTELSLVRNSLAAPPLNLPSAHLQKLYLQDNAISHIPYNTLAKMRELERLD 300

NOV3:  301 LSNNNLTTLPRGLFDDLGNLAQLLLRNNPWFCGCNLMWLRDWVKARAAVVNVRGLMCQGP 360
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 301 LSNNNLTTLPRGLFDDLGNLAQLLLRNNPWFCGCNLMWLRDWVKARAAVVNVRGLMCQGP 360

NOV3:  361 EKVRGMAIKDITSEMDECFETGPQGGVANAAAKTTASNHASATTPQGSLFTLKAKRPGLR 420
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 361 EKVRGMAIKDITSEMDECFETGPQGGVANAAAKTTASNHASATTPQGSLFTLKAKRPGLR 420

NOV3:  421 LPDSNIDYPMATGDGAKTLAIHVKALTADSIRITWKATLPASSFRLSWLRLGHSPAVGSI 480
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 421 LPDSNIDYPMATGDGAKTLAIHVKALTADSIRITWKATLPASSFRLSWLRLGHSPAVGSI 480

NOV3:  481 TETLVQGDKTEYLLTALEPKSTYIICMVTMETSNAYVADETPVCAKAETADSYGPTTTLN 540
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 481 TETLVQGDKTEYLLTALEPKSTYIICMVTMETSNAYVADETPVCAKAETADSYGPTTTLN 540

NOV3:  541 QEQNAGPMASLPLAGIIGGAVALVFLFLVLGAICWYVHQAGELLTRERAYNRGSRKKDDY 600
           |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 541 QEQNAGPMASLPLAGIIGGAVALVFLFLVLGAICWYVHQAGELLTRERAYNRGSREKDDY 600

NOV3:  601 MESGTKKDNSILEIRGPGLQMLPINPYRAKEEYVVHTIFPSNGSSLCKATHTIGYGTTRG 660
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 601 MESGTKKDNSILEIRGPGLQMLPINPYRAKEEYVVHTIFPSNGSSLCKATHTIGYGTTRG 660

NOV3:  661 YRDGGIPDIDYSYT 674
           ||||||||||||||
Sbjct: 661 YRDGGIPDIDYSYT 674
```

。

【００７２】

（表１０）

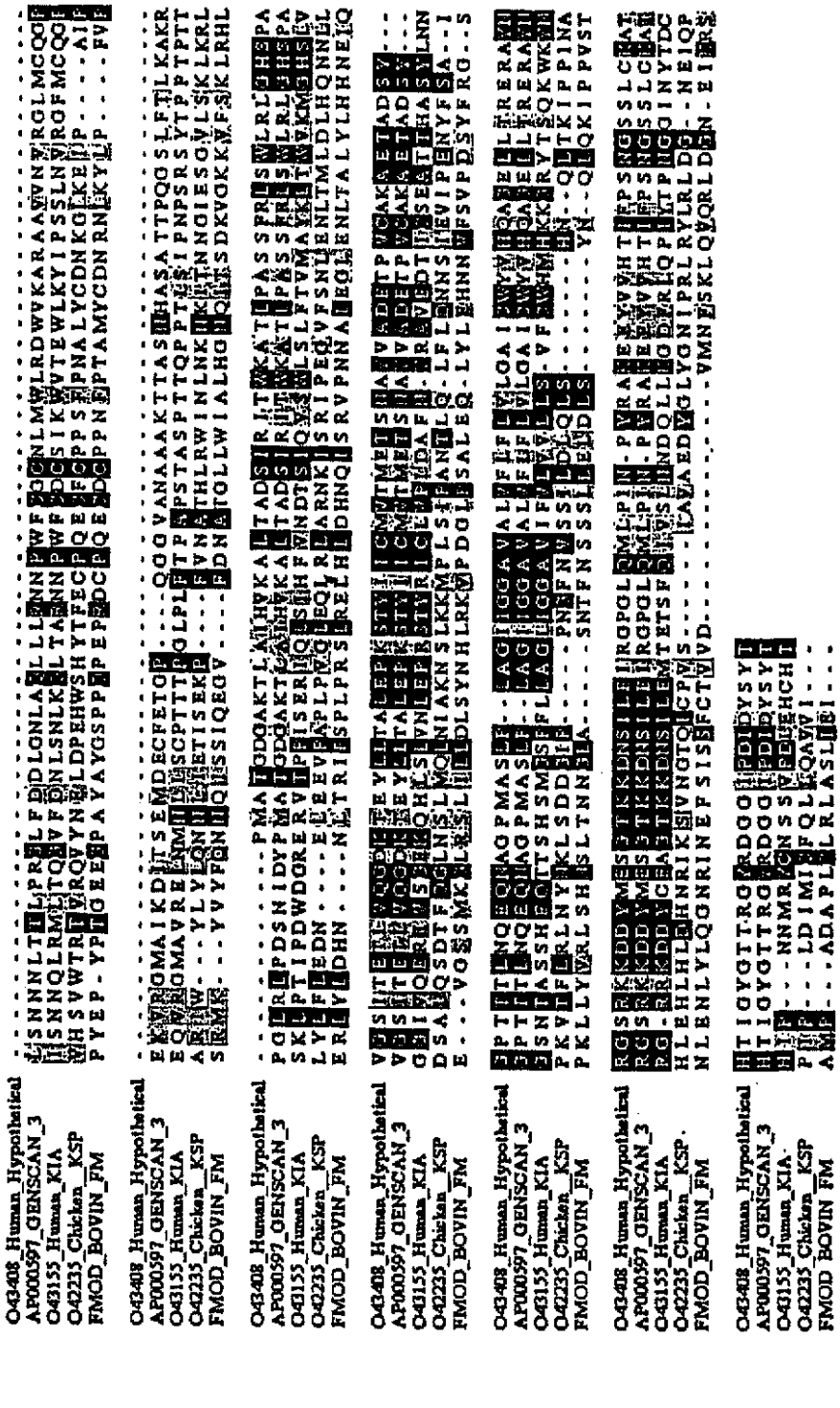
（ＮＯＶ３ポリペプチドと種々のフィブロモジュリンとの間の多重配列アラインメント）

（ＮＯＶ３はＡＰ０００５９７＿ＧＥＮＳＣＡＮ＿３と示される）

（黒で輪郭をとられているアミノ酸は、潜在的保存配列領域を示す；灰色塗りしてあるアミノ酸は、保存的に置換されたアミノ酸を示す；そして強調されていないアミノ酸は、広範囲の代替的アミノ酸残基への変異が生じる位置を示す）

【００７３】

【化１６】



。

【００７４】

（表１１）

（配列および対応する配列番号）

【００７５】

【表１】

NOV 番号	クローン	核酸配列の配列番号	コードされるアミノ酸配列の配列番号	ホモロジー	核酸のORF
1	AL109798_A	1	2	サイモシンβ10	61-237
2	AL035703_A	4	5	エフリンAレセプター	1-2976
3	AP000597_A	6	7	プロテオグリカン	1-2025

（ＮＯＶ核酸およびポリペプチド）

本発明の１つの局面は、ＮＯＶポリペプチドまたはその生物学的に活性なタンパク質をコードする、単離された核酸分子に関する。また、ＮＯＶをコードする核酸（例えば、ＮＯＶ　ｍＲＮＡ）を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用について十分な核酸フラグメント、およびＮＯＶ核酸分子の増幅および／または変異のためのＰＣＲプライマーとしての使用のためのフラグメントもまた、本発明に含まれる。本明細書中で使用される場合、用語「核酸分子」は、ＤＮＡ分子（例えば、ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ）、ＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ）、ヌクレオチドアナログを使用して作成されるＤＮＡまたはＲＮＡのアナログ、ならびにそれらの誘導体、フラグメントおよびホモログを含むことを意図する。核酸分子は一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖ＤＮＡである。

【００７６】

ＮＯＶ核酸は、成熟ＮＯＶポリペプチドをコードし得る。本明細書中で使用される場合、本発明において開示されるポリペプチドの「成熟」形態またはタンパク質は、天然に存在するポリペプチドまたは前駆体形態またはプロプロテイン（ｐｒｏｐｒｏｔｅｉｎ）の生成をいう。天然に存在するポリペプチドまたは前駆体形態またはプロプロテインとしては、非限定的な例の目的のみとして、対応する遺伝子によりコードされる全長遺伝子産物が挙げられる。あるいは、これらは、本明細書中に開示されるオープンリーディングフレームによりコードされるポリペプチド、前駆体またはプロプロテインとして規定され得る。生成物「成熟」形態は、また非限定的な例の目的として、１以上の天然に存在するプロセシング工程（これらがこの遺伝子産物が生じる細胞または宿主細胞内で起こる場合）の結果として生じる。ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態に至るこのようなプロセシング工程の例としては、オープンリーディングフレームの開始コドンによりコードされるＮ末端メチオニン残基の切断、またはシグナルペプチドまたはリーダー配列のタンパク質分解切断が挙げられる。従って、残基１～Ｎ（残基１がＮ末端メチオニンである場合）を有する前駆体ポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟形態は、Ｎ末端メチオニンの除去後に残基２～Ｎを有する。あるいは、残基１～Ｎ（ここで、Ｎ末端シグナル配列（残基１～Ｍ）が切断される）を有する前駆体ポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟形態は、残りの残基Ｍ＋１～残基Ｎを有する。さらに、本明細書中で使用される場合、ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態は、タンパク質分解事象ではなく、翻訳後修飾の工程から生じ得る。このようなさらなるプロセスとしては、非限定的な例として、グリコシル化、ミリストイル化またはリン酸化が挙げられる。一般に、成熟ポリペプチドまたはタンパク質は、これらのプロセスの１つのみまたはこれらの任意の組み合わせの操作から生じ得る。

【００７７】

用語「プローブ」とは、本明細書中で使用される場合、種々の長さの核酸配列をいい、好ましくは、特定の用途に依存して、少なくとも約１０ヌクレオチド（ｎｔ）、１００ｎｔ、または例えば、約６，０００ｎｔほどの大きさの間である。プローブは、同一、類似または相補的な核酸配列の検出において使用される。より長いプローブは、通常、天然供給源または組換え供給源から入手され、非常に特異的であり、そしてより長さの短いオリゴマープローブよりもはるかに遅くハイブリダイズする。プローブは、一本鎖または二本鎖

であり得、そしてＰＣＲ、膜ベースのハイブリダイゼーション技術、またはＥＬＩＳＡ様の技術において特異性を有するように設計される。

【００７８】

用語「単離された」核酸分子は、本明細書中で使用される場合、この核酸の天然の供給源中に存在する他の核酸分子から分離された核酸分子である。好ましくは、「単離された」核酸は、この核酸が由来する生物のゲノムＤＮＡ中でこの核酸に天然に隣接する配列（すなわち、この核酸の５’末端および３’末端に位置する配列）を含まない。例えば、種々の実施形態において、単離されたＮＯＶ核酸分子は、この核酸が由来する細胞／組織（例えば、脳、心臓、肝臓、脾臓など）のゲノムＤＮＡ中でこの核酸に天然で隣接する、約５ｋｂ、４ｋｂ、３ｋｂ、２ｋｂ、１ｋｂ、０．５ｋｂ、または０．１ｋｂ未満のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子、例えば、ｃＤＮＡ分子は、組換え技術により産生される場合、その他の細胞物質または培養培地を実質的に含まないか、または化学的に合成される場合、化学物質前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まないものであり得る。

【００７９】

本発明の核酸分子、例えば、配列番号１、４または６のヌクレオチド配列を有する核酸分子、または上記のヌクレオチド配列の相補体は、標準的な分子生物学的技法および本明細書で提供される配列情報を用いて単離され得る。ハイブリダイゼーションプローブとして、配列番号１、４または６の核酸の全部または一部を使用して、ＮＯＶ分子は、標準的なハイブリダイゼーションおよびクローニング技術（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（編）、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹＹ　ＭＡＮＵＡＬ第２版、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、１９８９；およびＡｕｓｕｂｅｌら、（編）、ＣＵＲＲＥＮＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ　ＩＮ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＩＯＬＯＧＹ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、ＮＹ、１９９３に記載されるように）を用いて単離され得る。本発明の核酸は、標準的なＰＣＲ増幅技法に従って、テンプレートとしてｃＤＮＡ、ｍＲＮＡあるいはゲノムＤＮＡ、および適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅され得る。このように増幅された核酸は、適切なベクター中にクローン化され、そしてＤＮＡ配列分析により特徴付けられ得る。さらに、ＮＯＶヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技術、例えば、自動化ＤＮＡ合成機を用いることにより調製され得る。

【００８０】

本明細書で用いられる場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、一連の連結されたヌクレオチド残基をいい、このオリゴヌクレオチドは、ＰＣＲ反応で用いられるに十分な数のヌクレオチド塩基を有する。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノム配列もしくはｃＤＮＡ配列に基づき得るか、またはそれから設計され得、そして特定の細胞もしくは組織において、同一、類似もしくは相補的ＤＮＡまたはＲＮＡを増幅し、確認し、もしくはその存在を示すために用いられる。オリゴヌクレオチドは、約１０ｎｔ、５０ｎｔ、または１００ｎｔの長さ、好ましくは約１５ｎｔ～３０ｎｔの長さを有する核酸配列の部分を含む。本発明の１つの実施形態では、１００ｎｔより少ない長さの核酸分子を含むオリゴヌクレオチドは、さらに、配列番号１、４または６の少なくとも６個連続するヌクレオチド、またはその相補体を含む。オリゴヌクレオチドは、化学的に合成され得、そしてプローブとして用いられ得る。

【００８１】

別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号１、４、もしくは６に示されるヌクレオチド配列またはこのヌクレオチド配列の一部分（例えば、プローブまたはプライマーとして使用され得るフラグメント、あるいはＮＯＶポリペプチドの生物学的に活性な部分をコードするフラグメント）の相補体である核酸分子を含む。配列番号１、４、または６に示されるヌクレオチド配列に相補的である核酸分子は、配列番号１、４、または６に示されるヌクレオチド配列に十分相補的である核酸分子であり、配列番号１、４、

または６に示されるヌクレオチド配列に対しミスマッチがほとんどまたは全くなく水素結合し得、それによって安定な二本鎖を形成する核酸分子である。

【００８２】

本明細書で用いる場合、用語「相補的」は、核酸分子のヌクレオチド単位間のＷａｔｓｏｎ－ＣｒｉｃｋまたはＨｏｏｇｓｔｅｅｎ塩基対形成をいい、そして用語「結合」は、２つのポリペプチドまたは化合物または関連ポリペプチドまたは化合物またはその組合せ間の物理的または化学的相互作用を意味する。結合は、イオン性、非イオン性、ファンデルワールス性、疎水性相互作用などを含む。物理的相互作用は直接的であるかまたは間接的であり得る。間接的相互作用は、別のポリペプチドまたは化合物を介するか、またはその効果に起因し得る。直接的結合は、別のポリペプチドもしくは化合物を介して、またはその効果に起因して生じない、その他の実質的な化学的中間体がない相互作用をいう。

【００８３】

本明細書中に提供されるフラグメントは、少なくとも６個の（連続する）核酸配列または少なくとも４個の（連続する）アミノ酸配列（それぞれ、核酸の場合には、特異的なハイブリダイゼーションを可能にし、またはアミノ酸の場合には、エピトープの特異的な認識を可能にするに十分な長さ）として規定され、そして全長配列未満のせいぜいいくらかの部分である。フラグメントは、選択された核酸配列またはアミノ酸配列の任意の連続する部分に由来し得る。

【００８４】

誘導体は、直接的にかまたは改変もしくは部分的置換によってかのいずれかでネイティブな化合物から形成される核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、ネイティブな化合物に類似する構造を有する（しかし、同一ではない）が、特定の成分または側鎖に関してそれとは異なる核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、合成物であり得るか、または進化的に異なる起源に由来し得、そして野生型と比較して、類似の代謝活性または反対の代謝活性を有し得る。ホモログは、異なる種由来の特定の遺伝子の核酸配列またはアミノ酸配列である。

【００８５】

誘導体およびアナログは、以下に記載のように、誘導体またはアナログが、修飾された核酸またはアミノ酸を含む場合、全長、または全長以外のものであり得る。本発明の核酸またはタンパク質の誘導体またはアナログは、種々の実施形態において、本発明の核酸もしくはタンパク質に、同一の大きさの核酸またはアミノ酸配列にわたって、または整列した配列に比較した場合（この整列は、当該分野で公知であるコンピューター相同性プログラムによって実施される）、少なくとも約３０％、５０％、７０％、８０％、または９５％の同一性（好ましい同一性は、８０～９５％）で実質的に相同であるか、あるいはそのコードする核酸がストリンジェントの、中程度にストリンジェントの、または低いストリンジェントの条件下で上記のタンパク質をコードする配列の相補体にハイブリダイズし得る、領域を含む分子を包含するが、これらに限定されない。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら、ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ、１９９３、および以下を参照のこと。

【００８６】

「相同な核酸配列」もしくは「相同なアミノ酸配列」、またはその改変体とは、上記で考察したように、ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルにおける相同性によって特徴付けられる配列をいう。相同なヌクレオチド配列は、ＮＯＶポリペプチドのアイソフォームをコードする配列をコードする。アイソフォームは、例えば、ＲＮＡの選択的スプライシングの結果として、同一の生物の異なる組織において発現され得る。あるいは、アイソフォームは、異なる遺伝子によってコードされ得る。本発明において、相同なヌクレオチド配列は、ヒト以外の種（脊椎動物が挙げられるが、これに限定されず、従って、例えば、カエル、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよび他の生物が挙げられ得る）のＮＯＶポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。相同なヌクレオチド配

列はまた、天然に生じる対立遺伝子改変体および本明細書に記載されるヌクレオチド配列の変異体が挙げられるが、これらに限定されない。しかし、相同的ヌクレオチド配列は、ヒトＮＯＶタンパク質をコードする正確なヌクレオチド配列を含まない。相同核酸配列は、配列番号２、５、または７の保存的アミノ酸置換（以下を参照のこと）、およびＮＯＶ生物学的活性を保有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む。ＮＯＶタンパク質の種々の生物学的活性は以下に記載されている。

【００８７】

ＯＲＦは、ポリペプチドに潜在的に翻訳され得るヌクレオチド配列に対応する。ＯＲＦを含む核酸のストレッチは、終止コドンによって途切れない。全タンパク質についてのコード配列を表すＯＲＦは、ＡＴＧ「開始」コドンで始まり、そして３つの「終止」コドン（すなわち、ＴＡＡ、ＴＡＧ、またはＴＧＡ）のうちの１つで終結する。本発明の目的で、ＯＲＦは、開始コドン、終止コドンまたはその両方を有するかまたは有さない、コード配列の任意の部分であり得る。ｂｏｎａ　ｆｉｄｅ細胞タンパク質のコードのための良好な候補としてみなされるＯＲＦについて、最小サイズの要求がしばしば、例えば、５０アミノ酸以上のタンパク質をコードするＤＮＡのストレッチを設定する。

【００８８】

ＮＯＶ遺伝子のクローニングから決定されたヌクレオチド配列は、他の細胞型（例えば、他の組織由来）におけるＮＯＶホモログ、ならびに他の脊椎動物由来のＮＯＶホモログを同定および／またはクローニングする際の使用のために設計されるプローブおよびプライマーの作製を可能にする。このプローブ／プライマーは、代表的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、代表的には、配列番号１、４もしくは６の少なくとも約１２個、約２５個、約５０個、約１００個、約１５０個、約２００個、約２５０個、約３００個、約３５０個または約４００個の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列；または配列番号１、４もしくは６のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列；あるいは配列番号１、４、もしくは６の天然に存在する変異体の少なくとも約１２個、約２５個、約５０個、約１００個、約１５０個、約２００個、約２５０個、約３００個、約３５０個または約４００個の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

【００８９】

ＮＯＶ核酸配列に基づくプローブは、同じまたは相同なタンパク質をコードする転写物またはゲノム配列を検出するために使用され得る。種々の実施形態において、このプローブはさらに、プローブに付着した標識基を含み、例えば、この標識基は放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。このようなプローブは、ＮＯＶタンパク質を誤って発現する細胞または組織を同定するための診断試験キットの一部として、例えば、被験体由来の細胞のサンプル中のＮＯＶをコードする核酸のレベルを測定すること（例えば、ＮＯＶ　ｍＲＮＡレベルを検出すること、またはゲノムＮＯＶ遺伝子が変異しているかまたは欠失しているか否かを決定すること）によって使用され得る。

【００９０】

「ＮＯＶポリペプチドの生物学的に活性な部分を有するポリペプチド」は、本発明のポリペプチドの活性に類似するが必ずしも同一ではない活性を示すポリペプチドをいい、用量依存性の有無に関わらず、特定の生物学的アッセイにおいて測定されるような成熟形態を含む。「ＮＯＶの生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、ＮＯＶの生物学的活性（ＮＯＶタンパク質の生物学的活性は、以下に記載される）を有するポリペプチドをコードする、配列番号１、４、もしくは６の一部を単離し、ＮＯＶタンパク質のコードされた部分を発現させ（例えば、インビトロでの組換え発現によって）、そしてＮＯＶのコードされた部分の活性を評価することによって調製され得る。

【００９１】

（ＮＯＶ核酸およびポリペプチドの改変体）

本発明はさらに、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号１、４、もしくは６に示されるヌクレオチド配列とは異なる核酸分子を包含し、従って、配列番号１、４、もしくは６に

示されるヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質と同じＮＯＶタンパク質をコードする。別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号２、５、または７に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

【００９２】

配列番号１、４、もしくは６に示されるＮＯＶヌクレオチド配列に加えて、このＮＯＶポリペプチドのアミノ酸配列における変化を導くＤＮＡ配列多型は、集団（例えば、ヒト集団）内に存在し得ることが、当業者によって理解される。ＮＯＶ遺伝子中のこのような遺伝的多型は、天然の対立遺伝子のバリエーションに起因して、集団内の個体間に存在し得る。本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、ＮＯＶタンパク質、好ましくは脊椎動物のＮＯＶタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含む核酸分子をいう。このような天然の対立遺伝子のバリエーションは、代表的には、ＮＯＶ遺伝子のヌクレオチド配列において１～５％の変動性を生じ得る。天然の対立遺伝子バリエーションの結果であり、そしてこのＮＯＶポリペプチドの機能的活性を変化させない、ＮＯＶポリペプチド内の任意および全てのこのようなヌクレオチドのバリエーションならびに得られるアミノ酸多型は、本発明の範囲内であると意図される。

【００９３】

さらに、他の種由来のＮＯＶタンパク質をコードし、従って、配列番号１、４、もしくは６のヒト配列とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子は、本発明の範囲内にあることが意図される。本発明のＮＯＶのｃＤＮＡの天然の対立遺伝子改変体およびホモログに対応する核酸分子は、本明細書中に開示されるヒトＮＯＶ核酸に対するその相同性に基づいて、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で、標準的なハイブリダイゼーション技術に従うハイブリダイゼーションプローブとしてヒトｃＤＮＡまたはその一部を用いて単離され得る。

【００９４】

従って、別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも６ヌクレオチド長であり、そしてストリンジェント条件下で配列番号１、４、もしくは６のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズする。別の実施形態では、この核酸は、少なくとも１０、２５、５０、１００、２５０、５００、７５０、１０００、１５００、または２０００以上のヌクレオチド長である。なお別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、コード領域にハイブリダイズする。本明細書中で用いられる場合、用語「ストリンジェント条件下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関して、互いに少なくとも６０％相同なヌクレオチド配列が代表的には互いにハイブリダイズしたままである条件を記載することを意図する。

【００９５】

ホモログ（すなわち、ヒト以外の種由来のＮＯＶタンパク質をコードする核酸）または他の関連配列（例えば、パラログ（ｐａｒａｌｏｇｓ））は、特定のヒト配列の全てまたは一部をプローブとし、核酸ハイブリダイゼーションおよびクローニングに関して当該分野で周知の方法を使用して、低い、中程度の、または高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションによって入手され得る。

【００９６】

本明細書で用いられる場合、語句「ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」は、その条件下で、プローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズするが、その他の配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、そして異なる状況で異なる。より長い配列は、より短い配列より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度およびｐＨで、特定の配列の熱融解点（Ｔｍ）より約５℃低いように選択される。このＴｍは、標的配列に相補的なプローブの５０％が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする（規定されたイオン強度、ｐＨおよび核酸濃度下）温度である。標

的配列は一般に過剰で存在するので、Ｔｍでは、５０％のプローブが平衡状態で占有されている。代表的には、ストリンジェントな条件は、ｐＨ７．０～８．３で、塩濃度が約１．０Ｍナトリウムイオンより少なく、代表的には約０．０１～１．０Ｍナトリウムイオン（またはその他の塩）、そして温度が短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド（例えば、１０ｎｔ～５０ｎｔ）について少なくとも約３０℃、そしてより長いプローブ、プライマーおよびオリゴヌクレオチドについて少なくとも約６０℃であるような条件である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドのような、脱安定化剤の添加で達成され得る。

【００９７】

ストリンジェント条件は、当業者に公知であり、そしてＡｕｓｕｂｅｌら（編），ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８９），６．３．１－６．３．６に見出され得る。好ましくは、この条件は、互いに少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８５％、約９０％、約９５％、約９８％または約９９％相同な配列が、代表的には互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。ストリンジェントハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、６×ＳＳＣ、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１ｍＭ ＥＤＴＡ、０．０２％ ＰＶＰ、０．０２％ Ｆｉｃｏｌｌ、０．０２％ ＢＳＡ、および５００ｍｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡを含む高塩緩衝液中での６５℃でのハイブリダイゼーションであり、続いて、０．２×ＳＳＣ、０．０１％ ＢＳＡ中での５０℃での１回以上の洗浄を行う。ストリンジェント条件下で配列番号１、４、もしくは６の配列にハイブリダイズする、本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書中で使用される場合、「天然に存在する」核酸分子とは、天然に存在する（例えば、天然のタンパク質をコードする）ヌクレオチド配列を有する、ＲＮＡ分子またはＤＮＡ分子をいう。

【００９８】

第２の実施形態では、配列番号１、４、６、またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、中程度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸配列が提供される。中程度のストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、５５℃での６×ＳＳＣ、５×デンハルト溶液、０．５％ ＳＤＳおよび１００ｍｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡ中でのハイブリダイゼーション、続いて１×ＳＳＣ、０．１％ ＳＤＳ中での３７℃での１回以上の洗浄である。用いられ得る中程度のストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら（編），１９９３，ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹおよびＫｒｉｅｇｌｅｒ，１９９０，ＧＥＮＥ ＴＲＡＮＳＦＥＲ ＡＮＤ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ，Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹを参照のこと。

【００９９】

第３の実施形態では、配列番号１、４、６、またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸が提供される。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、３５％ホルムアミド、５×ＳＳＣ、５０ ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、５ｍＭ ＥＤＴＡ、０．０２％ ＰＶＰ、０．０２％ Ｆｉｃｏｌｌ、０．２％ ＢＳＡ、１００ｍｇ／ｍｌの変性サケ精子ＤＮＡ、１０％（重量／容量）デキストラン硫酸中での４０℃でのハイブリダイゼーション、続いて２×ＳＳＣ、２５ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、５ｍＭ ＥＤＴＡおよび０．１％ ＳＤＳ中での５０℃での１回以上の洗浄である。用いられ得る低ストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である（例えば、種交差ハイブリダイゼーションについて用いられるように）。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら（編），１９９３，ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹなら

びにＫｒｉｅｇｌｅｒ，１９９０，ＧＥＮＥ ＴＲＡＮＳＦＥＲ ＡＮＤ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ，Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ；ＳｈｉｌｏおよびＷｅｉｎｂｅｒｇ，１９８１，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ７８：６７８９－６７９２を参照のこと。

【０１００】

（保存的変異）

集団中に存在し得る、ＮＯＶ配列の天然に存在する対立遺伝子改変体に加えて、当業者は、配列番号１、４、もしくは６のヌクレオチド配列への変異によって変化が導入され得、それによって、このＮＯＶタンパク質の機能的能力を変更することなく、コードされるＮＯＶタンパク質のアミノ酸配列に変化がもたらされることをさらに理解する。例えば、「非必須」アミノ酸残基にてアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換は、配列番号２、５、もしくは７の配列において行われ得る。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を有意に変更することなく、このＮＯＶタンパク質のの野生型配列から、変更され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、このような生物学的活性に必要とされる。例えば、本発明のＮＯＶタンパク質の間で保存されているアミノ酸残基は、特に変更を受け入れ難いと予測される。保存的置換がなされ得るアミノ酸は、当該分野で周知である。

【０１０１】

本発明の別の局面は、活性に必須ではないアミノ酸残基における変化を含む、ＮＯＶタンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなＮＯＶタンパク質は、アミノ酸配列が、配列番号２、５、もしくは７とは異なるが、生物学的活性をなお保持する。１つの実施形態では、単離された核酸分子は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、このタンパク質は、それぞれ、配列番号２、５、もしくは７のアミノ酸配列に少なくとも約４５％の相同性であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、この核酸分子によってコードされるタンパク質は、配列番号２、５、もしくは７に対して少なくとも約６０％相同であり；よりましくは配列番号２、５、もしくは７に対して少なくとも約７０％相同であり；なおより好ましくは、配列番号２、５、もしくは７に対してして少なくとも約８０％相同であり；なおより好ましくは、配列番号２、５、もしくは７に対して少なくとも約９０％相同であり；そして最も好ましくは、配列番号２、５、もしくは７に対して少なくとも約９５％相同である。

【０１０２】

配列番号２、５、もしくは７のタンパク質に相同なＮＯＶタンパク質をコードする単離された核酸分子は、配列番号１、４、もしくは６のヌクレオチド配列に１以上のヌクレオチドの置換、付加または欠失を導入することにより作製され得、その結果、１以上のアミノ酸の置換，付加または欠失が、コードされるタンパク質に導入される。

【０１０３】

変異は、標準技術（例えば、部位特異的変異誘発およびＰＣＲ媒介変異誘発）によって配列番号２、５、もしくは７に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換が、１以上の推定非必須アミノ酸残基にて作製される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される、アミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。これらのファミリーとしては、以下が挙げられる：塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アルパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）。従って、ＮＯＶタンパク質中の推定された非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖のファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態では、変異は、ＮＯＶコード配列の全てまたは一部に沿って（例えば、飽和変異誘発（

ｓａｔｕｒａｔｉｏｎ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）によって）ランダムに導入され得、そして得られる変異体は、ＮＯＶの生物学的活性についてスクリーニングされて、活性を維持する変異体を同定し得る。配列番号２、５、もしくは７の変異誘発に続いて、コードされるタンパク質は、当該分野で公知の任意の組換え技術によって発現され得、そしてこのタンパク質の活性が決定され得る。

【０１０４】

１つの実施形態では、変異ＮＯＶタンパク質は、以下についてアッセイされ得る：（ｉ）他のＮＯＶタンパク質、他の細胞表面タンパク質、または生物学的に活性なそれらの部分と、タンパク質：タンパク質相互作用を形成する能力、（ｉｉ）変異ＮＯＶタンパク質と、ＮＯＶのリガンドとの間の複合体形成；（ｉｉｉ）変異ＮＯＶタンパク質が細胞内標的タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する能力；（例えば、アビジンタンパク質）。なお別の実施形態において、変異体ＮＯＶタンパク質は、特定の生物学的機能を調節する能力（例えば、インスリン放出の能力）についてアッセイされ得る。

【０１０５】

（アンチセンス核酸）

本発明の別の局面は、配列番号１、４、６、またはそのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズし得るかまたは相補的である、単離されたアンチセンス核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的である（例えば、二本鎖ｃＤＮＡ分子のコード鎖に相補的であるかまたはｍＲＮＡ配列に相補的である）ヌクレオチド配列を含む。特定の局面では、少なくとも約１０、約２５、約５０、約１００、約２５０もしくは約５００ヌクレオチドまたは全体のＮＯＶコード鎖、またはそれらの一部のみに相補的な配列を含む、アンチセンス核酸分子が提供される。配列番号２、５、もしくは７のＮＯＶタンパク質のフラグメント、ホモログ、誘導体およびアナログをコードする核酸分子、または配列番号１、４、もしくは６のＮＯＶ核酸配列に相補的なアンチセンス核酸がさらに提供される。１つの実施形態では、アンチセンス核酸分子は、ＮＯＶタンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。用語「コード領域」とは、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含む、ヌクレオチド配列の領域をいう。別の実施形態では、このアンチセンス核酸分子は、ＮＯＶタンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対してアンチセンスである。用語「非コード領域」とは、コード領域に隣接する、アミノ酸に翻訳されない、５’配列および３’配列をいう（すなわち、５’非翻訳領域および３’非翻訳領域ともいわれる）。

【０１０６】

本明細書中に開示されるＮＯＶタンパク質をコードするコード鎖配列を考慮すれば、本発明のアンチセンス核酸は、ＷａｔｓｏｎおよびＣｒｉｃｋまたはＨｏｏｇｓｔｅｅｎの塩基対合の規則に従って設計され得る。アンチセンス核酸分子は、ＮＯＶ　ｍＲＮＡのコード領域全体に相補的であり得るが、より好ましくは、ＮＯＶ　ｍＲＮＡのコード領域または非コード領域の一部にのみアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＮＯＶ　ｍＲＮＡの翻訳開始部位を取り囲む領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さが約５、約１０、約１５、約２０、約２５、約３０、約３５、約４０、約４５または約５０ヌクレオチドであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を用いて、化学的合成または酵素連結反応を用いて構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド、またはこの分子の生物学的安定性を増大させるように、もしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成される二重鎖の物理的安定性を増大させるように設計された種々に改変されたヌクレオチドを用いて化学的に合成され得る（例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが用いられ得る）。

【０１０７】

アンチセンス核酸を作製するために用いられ得る改変されたヌクレオチドの例としては以

下が挙げられる：５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－クロロウラシル、５－ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、４－アセチルシトシン、５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β－Ｄ－ガラクトシルクエオシン（ｇａｌａｃｔｏｓｙｌｑｕｅｏｓｉｎｅ）、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチルグアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－アデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルクエオシン（ｍａｎｎｏｓｙｌｑｕｅｏｓｉｎｅ）、５’－メトキシカルボキシメチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、ワイブトキソシン、シュードウラシル、クエオシン（ｑｕｅｏｓｉｎｅ）、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、５－メチル－２－チオウラシル、３－（３－アミノ－３－Ｎ－２－カルボキシプロピル）ウラシル、（ａｃｐ３）ｗ、および２，６－ジアミノプリン。あるいは、このアンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向でサブクローニングされた発現ベクターを用いて生物学的に生成され得る（すなわち、挿入された核酸から転写されたＲＮＡは、以下の小節にさらに記載される、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向である）。

【０１０８】

本発明のアンチセンス核酸分子は、代表的には被験体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、その結果それらは、ＮＯＶタンパク質をコードする細胞性ｍＲＮＡおよび／またはゲノムＤＮＡとハイブリダイズするか、またはそれに結合し、それによってこのタンパク質の発現を阻害する（例えば、転写および／または翻訳を阻害することによって）。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成する従来のヌクレオチド相補性によってか、または例えばＤＮＡ二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんのメジャーグルーブ（ｍａｊｏｒ　ｇｒｏｏｖｅ）における特異的相互作用を介してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接的注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的化するように改変され得、次いで全身に投与される。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、それらが選択された細胞表面上に発現されたレセプターまたは抗原に特異的に結合するように改変され得る（例えば、そのアンチセンス核酸分子を細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することによって）。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中に記載されるベクターを用いて細胞に送達され得る。十分な核酸分子を達成するために、アンチセンス核酸分子が強力なｐｏｌ　ＩＩプロモーターまたはｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターの制御下に置かれているベクター構築物が、好ましい。

【０１０９】

なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸分子は、α－アノマー核酸分子である。α－アノマー核酸分子は、相補的ＲＮＡと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成し、ここで、通常のα－ユニットとは対照的に、鎖は、互いに平行に走行する（例えば、Ｇａｕｌｔｉｅｒら，１９８７，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１５：６６２５－６６４１を参照のこと）。このアンチセンス核酸分子はまた、２’－ｏ－メチルリボヌクレオチド（例えば、Ｉｎｏｕｅら，１９８７，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１５：６１３１～６１４８を参照のこと）またはキメラＲＮＡ－ＤＮＡアナログ（例えば、Ｉｎｏｕｅら，１９８７，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．２１５：３２７～３３０を参照のこと）を含み得る。

【０１１０】

（リボザイムおよびＰＮＡ部分）

核酸の改変としては、非制限的な例として、改変塩基、および糖リン酸バックボーンが改変または誘導体化された核酸が挙げられる。これらの改変は、少なくとも一部は、改変された核酸の化学的安定性を増強するために実施され、その結果、それらは、例えば、被験

体での治療的適用におけるアンチセンス結合核酸として使用され得る。

【０１１１】

１つの実施形態において、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、一本鎖核酸（例えば、ｍＲＮＡ）を切断し得るリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性ＲＮＡ分子であり、これらは、その一本鎖核酸に対して相補領域を有する。従って、リボザイム（例えば、ＨａｓｅｌｈｏｆｆおよびＧｅｒｌａｃｈ　１９８８．Ｎａｔｕｒｅ　３３４：５８５－５９１に記載されるハンマーヘッド型リボザイム）を使用して、ＮＯＶ　ｍＲＮＡ転写物を触媒的に切断し、それによってＮＯＶ　ｍＲＮＡの翻訳を阻害し得る。ＮＯＶをコードする核酸に特異性を有するリボザイムは、本明細書中に開示されるＮＯＶ　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（すなわち、配列番号１、４、もしくは６）に基づいて設計され得る。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、ＮＯＶをコードするｍＲＮＡ内で切断されるヌクレオチド配列に相補的である、テトラヒメナＬ－１９　ＩＶＳ　ＲＮＡの誘導体が構築され得る。例えば、Ｃｅｃｈらの米国特許第４，９８７，０７１号およびＣｅｃｈらの米国特許第５，１１６，７４２号を参照のこと。ＮＯＶ　ｍＲＮＡをまた使用して、ＲＮＡ分子のプールから、特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒性ＲＮＡを選択し得る。例えば、Ｂａｒｔｅｌら（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６１：１４１１～１４１８を参照のこと。

【０１１２】

あるいは、ＮＯＶ遺伝子発現は、ＮＯＶ核酸の調節領域（例えば、ＮＯＶのプロモーターおよび／またはエンハンサー）に相補的なヌクレオチド配列を標的化し、標的細胞中でＮＯＶ遺伝子の転写を妨害する三重らせん構造を形成することによって阻害され得る。例えば、Ｈｅｌｅｎｅ，１９９１．Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｓ．６：５６９～８４；Ｈｅｌｅｎｅら．１９９２．Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６０：２７－３６；Ｍａｈｅｒ，１９９２．Ｂｉｏａｓｓａｙｓ　１４：８０７－１５を参照のこと。

【０１１３】

種々の実施形態において、ＮＯＶ核酸は、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格で改変され、例えば、その分子の安定性、ハイブリダイゼーションまたは可溶性を改善し得る。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格を改変して、ペプチド核酸を生成し得る（例えば、Ｈｙｒｕｐら，１９９６．Ｂｉｏｏｒｇ　Ｍｅｄ　Ｃｈｅｍ　４：５－２３を参照のこと）。本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド核酸」または「ＰＮＡ」は、デオキシリボースリン酸骨格が偽ペプチド骨格によって置換され、そして４つの天然の核塩基（ｎｕｃｌｅｏｂａｓｅ）のみが保持されている核酸模倣物（例えば、ＤＮＡ模倣物）をいう。ＰＮＡの中性の骨格は、低いイオン強度の条件下でＤＮＡおよびＲＮＡに対する特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。ＰＮＡオリゴマーの合成は、Ｈｙｒｕｐら，１９９６．前出；Ｐｅｒｒｙ－Ｏ’Ｋｅｅｆｅら，１９９６．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：１４６７０－１４６７５において記載されるような標準的固相ペプチド合成プロトコルを用いて行われ得る。

【０１１４】

ＮＯＶのＰＮＡは、治療的適用および診断的適用において使用され得る。例えば、ＰＮＡは、例えば転写または翻訳の停止を誘導することまたは複製を阻害することによる、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンスまたは抗遺伝子剤として使用され得る。ＮＯＶのＰＮＡはまた、例えばＰＮＡ指向性ＰＣＲクランピングによる遺伝子における一塩基対変異の分析において；他の酵素（例えば、Ｓ１ヌクレアーゼ）と組み合わせて使用される場合の人工制限酵素として（Ｈｙｒｕｐ　Ｂ．ら，１９９６．前出を参照のこと）；またはＤＮＡ配列およびハイブリダイゼーションのプローブもしくはプライマーとして（Ｈｙｒｕｐら，１９９６，前出；Ｐｅｒｒｙ－Ｏ’Ｋｅｅｆｅら，１９９６，前出を参照のこと）、使用され得る。

【０１１５】

別の実施形態において、ＮＯＶのＰＮＡは、例えば、それらの安定性または細胞性取り込みを増強するために、ＰＮＡに脂溶性基または他のヘルパー基を結合することによって、

ＰＮＡ－ＤＮＡキメラの形成によって、またはリポソームもしくは当該分野において公知の薬物送達の他の技術の使用によって改変され得る。例えば、ＰＮＡおよびＤＮＡの有利な特性を組合せ得る、ＮＯＶのＰＮＡ－ＤＮＡキメラが生成され得る。ＰＮＡ部分が高い結合親和性および特異性を提供する一方で、そのようなキメラは、ＤＮＡ認識酵素（例えば、ＲＮａｓｅ　ＨおよびＤＮＡポリメラーゼ）がＤＮＡ部分と相互作用するのを可能にする。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラは、塩基のスタッキング、核塩基間の結合数および方向を考慮して選択される適切な長さのリンカーを使用して連結され得る（Ｈｙｒｕｐら，１９９６，前出を参照のこと）。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラの合成は、Ｈｙｒｕｐら，１９９６，前出およびＦｉｎｎら，１９９６，Ｎｕｃｌ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　２４：３３５７－３３６３において記載されるように行われ得る。例えば、ＤＮＡ鎖は、標準的なホスホラミダイトカップリング化学を用いて固体支持体上で合成され得、そして改変されたヌクレオシドアナログ（例えば、５’－（４－メトキシトリチル）アミノ－５’－デオキシ－チミジンホスホルアミダイト）が、ＰＮＡとＤＮＡの５’末端との間に使用され得る（Ｍａｇら，１９８９，Ｎｕｃｌ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ　１７：５９７３～５９８８を参照のこと）。次いで、ＰＮＡモノマーが段階様式でカップリングされ、５’ＰＮＡセグメントおよび３’ＤＮＡセグメントを有するキメラ分子を生成する（Ｆｉｎｎら，１９９６，前出を参照のこと）。あるいは、５’ＤＮＡセグメントおよび３’ＰＮＡセグメントを用いて、キメラ分子が合成され得る。例えば、Ｐｅｔｅｒｓｅｎら，１９７５，）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．５：１１１９～１１１２４を参照のこと。

【０１１６】

他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、以下のような他の付属の基を含み得る：ペプチド（例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的化するため）、または細胞膜を横切る輸送を容易にする因子（例えば、Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒら、１９８９、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８６：６５５３～６５５６；Ｌｅｍａｉｔｒｅら、１９８７、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８４：６４８～６５２；ＰＣＴ公開番号ＷＯ８８／０９８１０を参照のこと）、または血液脳関門（例えば、ＰＣＴ公開番号ＷＯ８９／１０１３４を参照のこと）。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発切断剤（例えば、Ｋｒｏｌら、１９８８、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　６：９５８～９７６を参照のこと）、またはインターカレーター剤（例えば、Ｚｏｎ，１９８８、Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．５：５３９～５４９を参照のこと）で改変され得る。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発切断剤など）に結合され得る。

【０１１７】

（ＮＯＶポリペプチド）

本発明に従うポリペプチドは、配列が配列番号２、５、または７に提供されるＮＯＶタンパク質のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。本発明はまた、なおそのＮＯＶ活性および生理学的機能を維持するタンパク質、またはその機能的フラグメントをコードするが、その任意の残基が配列番号２、５、または７に示される対応する残基から変化し得る、変異体または改変体タンパク質を含む。

【０１１８】

一般に、ＮＯＶ様機能を保持するＮＯＶ改変体は、配列中の特定位置の残基が他のアミノ酸により置換され、そしてさらに、親タンパク質の２つの残基間にさらなる残基を挿入する可能性、および親配列から１つ以上の残基を欠失する可能性を含む。任意のアミノ酸置換、挿入または欠失が、本発明に包含される。好適な状況では、この置換は、上記で規定されるような保存的置換である。

【０１１９】

本発明の１つの局面は、単離されたＮＯＶタンパク質、およびその生物学的に活性な部分、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに関する。抗ＮＯＶ抗体を惹起するための免疫原としての使用のために適切なポリペプチドフラグメントもま

た提供される。１つの実施形態において、ネイティブなＮＯＶタンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を用いる適切な精製スキームによって、細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態において、ＮＯＶタンパク質は、組換えＤＮＡ技術によって産生される。組換え発現に代わるものとして、ＮＯＶタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技術を用いて化学合成され得る。

【０１２０】

「単離された」または「精製された」ポリペプチドまたはタンパク質あるいはその生物学的に活性な部分は、ＮＯＶタンパク質の由来する細胞または組織供給源由来の細胞性物質または他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、あるいは化学合成される場合に化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、ＮＯＶタンパク質の調製物を含み、この調製物において、ＮＯＶタンパク質が単離または組換え産生される細胞の細胞性成分から、ＮＯＶタンパク質は分離されている。１つの実施形態において、用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、非ＮＯＶタンパク質（本明細書中において「夾雑タンパク質」とも呼ばれる）を約３０％未満（乾燥重量にて）、より好ましくは非ＮＯＶタンパク質を約２０％未満、なおより好ましくは非ＮＯＶタンパク質を約１０％未満、そして最も好ましくは非ＮＯＶタンパク質を約５％未満有する、ＮＯＶタンパク質の調製物を含む。ＮＯＶタンパク質またはその生物学的に活性な部分が組換え産生される場合、好ましくは、調製物はまた培養培地を実質的に含まない。すなわち、培養培地は、そのタンパク質調製物の容量の約２０％未満、より好ましくは約１０％未満、そして最も好ましくは約５％未満を示す。

【０１２１】

用語「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、タンパク質が、そのタンパク質の合成に関与する化学前駆体または他の化学物質から分離されているＮＯＶタンパク質の調製物を含む。１つの実施形態において、用語「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、化学前駆体または非ＮＯＶの化学物質を約３０％未満（乾燥重量にて）、より好ましくは化学前駆体または非ＮＯＶ化学物質を約２０％未満、なおより好ましくは化学前駆体または非ＮＯＶ化学物質を約１０％未満、そして最も好ましくは化学前駆体または非ＮＯＶ化学物質を約５％未満有する、ＮＯＶタンパク質の調製物を含む。

【０１２２】

ＮＯＶタンパク質の生物学的に活性な部分は、全長ＮＯＶタンパク質より少ないアミノ酸を含み、そしてＮＯＶタンパク質の少なくとも１つの活性を示す、ＮＯＶタンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号２、５、または７に示されるアミノ酸配列）に十分に相同なアミノ酸配列、またはＮＯＶタンパク質のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含むペプチドを含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、ＮＯＶタンパク質の少なくとも１つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。ＮＯＶタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、長さが１０、２５、５０、１００またはそれより多いアミノ酸残基であるポリペプチドであり得る。さらに、タンパク質の他の領域が欠失している他の生物学的に活性な部分は、組換え技術によって調製され得、そしてネイティブなＮＯＶタンパク質の機能的活性のうちの１つ以上について評価され得る。

【０１２３】

１つの実施形態において、ＮＯＶタンパク質は、配列番号２、５、または７に示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態において、ＮＯＶタンパク質は、配列番号２、５、または７に実質的に相同であり、そして以下に詳細に議論されるように、天然の対立遺伝子改変体または変異誘発に起因してアミノ酸配列が異なるが、配列番号２、５、または７のタンパク質の機能的活性を保持する。従って、別の実施形態において、ＮＯＶタンパク質は、配列番号２、５、または７のアミノ酸配列に少なくとも約４５％相同なアミノ酸配列を含み、そして、配列番号２、５、または７のＮＯＶタンパク質の機能的活性を保持するタンパク質である。

【０１２４】

（２つ以上の配列間の相同性の決定）

２つのアミノ酸配列または２つの核酸の相同性の百分率を決定するために、配列は、至適な比較の目的のために整列される（例えば、ギャップは、第２のアミノ酸または核酸配列との最適な整列のために、第１のアミノ酸または核酸配列に導入され得る）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でのアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第１の配列中の位置が、第２の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められる場合、分子はその位置で相同である（すなわち、本明細書中で使用される場合、アミノ酸または核酸の「相同性」は、アミノ酸または核酸の「同一性」と等価である）。

【０１２５】

核酸配列の相同性は、２つの配列間の同一性の程度として決定され得る。相同性は、当該分野において公知のコンピュータープログラム（例えば、ＧＣＧプログラムパッケージにおいて提供されるＧＡＰソフトウェア）を用いて決定され得る。Ｎｅｅｄｌｅｍａｎおよびｗｕｎｓｃｈ，１９７０ Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ４８：４４３～４５３を参照のこと。核酸配列比較のための以下の設定（ＧＡＰ作製ペナルティー、５．０、およびＧＡＰ伸長ペナルティー、０．３）を用いてＧＣＧ ＧＡＰソフトウェアを使用すると、上記で言及される類似の核酸配列のコード領域は、配列番号１、４、または６に示されるＤＮＡ配列のＣＤＳ（コード）部分と、好ましくは少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または９９％の同一性の程度を示す。

【０１２６】

用語「配列同一性」は、２つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列が、特定の比較領域にわたって、残基毎を基準として同一である程度をいう。用語「配列同一性のパーセンテージ」は、以下により算出される：この比較領域にわたって最適に整列された２つの配列を比較すること、両方の配列において同一の核酸塩基（例えば、核酸の場合にはＡ、Ｔ、Ｃ、Ｇ、Ｕ、またはＩ）が存在する位置の数を決定し、一致した位置の数を導くこと、この一致した位置の数を、比較領域の内の位置の総数（すなわち、ウインドウサイズ）で除算すること、およびその結果を１００で乗算して、配列同一性のパーセンテージを導くこと。用語「実質的な同一性」は、本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチド配列の特徴を示し、ここでこのポリヌクレオチドは、比較領域にわたり参照配列と比較して、少なくとも８０％の配列同一性、好ましくは少なくとも８５％の配列同一性、そして頻繁には９０～９５％の配列同一性、より通常には少なくとも９９％の配列同一性を有する配列を含む。

【０１２７】

（キメラタンパク質および融合タンパク質）

本発明はまた、ＮＯＶキメラタンパク質または融合タンパク質を提供する。本明細書中で使用される場合、ＮＯＶ「キメラタンパク質」またはＮＯＶ「融合タンパク質」は、非ＮＯＶポリペプチドに作動可能に連結された、ＮＯＶポリペプチドを含む。「ＮＯＶポリペプチド」は、ＮＯＶタンパク質（配列番号２、５，または７）に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいうが、「非ＮＯＶポリペプチド」は、ＮＯＶタンパク質に対して実質的に相同ではないタンパク質（例えば、ＮＯＶタンパク質とは異なり、かつ同一でかまたは異なる生物体に由来するタンパク質）に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。ＮＯＶ融合タンパク質において、このＮＯＶポリペプチドは、ＮＯＶタンパク質のすべてまたは一部分に対応し得る。１つの実施形態では、ＮＯＶ融合タンパク質は、ＮＯＶタンパク質の少なくとも１つの生物学的に活性な部分を含む。別の実施形態では、ＮＯＶ融合タンパク質は、ＮＯＶタンパク質の少なくとも２つの生物学的に活性な部分を含む。なお別の実施形態においてＮＯＶ融合タンパク質は、少なくとも３つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結された」は、ＮＯＶポリペプチドおよび非ＮＯＶポリペプチドが、インフレームで互いに融合されていることを示すことが意図される。非ＮＯＶポリペプチドは、ＮＯＶポリペプチドのＮ末端またはＣ末端に融合され得る。

【０１２８】

１つの実施形態においては、この融合タンパク質は、ＧＳＴ－ＮＯＶ融合タンパク質であり、ここではＮＯＶ配列が、ＧＳＴ（グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ）配列のＣ末端に融合される。このような融合タンパク質は、組換えＮＯＶポリペプチドの精製を容易にし得る。別の実施形態において、この融合タンパク質は、Ｎ末端に異種シグナル配列を含むＮＯＶタンパク質である。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）において、ＮＯＶの発現および／または分泌は、異種シグナル配列の使用を介して増加され得る。

【０１２９】

なお別の実施形態において、この融合タンパク質は、ＮＯＶ－免疫グロブリン融合タンパク質であり、ここで、ＮＯＶ配列が、免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合される。本発明のこのＮＯＶ－免疫グロブリン融合タンパク質は、薬学的組成物中に取り込まれ、そして被験体に投与されて、細胞の表面上でＮＯＶリガンドとＮＯＶタンパク質との間の相互作用を阻害し、それによってインビボのＮＯＶ媒介信号伝達を抑制し得る。このＮＯＶ－免疫グロブリン融合タンパク質を用い、ＮＯＶ同族リガンドの生体利用性に影響を与え得る。ＮＯＶリガンド／ＮＯＶ相互作用の阻害は、増殖障害および分化障害の両方の処置、および細胞生存を調節（例えば、促進または阻害）することに、治療的に有用であり得る。さらに、本発明のこのＮＯＶ－免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体中で抗ＮＯＶ抗体を産生するための免疫原として用いられ得、ＮＯＶリガンドを精製し、そしてＮＯＶリガンドとのＮＯＶの相互作用を阻害する分子を同定するスクリーニングアッセイで用いられ得る。

【０１３０】

本発明のＮＯＶキメラまたは融合タンパク質は、標準的な組換えＤＮＡ技法により産生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするＤＮＡフラグメントを、従来の技法に従って、例えば、連結のための平滑末端または粘着（ｓｔａｇｇｅｒ）末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じて粘着（ｃｏｈｅｓｉｖｅ）末端のフィルイン、所望しない連結を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結を採用することにより、インフレームで一緒に連結する。別の実施形態では、融合遺伝子を、自動化ＤＮＡ合成機を含む従来技法により合成し得る。あるいは、遺伝子フラグメントのＰＣＲ増幅を、キメラ遺伝子配列を生成するために次いでアニールおよび再増幅され得る、２つの連続遺伝子フラグメント間の相補的オーバハングを生じるアンカープライマーを用いて実施し得る（例えば、Ａｕｓｂｅｌら（編）ＣＵＲＲＥＮＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ　ＩＮ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＩＯＬＯＧＹ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、１９９２を参照のこと）。さらに、融合成分（例えば、ＧＳＴポリペプチド）をすでにコードした多くの発現ベクターが市販されている。ＮＯＶをコードする核酸は、この融合成分がＮＯＶタンパク質にインフレーム連結されるように、このような発現ベクター中にクローン化され得る。

【０１３１】

（ＮＯＶアゴニストおよびアンタゴニスト）

本発明はまた、ＮＯＶアゴニスト（模倣物）として、またはＮＯＶアンタゴニストとして機能するＮＯＶタンパク質の改変体に関する。ＮＯＶタンパク質の改変体（例えば、ＮＯＶタンパク質の離散した点変異または短縮型）が、変異誘発により生成され得る。ＮＯＶタンパク質のアゴニストは、天然に存在する形態のＮＯＶタンパク質と実質的に同じ生物学的活性、またはその生物学的活性のサブセットを保持し得る。ＮＯＶタンパク質のアンタゴニストは、天然に存在する形態のＮＯＶタンパク質の１つ以上の活性を、例えば、ＮＯＶタンパク質を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流または上流メンバーに競合的に結合することにより阻害し得る。従って、特異的生物学的効果が、限られた機能の改変体を用いた処理により惹起され得る。１つの実施形態では、このタンパク質の天然に存在する形態の生物学活性のサブセットを有する改変体を用いた被験体の処置は、ＮＯＶタンパク質の天然に存在する形態を用いた処置に対して被験体におけるより少ない副作用を有する。

【０１３２】

ＮＯＶアゴニスト（模倣物）として、またはＮＯＶアンタゴニストのいずれかとして機能するＮＯＶタンパク質の改変体は、ＮＯＶタンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト活性のためのＮＯＶタンパク質の変異体（例えば短縮型変異体）のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより同定され得る。１つの実施形態では、ＮＯＶ改変体の多彩なライブラリーは、核酸レベルのコンビナトリアル変異誘発により生成され、そして多彩な遺伝子ライブラリーによりコードされる。ＮＯＶ改変体の多彩なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を、潜在的なＮＯＶ配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、あるいは、その中にＮＯＶ配列のセットを含む（例えば、ファージディスプレイのための）より大きな融合タンパク質のセットとして発現可能であるように、遺伝子配列に酵素的に連結することにより産生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的なＮＯＶ改変体のライブラリーを産生するために用いられ得る種々の方法がある。縮重遺伝子配列の化学的合成は、自動化ＤＮＡ合成機中で実施され得、次いでこの合成遺伝子は、適切な発現ベクター中に連結される。遺伝子の縮重セットの使用は、１つの混合物において、潜在的なＮＯＶ配列の所望のセットをコードする配列のすべての供給を可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成する方法は当該分野で周知である。例えば、Ｎａｒａｎｇ，１９８３．Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ ３９：３；Ｉｔａｋｕｒａら，１９８４．Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５３：３２３；Ｉｔａｋｕｒａら，１９８４．Ｓｃｉｅｎｃｅ １９８：１０５６；Ｉｋｅら，１９８３．Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１１：４７７を参照のこと。

【０１３３】

（ポリペプチドライブラリー）

さらに、ＮＯＶタンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーを用いて、ＮＯＶタンパク質の改変体のスクリーニングおよび引き続く選択のためのＮＯＶフラグメントの多彩な集団を生成し得る。１つの実施形態では、コード配列フラグメントのライブラリーは、ＮＯＶコード配列の二本鎖ＰＣＲフラグメントを、１分子あたり約１つのみのニックが生じる条件下、ヌクレアーゼで処理すること、二本鎖ＤＮＡを変性させること、異なるニック産物からのセンス／アンチセンス対を含み得る二本鎖ＤＮＡを形成するためにこのＤＮＡを再生すること、Ｓ１ヌクレアーゼを用いた処理により再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去すること、および得られるフラグメントライブラリーを発現ベクター中に連結することにより生成し得る。この方法により、ＮＯＶタンパク質の種々のサイズのＮ末端および内部フラグメントをコードする発現ライブラリーが派生し得る。

【０１３４】

点変異または短縮により作成されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、選択された性質を有する遺伝子産物のｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするための種々の技術が当該分野で公知である。このような技法を、ＮＯＶタンパク質のコンビナトリアル変異誘発により生成された遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、高スループット分析に適した最も広く用いられる技法は、代表的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター中にクローニングすること、得られるベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、およびこのコンビナトリアル遺伝子を、所望の活性の検出が、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下で発現することを含む。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増大する新規技法であるリクルーシブエンセブル変異誘発（ＲＥＭ）を、スクリーニングアッセイと組み合わせて用い、ＮＯＶ改変体を同定し得る。例えば、ＡｒｋｉｎおよびＹｏｕｒｖａｎ，１９９２．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：７８１１－７８１５；Ｄｅｌｇｒａｖｅら，１９９３．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ６：３２７－３３１を参照のこと。

【０１３５】

（抗ＮＯＶ抗体）

本発明は、本発明の任意のＮＯＶポリペプチドに免疫特異的に結合する、Ｆａｂまたは（

Ｆａｂ）$_2$のような抗体または抗体フラグメントを包含する。

【０１３６】

単離されたＮＯＶタンパク質、またはその部分もしくはフラグメントは、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体調製のための標準的な技術を用いて、ＮＯＶポリペプチドに結合する抗体を産生するための免疫原として用いられ得る。完全長のＮＯＶタンパク質が用いられ得るが、あるいは、本発明は、免疫原としての使用のためのＮＯＶタンパク質の抗原性ペプチドフラグメントを提供する。ＮＯＶの抗原性ペプチドは、配列番号２、５または７で示されるアミノ酸配列の少なくとも４アミノ酸残基を含み、そしてこのペプチドに対して惹起された抗体がＮＯＶと特異的な免疫複合体を形成するように、ＮＯＶのエピトープを含む。好ましくは、この抗原性ペプチドは、少なくとも６、８、１０、１５、２０、または３０個のアミノ酸残基を含む。より長い抗原性ペプチドが、用途に依存して、そして当業者に周知の方法に従い、より短い抗原性ペプチドよりもしばしば好適である。

【０１３７】

本発明の特定の実施形態では、抗原性ペプチドに含まれる少なくとも１つのエピトープは、タンパク質の表面上に位置するＮＯＶの領域、例えば、親水性領域である。抗体産生を標的にする手段として、親水性および疎水性の領域を示すヒドロパシープロットを、例えば、フーリエ変換を伴うかまたは伴わない、Ｋｙｔｅ　Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅまたは Ｈｏｐｐ　Ｗｏｏｄｓ法を含む、当該分野で周知の任意の方法により生成し得る。例えば、それらの全体が本明細書に参考として援用される、例えば、ＨｏｐｐおよびＷｏｏｄｓ、１９８１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：３８２４－３８２８；ＫｙｔｅおよびＤｏｏｌｉｔｔｌｅ　１９８２、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５７：１０５－１４２を参照のこと。この各々が、それらの全体において、本明細書中で参考として援用される。

【０１３８】

本明細書で開示されるように、配列番号２、５、７のＮＯＶタンパク質配列、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログを、これらのタンパク質成分に免疫特異的に結合する抗体の産生における免疫原として利用し得る。本明細書で用いる用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、ＮＯＶのような抗原に特異的に結合（免疫反応）する抗原結合部位を含む分子をいう。このような抗体は、制限されずに、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、ＦａｂおよびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント、およびＦａｂ発現ライブラリーを含む。特定の実施形態では、ヒトＮＯＶタンパク質に対する抗体が開示される。当該分野で公知の種々の手順が、配列番号２、５、７のＮＯＶタンパク質配列、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体の産生のために用いられ得る。これらのタンパク質のいくつかを以下で論議する。

【０１３９】

ポリクローナル抗体の産生のために、種々の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたはその他の哺乳動物）が、ネイティブタンパク質、またはその合成改変体、または前述の誘導体での注射により免疫され得る。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換えにより発現されたＮＯＶタンパク質または化学的に合成されたＮＯＶポリペプチドを含有し得る。この調製物は、アジュバントをさらに含み得る。免疫学的応答を増大するために用いられる種々のアジュバントは、制限されずに、フロイントの完全および不完全アジュバント、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、ジニトロフェノールなど）、Ｂａｃｉｌｌｅ　Ｃａｌｍｅｔｔｅ－ＧｕｅｒｉｎおよびＣｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｐａｒｖｕｍのようなヒトアジュバント、または類似の免疫刺激剤を含む。所望であれば、ＮＯＶに対して惹起された抗体分子は、哺乳動物（例えば、血液）から単離され、そしてさらに、ＩｇＧ画分を得るために、プロテインＡクロマト

グラフィーのような、周知の技術により精製され得る。

【０１４０】

本明細書で用いられる用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、ＮＯＶの特定のエピトープと免疫反応し得る、１種類の抗原結合部位のみを含む抗体分子の集団をいう。従って、代表的には、モノクローナル抗体組成物は、それと免疫反応する特定のＮＯＶタンパク質に対し、単一の結合親和性を示す。特定のＮＯＶタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに対して惹起されたモノクローナル抗体の調製には、継続的な細胞株培養による抗体分子の産生を提供する任意の技術が利用され得る。このような技術は、制限されずに、ハイブリドーマ技術（例えば、Ｋｏｈｌｅｒ&Ｍｉｌｓｔｅｉｎ、１９７５ Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５－４９７を参照のこと）；トリオーマ（ｔｒｉｏｍａ）技術；ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（例えば、Ｋｏｚｂｏｒら、１９８３ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ ４：７２）およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのＥＢＶハイブリドーマ技術（例えば、Ｃｏｌｅら、１９８５ ＭＯＮＯＣＬＯＮＡＬ ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ ＡＮＤ ＣＡＮＣＥＲ ＴＨＥＲＡＰＹ、Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．７７－９６頁を参照のこと）を含む。ヒトモノクローナル抗体を、本発明の実施において利用し得、そしてヒトハイブリドーマを用いることによるか（例えば、Ｃｏｔｅら、１９８３．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８０：２０２６－２０３０を参照のこと）、またはインビトロでヒトＢ細胞をエプスタイン－バーウイルスで形質転換することにより（例えば、Ｃｏｔｅら、１９８５ ＭＯＮＯＣＬＯＮＡＬ ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ ＡＮＤ ＣＡＮＣＥＲ ＴＨＥＲＡＰＹ、Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．７７－９６頁を参照のこと）産生し得る。上記の引用の各々は、それらの全体が参考として本明細書に援用される。

【０１４１】

本発明によれば、技術は、ＮＯＶタンパク質に特異的な単鎖抗体の産生のために適合され得る（例えば、米国特許第４，９４６，７７８号を参照のこと）。さらに、方法は、Ｆａｂ発現ライブラリーの構築のために適合されて（例えば、Ｈｕｓｅら、１９８９ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４６：１２７５－１２８１を参照のこと）、ＮＯＶタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに対する所望の特異性を有するモノクローナルＦａｂフラグメントの迅速かつ有効な同定を可能にし得る。非ヒト抗体は、当該分野で周知の技術により「ヒト化」され得る。例えば、米国特許第５，２２５，５３９号を参照のこと。ＮＯＶタンパク質に対するイディオタイプを含む抗体フラグメントを、当該分野で公知の技術により産生し得、これには、制限されないで：（ｉ）抗体分子のペプシン消化により産生されるＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント；（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより産生されるＦａｂフラグメント；（ｉｉｉ）抗体分子のパパインおよび還元剤での処理により産生されるＦａｂフラグメント；ならびに（ｉｖ）Ｆｖフラグメントが含まれる。

【０１４２】

さらに、ヒトおよび非ヒト部分の両方を含むキメラ抗体およびヒト化モノクローナル抗体のような、組換え抗ＮＯＶ抗体（これらは、標準的な組換えＤＮＡ技術を用いて作製され得る）は、本発明の範囲内である。このようなキメラ抗体およびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えＤＮＡ技術により産生され得る。この技術は例えば、以下に記載の方法を用いる：国際出願番号ＰＣＴ／ＵＳ８６／０２２６９；欧州特許出願番号１８４，１８７号；欧州特許出願番号１７１，４９６；欧州特許出願番号１７３，４９４；ＰＣＴ国際公開番号ＷＯ ８６／０１５３３；米国特許第４，８１６，５６７号；米国特許第５，２２５，５３９号；欧州特許出願番号１２５，０２３号；Ｂｅｔｔｅｒら（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１０４１～１０４３；Ｌｉｕら（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：３４３９～３４４３；Ｌｉｕら（１９８７）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３９：３５２１～３５２６；Ｓｕｎら（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：２１４～２１８；Ｎｉｓｈｉｍｕｒａら（１９８７）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ４７：９９９～１００５；Ｗｏｏｄら（１９８５）

Ｎａｔｕｒｅ ３１４：４４６～４４９；Ｓｈａｗら（１９８８）Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．８０：１５５３～１５５９）；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９：１２０２～１２０７；Ｏｉら（１９８６）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ４：２１４；Ｊｏｎｅｓら（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５５２～５２５；Ｖｅｒｈｏｅｙａｎら（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４；ならびにＢｅｉｄｌｅｒら（１９８８）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４１：４０５３～４０６０。上記引用の各々は、それらの全体において参考として本明細書中に援用される。

【０１４３】

１つの実施形態において、所望の特異性を保有する抗体のスクリーニングのための方法は、当該分野内で公知の酵素結合イムノソルベント検定法（ＥＬＩＳＡ）および他の免疫学的に媒介された技術を含むが、これに限定されない。特定の実施形態において、ＮＯＶタンパク質の特定のドメインに対して特異的である抗体の選抜は、このようなドメインを所有しているＮＯＶタンパク質のフラグメントに結合するハイブリドーマの生成により容易にされる。従って、ＮＯＶタンパク質、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログまたはホモログ内の所望のドメインについて特異的である抗体がまた、本明細書において提供される。

【０１４４】

抗ＮＯＶ抗体は、ＮＯＶタンパク質の局在化および／または定量化に関する当該分野で公知の方法において用いられ得る（例えば、適切な生理学的なサンプル中のＮＯＶタンパク質のレベルを測定する使用のために、診断的方法における使用のために、タンパク質の画像化における使用のために、など）。所定の実施形態において、ＮＯＶタンパク質、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログまたはホモログについての抗体（抗体由来の結合ドメインを含む）は、薬理学的に活性な化合物（本明細書中、以降において「治療剤」）として利用される。抗ＮＯＶ抗体（例えば、モノクローナル抗体）は、標準的技術（例えばアフィニティークロマトグラフィまたは免疫沈降）によって、ＮＯＶポリペプチドを単離するために用いられ得る。抗ＮＯＶ抗体は、細胞からの天然のＮＯＶポリペプチド、そして宿主細胞において発現される組換え的に産生されたＮＯＶポリペプチドの精製を容易にし得る。さらに、抗ＮＯＶ抗体が、（例えば、細胞の溶解産物または細胞上清における）ＮＯＶタンパク質を検出するために用いられて、ＮＯＶタンパク質の発現のアバンダンスおよびパターンを評価し得る。抗ＮＯＶ抗体は、例えば、所定の治療レジメンの有効性を決定するために、臨床試験の手順の一部として、組織におけるタンパク質レベルを診断的にモニターするために用いられ得る。検出は、抗体を検出可能物質に結合する（すなわち、物理的に連結する）ことにより容易にされ得る。検出可能物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられる；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン（ｄｉｃｈｌｏｒｏｔｒｉａｚｉｎｙｌａｍｉｎｅ）フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられる；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられる；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられる；そして、適切な放射性物質の例としては^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓまたは^{3}Ｈが挙げられる。

【０１４５】

（ＮＯＶ組換え発現ベクターおよび宿主細胞）

本発明の別の局面は、ＮＯＶタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログをコードする核酸を含む、ベクター、好ましくは、発現ベクターに関する。本明細書において使用する場合、用語「ベクター」は、連結された別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。１つの型のベクターは、「プラスミド」である。これはさらなるＤＮＡセグメントが連結され得る環状の二本鎖ＤＮＡループをいう。他の型のベクターは、ウ

イルス性ベクターであり、ここでは、さらなるＤＮＡセグメントが、ウイルスゲノムに連結され得る。特定のベクターは、ベクターが導入される宿主細胞中で自律複製し得る（例えば、細菌性の複製起点を有する細菌ベクター、およびエピソーム性哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入の際、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、そして、これにより宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、それらが作動可能に連結される遺伝子の発現を指示し得る。このようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換えＤＮＡ技術において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドが最も一般的に用いられる形態のベクターであるので、交換可能に使用され得る。しかし、本発明は、等価の機能を果たす、ウイルス性ベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）のような、このような他の形態の発現ベクターを含むことを意図する。

【０１４６】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適切な形態の本発明の核酸を含む。これは、組換え発現ベクターが、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結されている、発現に用いられる宿主細胞に基づいて選択された１つ以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結する」とは、目的のヌクレオチド配列が、（例えば、インビトロの転写／翻訳系において、またはベクターが宿主細胞に導入される場合は、宿主細胞において）ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で調節配列に連結されることを意味することを意図する。

【０１４７】

用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことを意図する。このような調節配列は、例えば、Ｇｏｅｄｄｅｌ；ＧＥＮＥ　ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ　ＩＮ　ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ　１８５、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆ．（１９９０）に記載されている。調節配列は、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指示する配列、および特定の宿主細胞のみにおいてヌクレオチド配列の発現を指示する配列（例えば、組織特異的調節配列）を含む。発現ベクターの設計が形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどのような因子に依存し得ることは当業者には明白である。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され得、それにより、本明細書に記載される核酸によってコードされるタンパク質またはペプチド（融合タンパク質またはペプチドを含む）（例えば、ＮＯＶタンパク質、ＮＯＶタンパク質の変異形態、融合タンパク質など）を産生し得る。

【０１４８】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞における、ＮＯＶタンパク質発現のために設計され得る。例えば、ＮＯＶタンパク質は、細菌細胞（例えば、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを用いる）、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現され得る。適切な宿主細胞は、Ｇｏｅｄｄｅｌ；ＧＥＮＥ　ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ　ＩＮ　ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ　１８５、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆ．（１９９０）にさらに考察されている。あるいは、組換え型発現ベクターは、例えば、Ｔ７プロモーター調節配列およびＴ７ポリメラーゼを用いて、インビトロで転写および翻訳され得る。原核生物におけるタンパク質の発現は、最も頻繁には、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指示する、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを有するＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉにおいて実施される。融合ベクターは、そこにコードされるタンパク質に、通常、組換えタンパク質のアミノ末端に、多数のアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、代表的には、以下の３つの目的のために役立つ：（ｉ）組換えタンパク質の発現を増加させるため；（ｉｉ）組換えタンパク質の可溶性を増加させるため；および（ｉｉｉ）アフィニティ

ー精製においてリガンドとして作用することによって組換えタンパク質の精製の際に補助するため。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解の切断部位が、融合部分と組換えタンパク質との結合部に導入されて、融合タンパク質の精製の後に融合部分から組換えタンパク質を分離することを可能とする。このような酵素、およびその同族（ｃｏｇｎａｔｅ）の認識配列は、第Ｘａ因子、トロンビン、およびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、それぞれ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトースＥ結合タンパク質、またはプロテインＡを標的の組換えタンパク質に融合する、ｐＧＥＸ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｉｎｃ．；ＳｍｉｔｈおよびＪｏｈｎｓｏｎ（１９８８）Ｇｅｎｅ ６７：３１－４０）、ｐＭＡＬ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，Ｍａｓｓ．）およびｐＲＩＴ５（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）が挙げられる。適切な誘導性非融合Ｅ．ｃｏｌｉ発現ベクターの例には、ｐＴｒｃ（Ａｍｒａｎｎら（１９８８）Ｇｅｎｅ ６９：３０１－３１５）およびｐＥＴ １１ｄ（Ｓｔｕｄｉｅｒら、ＧＥＮＥ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）６０－８９）が挙げられる。

【０１４９】

Ｅ．ｃｏｌｉにおける組換えタンパク質発現を最大化するための１つのストラテジーは、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力を欠損した宿主細菌中でタンパク質を発現させることである。例えば、Ｇｏｔｔｅｓｍａｎ，ＧＥＮＥ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）１１９－１２８を参照のこと。別のストラテジーは、各アミノ酸についての個々のコドンが、Ｅ．ｃｏｌｉにおいて優先的に利用されるコドンであるように発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変更することである（例えば、Ｗａｄａら（１９９２）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０：２１１１－２１１８を参照のこと）。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準的なＤＮＡ合成技術によって実行され得る。別の実施形態において、ＮＯＶ発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｉｖｉｓａｅにおける発現のためのベクターの例には、ｐＹｅｐＳｅｃ１（Ｂａｌｄａｒｉら、（１９８７）ＥＭＢＯ Ｊ．６：２２９－２３４）、ｐＭＦａ（ＫｕｒｊａｎおよびＨｅｒｓｋｏｗｉｔｚ、（１９８２）Ｃｅｌｌ ３０：９３３－９４３）、ｐＪＲＹ８８（Ｓｃｈｕｌｔｚら、（１９８７）Ｇｅｎｅ ５４：１１３－１２３）、ｐＹＥＳ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）、およびｐｉｃＺ（ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）が挙げられる。あるいは、ＮＯＶは、バキュロウイルス発現ベクターを使用して、昆虫細胞中で発現され得る。培養昆虫細胞（例えば、ＳＦ９細胞）中でのタンパク質の発現のために利用可能なバキュロウイルスベクターには、ｐＡｃシリーズ（Ｓｍｉｔｈら（１９８３）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：２１５６－２１６５）およびｐＶＬシリーズ（ＬｕｃｋｌｏｗおよびＳｕｍｍｅｒｓ（１９８９）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １７０：３１－３９）が挙げられる。

【０１５０】

なお別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例には、ｐＣＤＭ８（Ｓｅｅｄ（１９８７）Ｎａｔｕｒｅ ３２９：８４０）およびｐＭＴ２ＰＣ（Ｋａｕｆｍａｎら（１９８７）ＥＭＢＯ Ｊ．６：１８７－１９５）が挙げられる。哺乳動物細胞中で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルスの調節エレメントによって提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス２、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス４０に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方のために適切な他の発現系については、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ．第２版、Ｃｏ

ｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９の第１６章および第１７章を参照のこと。

【０１５１】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型（例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現する）中で優先的に核酸の発現を指示し得る。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的なプロモーターの非限定的な例には、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Ｐｉｎｋｅｒｔら（１９８７）Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１：２６８－２７７）、リンパ特異的プロモーター（ＣａｌａｍｅおよびＥａｔｏｎ（１９８８）Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３：２３５－２７５）、Ｔ細胞レセプターの特定のプロモーターにおいて（ＷｉｎｏｔｏおよびＢａｌｔｉｍｏｒｅ（１９８９）ＥＭＢＯ Ｊ．８：７２９－７３３）および免疫グロブリンの特定のプロモーターにおいて（Ｂａｎｅｒｊｉら（１９８３）Ｃｅｌｌ ３３：７２９－７４０；ＱｕｅｅｎおよびＢａｌｔｉｍｏｒｅ（１９８３）Ｃｅｌｌ ３３：７４１－７４８）、ニューロン特異的プロモーター（例えば、神経フィラメントプロモーター；ＢｙｒｎｅおよびＲｕｄｄｌｅ（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：５４７３－５４７７）、膵臓特異的プロモーター（Ｅｄｌｕｎｄら（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：９１２－９１６）、ならびに乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター；米国特許第４，８７３，３１６号および欧州出願公開第２６４，１６６号）が挙げられる。発達的に調節されるプロモーターもまた含まれる（例えば、マウスｈｏｘプロモーター（ＫｅｓｓｅｌおよびＧｒｕｓｓ（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３７４－３７９）およびａ－フェトプロテインプロモーター（ＣａｍｐｅｓおよびＴｉｌｇｈｍａｎ（１９８９）Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３：５３７－５４６）。

【０１５２】

本発明はさらに、アンチセンス方向で発現ベクターにクローニングされた本発明のＤＮＡ分子を含む組換え発現ベクターを提供する。すなわち、そのＤＮＡ分子は、ＮＯＶ ｍＲＮＡに対してアンチセンスであるＲＮＡ分子の発現（ＤＮＡ分子の転写によって）を可能にする様式で調節配列に作動可能に連結される。種々の細胞型においてアンチセンスＲＮＡ分子の持続的な発現を指示する、アンチセンス方向でクローニングされた核酸に作動可能に連結された調節配列（例えば、ウイルスプロモーターおよび／もしくはエンハンサー）が選択され得るか、または、アンチセンスＲＮＡの構成的発現、組織特異的発現、または細胞特異的発現を指示する調節配列が、選択され得る。アンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化されたウイルスの形態であり得、ここではアンチセンス核酸は、高効率調節領域の制御下で産生され、その活性は、ベクターが導入される細胞型によって決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の考察については、例えば、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂら、「Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ＲＮＡ ａｓ ａ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ｇｅｎｅｔｉｃ ａｎａｌｙｓｉｓ」、Ｒｅｖｉｅｗｓ－Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、第１巻（１）１９８６を参照のこと。

【０１５３】

本発明の別の局面は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で、交換可能に使用される。このような用語は、特定の被験細胞をいうのみでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫をもいうことが理解される。変異または環境の影響のいずれかに起因して、特定の改変は次の世代において生じ得るので、このような子孫は、実際には、親の細胞と同一でないかもしれないが、なお、本明細書中で使用される場合のこの用語の範囲内に含まれる。

【０１５４】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、ＮＯＶタンパク質は、細菌細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）またはＣＯＳ細胞）において発現され得

る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【０１５５】

ベクターＤＮＡは、従来の形質転換またはトランスフェクション技術を介して原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、外来性の核酸（例えば、ＤＮＡ）を宿主細胞に導入するために当該分野で容認されている種々の技術をいうことを意図し、これらには、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈、ＤＥＡＥデキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションするための適切な方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ　ＭＡＮＵＡＬ．第２版、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９）および他の実験室マニュアルに見出され得る。

【０１５６】

安定な哺乳動物細胞のトランスフェクションのために、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、細胞のほんの一部のみが外来ＤＮＡをそのゲノムに組み込み得ることが知られている。これらの要素を同定および選択するために、選択マーカー（例えば、抗生物質に対する耐性）をコードする遺伝子が、一般的には目的の遺伝子とともに宿主細胞に導入される。種々の選択マーカーには、薬物（例えば、Ｇ４１８、ハイグロマイシン、およびメトトレキサート）に対する耐性を付与するものが含まれる。選択マーカーをコードする核酸は、ＮＯＶをコードするベクターと同じベクター上で宿主細胞に導入され得るか、あるいは別々のベクター上で導入され得る。導入された核酸で安定にトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって同定され得る（例えば、選択マーカー遺伝子を取り込んだ細胞は生存するが、他の細胞は死滅する）。

【０１５７】

本発明の宿主細胞（例えば、培養中の原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞）は、ＮＯＶタンパク質を産生（すなわち、発現）するために使用され得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用して、ＮＯＶタンパク質を産生するための方法を提供する。１つの実施形態において、本発明の方法は、ＮＯＶタンパク質が産生されるような適切な培地中で、本発明の宿主細胞（ここに、ＮＯＶタンパク質をコードする組換え発現ベクターが導入されている）を培養する工程を包含する。別の実施形態において、本発明はさらに、培地または宿主細胞からＮＯＶタンパク質を単離する工程を包含する。

【０１５８】

（トランスジェニックＮＯＶ動物）

本発明の宿主細胞はまた、非ヒトトランスジェニック動物を作製するために使用され得る。例えば、１つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、ＮＯＶタンパク質コード配列が導入された、受精卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、このような宿主細胞は、外因性のＮＯＶ配列がゲノムに導入された非ヒトトランスジェニック動物、または内因性のＮＯＶ配列が変更された相同組換え動物を作製するために使用され得る。このような動物は、ＮＯＶタンパク質の機能および／または活性を研究するため、ならびにＮＯＶタンパク質活性のモジュレーターを同定および／または評価するために有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」とは、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは、ラットまたはマウスのような齧歯類であり、ここでは、その動物の１つ以上の細胞が、導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例としては、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが挙げられる。導入遺伝子は、細胞（この細胞からトランスジェニック動物を発生させた）のゲノムに組み込まれかつ成熟動物のゲノムに残存し、それによって、トランスジェニック動物の１つ以上の細胞型または組織においてコードされた遺伝子産物の発現を指示する、外因性のＤＮＡである。本明細書中で使用される場合、「相同（ｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓ）組換え動物」とは、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはマウスであり

、ここでは内因性のＮＯＶ遺伝子は、内因性の遺伝子と、その動物の発生の前にその動物の細胞（例えば、その動物の胚細胞）に導入された外因性のＤＮＡ分子との間の相同組換えによって変更されている。本発明のトランスジェニック動物は、ＮＯＶをコードする核酸を、例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって、受精卵母細胞の雄性前核に導入すること、およびその卵母細胞を偽妊娠雌性養育動物（ｆｏｓｔｅｒ ａｎｉｍａｌ）中で発達させることを可能にすることによって作製され得る。配列番号１、４、または６のヒトのＮＯＶ ｃＤＮＡ配列は、非ヒト動物のゲノムに導入遺伝子として導入され得る。あるいは、ヒトのＮＯＶ遺伝子の非ヒトホモログ（例えば、マウスのＮＯＶ遺伝子）は、ヒトのＮＯＶ ｃＤＮＡに対するハイブリダイゼーションに基づいて単離され得（上記にさらに記載された）、そして導入遺伝子として使用され得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルもまた導入遺伝子中に含まれ得、その導入遺伝子の発現の効率を増大させ得る。組織特異的調節配列（単数または複数）は、特定の細胞に対して、ＮＯＶタンパク質の発現を指示するように、ＮＯＶ導入遺伝子に作動可能に連結され得る。胚の操作およびマイクロインジェクションを介するトランスジェニック動物（特に、マウスのような動物）を作製するための方法は、当該分野で慣習的になっており、そして例えば、米国特許第４，７３６，８６６号；同第４，８７０，００９号；および同第４，８７３，１９１号；ならびにＨｏｇａｎ １９８６、ＭＡＮＩＰＵＬＡＴＩＮＧ ＴＨＥ ＭＯＵＳＥ ＥＭＢＲＹＯ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．に記載されている。同様の方法が、他のトランスジェニック動物の作製のために使用される。トランスジェニック創始（ｆｏｕｎｄｅｒ）動物は、そのゲノムにおけるＮＯＶ導入遺伝子の存在および／またはその動物の組織もしくは細胞中のＮＯＶ ｍＲＮＡの発現に基づいて同定され得る。次いで、トランスジェニック創始動物は、導入遺伝子を有するさらなる動物を育種するために使用され得る。さらに、ＮＯＶタンパク質をコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物は、さらに、他の導入遺伝子を有する他のトランスジェニック動物に交雑され得る。

【０１５９】

相同組換え動物を作製するために、ＮＯＶ遺伝子の少なくとも一部を含むベクターを調製する。ここで、この遺伝子は、欠失、付加、または置換が導入され、それによってそのＮＯＶ遺伝子が変更されている（例えば、機能的に破壊されている）。ＮＯＶ遺伝子はヒト遺伝子（例えば、配列番号１、４または６のｃＤＮＡ）であり得るが、より好ましくは、ヒトのＮＯＶ遺伝子の非ヒトホモログである。例えば、配列番号１、４または６のヒトのＮＯＶ遺伝子のマウスホモログは、マウスゲノムにおける内因性のＮＯＶ遺伝子を変更するのに適切な相同組換えベクターを構築するために使用され得る。１つの実施形態において、そのベクターは、相同組換えに際して、その内因性のＮＯＶ遺伝子が、機能的に破壊されるように設計される（すなわち、機能的タンパク質をもはやコードしない；「ノックアウト」ベクターともいわれる）。あるいは、このベクターは、相同組換えに際して、内因性ＮＯＶ遺伝子が変異されるか、あるいはさもなければ、変更されるが、なお機能性タンパク質をコードするように、設計され得る（例えば、上流の調節領域が変更され、それによって内因性ＮＯＶタンパク質の発現を変更し得る）。相同組換えベクターにおいて、ＮＯＶ遺伝子の変更された部分は、ＮＯＶ遺伝子のさらなる核酸によって、その５’末端および３’末端で隣接されることにより、相同組換えが、ベクターによって保有される外因性ＮＯＶ遺伝子と胚幹細胞中の内因性ＮＯＶ遺伝子との間で起こることを可能にする。さらなる隣接するＮＯＶ核酸は、内因性遺伝子との首尾よい相同組換えのために十分な長さである。典型的に、数キロベースの隣接ＤＮＡ（５’末端および３’末端の両方における）が、ベクターに含まれる。例えば、相同組換えベクターの説明についてＴｈｏｍａｓら（１９８７）Ｃｅｌｌ ５１：５０３を参照のこと。次いで、このベクターは、（例えば、エレクトロポレーションによって）胚性幹細胞株に導入され、そして導入されたＮＯＶ遺伝子が内因性ＮＯＶ遺伝子と相同組換えした細胞が、選択される（例えば、Ｌｉら（１９９２）Ｃｅｌｌ ６９：９１５を参照のこと）。次いで、選択された細胞が、動物（

例えば、マウス）の未分化胚芽細胞へ注入され、凝集キメラを形成する。例えば、Ｂｒａｄｌｅｙ（１９８７）のＴｅｒａｔｏｃａｒｃｉｎｏｍａｓ ａｎｄ Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ、Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ編、ＩＲＬ、Ｏｘｆｏｒｄ、１１３頁～１５２頁を参照のこと。次いで、キメラ胚が、適切な偽妊娠雌性養育動物に移植され得、そしてその胚は分娩に到る。その生殖細胞中に相同組換えされたＤＮＡを保有する子孫が、動物を育種するために使用され得、ここでこの動物の全ての細胞は、導入遺伝子の生殖系列伝達によって、相同組換えされたＤＮＡを含む。相同組換えベクターおよび相同組換え動物を構築するための方法が、さらに以下に記載される；Ｂｒａｄｌｅｙ（１９９１）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２：８２３－８２９；ＰＣＴ国際公開番号：ＷＯ９０／１１３５４；ＷＯ９１／０１１４０；ＷＯ９２／０９６８；およびＷＯ／９３／０４１６９。

【０１６０】

別の実施形態において、導入遺伝子の調節された発現を可能にする選択された系を含む非ヒトトランスジェニック動物が産生され得る。このような系の１つの例は、バクテリオファージＰ１のｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼ系である。ｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼ系の説明については、例えば、Ｌａｋｓｏら（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：６２３２－６２３６を参照のこと。リコンビナーゼ系の別の例は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのＦＬＰリコンビナーゼ系である（Ｏ’Ｇｏｒｍａｎら（１９９１）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：１３５１－１３５５を参照のこと・）。ｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼ系が導入遺伝子の発現を調節するために使用される場合、Ｃｒｅリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含む動物が必要となる。このような動物は、例えば、２つのトランスジェニック動物（一方は選択されたタンパク質をコードした導入遺伝子を含み、他方はリコンビナーゼをコードした導入遺伝子を含む）を交配することによる「二重の」トランスジェニック動物の構築によって提供され得る。

【０１６１】

本明細書中に記載される非ヒトトランスジェニック動物のクローンがまた、Ｗｉｌｍｕｔら（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ ３８５：８１０－８１３に記載される方法に従って、産生され得る。簡単には、トランスジェニック動物からの細胞（例えば、体細胞）が単離され得、そして増殖サイクル（ｇｒｏｗｔｈ ｃｙｃｌｅ）から出て、G_0期に入るように誘導され得る。次いで、静止性細胞が、例えば、電気パルスの使用により、その静止性細胞が単離されたのと同種の動物から摘出された卵母細胞へ融合され得る。次いで、この再構築された卵母細胞は培養され、これにより、これは桑実胚または未分化胚芽細胞に発達し、次いで、偽妊娠雌性養育動物に移される。この雌性養育動物から産まれた子孫は、その細胞（例えば、その体細胞）が単離された動物のクローンである。

【０１６２】

（薬学的組成物）

本発明のＮＯＶ核酸分子、ＮＯＶタンパク質、および抗ＮＯＶ抗体（これはまた、本明細書中で、「活性化合物」とも呼ばれる）、ならびにそれらの誘導体、フラグメント、アナログ、およびホモログが、投与に適した薬学的組成物に組み込まれ得る。このような組成物は、典型的に、核酸分子、タンパク質または抗体、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。本明細書中で使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的な投与に適合可能な、あらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤（ｄｅｌａｙｉｎｇ ａｇｅｎｔ）などを含むことが意図される。適切なキャリアは、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（当該分野の標準的参考文献であって、本明細書中に参考として援用される）の最新版に記載される。このようなキャリアまたは希釈剤の好ましい例としては、水、生理食塩水、フィンガー（ｆｉｎｇｅｒ）溶液、デキストロース溶液、および５％ヒト血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。リポソームおよび非水性ビヒクル（例えば、不揮発性油）もまた、使用され得る。薬学的に活性な物質に対するこのような媒体およ

び薬剤の使用は、当該分野で周知である。任意の従来の媒体または薬剤が活性化合物と不適合である場合を除いて、組成物におけるその使用が意図される。補助的な活性化合物もまた、組成物へ組み込まれ得る。

【０１６３】

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与経路と適合可能であるように処方される。投与経路の例には、非経口（例えば、静脈内、皮内、皮下）投与、経口（例えば、吸入）投与、経皮（すなわち、局所的）投与、経粘膜（ｔｒａｎｓｍｕｃｏｓａｌ）投与、および直腸投与が挙げられる。非経口適用、皮内適用または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含み得る：注射用水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒のような、滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような、抗菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムのような、抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）のような、キレート剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩のような、緩衝液、および塩化ナトリウムまたはデキストロースのような、張度の調整のための薬剤。ｐＨは、塩酸または水酸化ナトリウムのような酸または塩基で調整され得る。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ、または多用量のバイアル中に入れられ得る。

【０１６４】

注入用途に適した薬学的組成物は、滅菌水溶液（ここでは、水溶解性）または分散媒（ｄｉｓｐｅｒｓｉｏｎ）、および滅菌注入可能溶液または分散媒の即座の調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与において、適切なキャリアには、生理食塩水、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ　ＥＬ^{TM}（ＢＡＳＦ、Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ、Ｎ．Ｊ．）またはリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）が挙げられる。全ての場合において、組成物は、無菌でなければならず、そして容易な注入性（ｓｙｒｉｎｇｅａｂｉｌｉｔｙ）が存在する程度に流動性であるべきである。これは、製造および保存の条件下で安定でなければならず、そして、細菌および真菌のような微生物の汚染行為に対して保護されなければならない。このキャリアは、例えば、以下を含む溶媒または分散媒であり得る：水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）ならびにそれらの適切な混合物。適切な流動性が、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散媒の場合には、要求される粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなど）によって達成され得る。多くの場合、組成物中に等張剤（例えば、砂糖、ポリアルコール（例えば、マンニトール（ｍａｎｉｔｏｌ）、ソルビトール）、塩化ナトリウム）を含むことが好ましい。注入可能組成物の吸収期間の延長は、組成物に吸収を遅延させる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を含ませることによってもたらされ得る。

【０１６５】

滅菌注射可能溶液は、必要量のこの活性化合物（例えば、ＮＯＶタンパク質または抗ＮＯＶ抗体））を、適切な溶媒中で、上記で列挙される成分の１つまたは組み合わせと共に組み込み、必要な場合、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般的に、分散媒は、活性化合物を、基本（ｂａｓｉｃ）の分散媒と上記で列挙される成分から必要とされる他の成分とを含む滅菌ビヒクル中へ組み込むことによって調製される。滅菌注射可能液剤の調製のための滅菌粉末の場合において、調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより、予め滅菌濾過されたその溶液から活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末を得る。

【０１６６】

経口組成物は、一般的に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。これらは、ゼラチンカプセルに封入され得るか、または錠剤へと圧縮され得る。経口治療投与の目的のために、この活性化合物は、賦形剤とともに組み込まれ得、そして錠剤、トローチ剤、またはカ

プセル剤の形態で使用され得る。経口組成物はまた、うがい薬としての使用のために流体キャリアを使用して調製され得、ここで、この流体キャリア中のこの化合物は、経口的に適用され、そして音を立てられ（ｓｗｉｓｈ）、そして吐き出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤、および／またはアジュバント物質が、この組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などが、任意の以下の成分または同様の性質を有する化合物を含み得る：結合剤（例えば、微結晶セルロース、ガムトラガントまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、デンプンまたはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギン酸、プリモゲル（Ｐｒｉｍｏｇｅｌ）、またはコーンスターチ）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはステロテス（Ｓｔｅｒｏｔｅｓ））；潤滑剤（ｇｌｉｄａｎｔ）（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味剤（例えば、スクロースまたはサッカリン）；あるいは香味剤（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバー）。

【０１６７】

吸入による投与について、この化合物は、適切な噴霧剤（例えば、二酸化炭素のような気体）を含む圧縮容器またはディスペンサー、あるいは噴霧器から、エアロゾル噴霧の形態で送達される。

【０１６８】

全身的投与はまた、経粘膜手段または経皮手段により得る。経粘膜投与または経皮投与について、浸透される障壁に適切な浸透剤が、処方物において使用される。このような浸透剤は、一般的に、当該分野で公知であり、そして、例えば、経粘膜投与については、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻噴霧または坐剤の使用によって達成され得る。経皮投与については、この活性化合物は、当該分野で一般的に公知である軟膏剤（ｏｉｎｔｍｅｎｔ）、軟膏（ｓａｌｖｅ）、ゲル、またはクリーム剤へ処方される。この化合物はまた、直腸送達のための坐剤（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような従来の坐剤基剤と共に）または貯留（ｒｅｎｔｅｎｔｉｏｎ）浣腸の形態で調製され得る。

【０１６９】

１つの実施形態において、この活性化合物は、身体からの迅速な排出に対してこの化合物を保護するキャリアを用いて調製され（例えば、制御放出処方物）、これには、移植片およびマイクロカプセル化された送達系が挙げられる。酢酸エチレンビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような、生分解性、生体適合性ポリマーが使用され得る。このような処方物の調製のための方法は、当業者には明らかである。これらの物質はまた、Ａｌｚａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｎｏｖａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．から商業的に入手され得る。リポソーム懸濁剤（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を感染させた細胞へ標的化されるリポソームを含む）がまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば米国特許第４，５２２，８１１号に記載されるような、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

【０１７０】

投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、投薬単位形態で、経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有益である。本明細書で使用される投薬単位形態は、処置される被験体に対する単位投薬量として適切な物理的に個々の単位をいい；各単位は、必要とされる薬学的キャリアと関連して所望の治療的効果を生じるように計算された、所定量の活性化合物を含む。本発明の投薬単位形態についての詳細は、この活性化合物の固有の特徴、および達成される特定の治療効果、ならびに個体の処置のためのこのような活性化合物を調合する分野に固有の制限によって決定されるか、あるいはこれらに直接依存する。

【０１７１】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、被験体へ、例えば静脈内注射、局所投与（米国特許第５，

３２８，４７０号を参照のこと）によって、または定位注射（例えば、Ｃｈｅｎら（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：３０５４－３０５７を参照のこと）によって送達され得る。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物には、受容可能な希釈剤中の遺伝子治療ベクターが挙げられ得るか、または遺伝子送達ビヒクルが組み込まれる除放性マトリックスが挙げられ得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが組換え細胞からインタクトで産生され得（例えば、レトロウイルスベクター）、薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する１以上の細胞を含み得る。薬学的組成物は、投与のための使用説明書と共に、容器、包装、またはディスペンサーに含まれ得る。

【０１７２】

（スクリーニングおよび検出の方法）

本発明の単離された核酸分子は、以下にさらに説明されるように、ＮＯＶタンパク質（例えば、遺伝子治療適用における宿主細胞中の組換え発現ベクターを介する）を発現するため、ＮＯＶ ｍＲＮＡ（例えば、生物学的サンプルにおいて）またはＮＯＶ遺伝子における遺伝子損傷を検出するため、ならびにＮＯＶ活性を調節するために使用され得る。さらに、ＮＯＶタンパク質は、ＮＯＶタンパク質の活性または発現を調節する薬物または化合物をスクリーニングするために、ならびにＮＯＶタンパク質の不十分もしくは過剰な産生によって、あるいはＮＯＶ野生型タンパク質と比較して減少した活性もしくは異常な活性を有するＮＯＶタンパク質形態の産生によって特徴付けられる障害を処置するために使用され得る。さらに、本発明の抗ＮＯＶ抗体が、ＮＯＶタンパク質を検出および単離するため、ならびにＮＯＶ活性を調節するために使用され得る。

【０１７３】

本発明は、さらに、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイによって同定される新規の薬剤、および上記で本明細書中で記載されるような処置のためのそれらの使用に関する。

【０１７４】

（スクリーニングアッセイ）

本発明は、調節因子、すなわち、ＮＯＶタンパク質に結合するか、あるいは例えば、ＮＯＶタンパク質の発現またはＮＯＶタンパク質の活性に対して刺激効果または阻害効果を有する、候補または試験化合物または薬剤（例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子または他の薬物）を同定するための方法（本明細書中において「スクリーニングアッセイ」とも称される）を提供する。本発明はまた、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイにおいて同定された化合物を含む。１実施形態において、本発明は、ＮＯＶタンパク質またはポリペプチド、あるいはその生物学的に活性な部分の膜結合形態に結合するか、またはその膜結合形態の活性を調節する、候補化合物もしくは試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数のアプローチのいずれかを使用して得られ得、これには、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間的に位置付け可能な並行固相もしくは溶液相ライブラリー；逆重畳を要する合成ライブラリー法；「１ビーズ１化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、他の４つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーもしくは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である（例えば、Ｌａｍ（１９９７）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ １２：１４５を参照のこと）。

【０１７５】

本明細書中で使用される場合、「低分子」とは、約５ｋＤ未満の分子量、最も好ましくは約４ｋＤ未満の分子量を有する組成物をいうように意味される。低分子は、例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣体、炭水化物、脂質または他の有機分子もしくは無機分子であり得る。化学的および／または生物学的混合物（例えば、真菌、細菌または藻類抽出物）のライブラリーは、当該分野で公知であり、そして本発明のアッセイのいずれかを用いてスクリーニングされ得る。

【０１７６】
分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば以下に見出され得る：ＤｅＷｉｔｔら（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：６９０９；Ｅｒｂら（１９９４）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ．Ｓ．Ａ．９１：１１４２２；Ｚｕｃｋｅｒｍａｎｎら（１９９４）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７：２６７８；Ｃｈｏら（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６１：１３０３；Ｃａｒｒｅｌｌら（１９９４）Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３３：２０５９；Ｃａｒｅｌｌら（１９９４）Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３３：２０６１；およびＧａｌｌｏｐら（１９９４）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７：１２３３。

【０１７７】
化合物のライブラリーは、溶液中で（例えば、Ｈｏｕｇｈｔｅｎ（１９９２）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １３：４１２～４２１）、あるいはビーズ上（Ｌａｍ（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８２～８４）、チップ上（Ｆｏｄｏｒ（１９９３）Ｎａｔｕｒｅ ３６４：５５５～５５６）、細菌（Ｌａｄｎｅｒ 米国特許第５，２２３，４０９号）、胞子（Ｌａｄｎｅｒ 米国特許第５，２３３，４０９号）、プラスミド（Ｃｕｌｌら（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：１８６５～１８６９）またはファージ上（ＳｃｏｔｔおよびＳｍｉｔｈ（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６～３９０；Ｄｅｖｌｉｎ（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：４０４～４０６；Ｃｗｉｒｌａら（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：６３７８～６３８２；Ｆｅｌｉｃｉ（１９９１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：３０１～３１０；Ｌａｄｎｅｒ、米国特許第５，２３３，４０９号）において提示され得る。

【０１７８】
１つの実施形態において、アッセイは細胞ベースのアッセイであり、ここで、膜結合形態のＮＯＶタンパク質、またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上に発現する細胞が、試験化合物と接触され、そしてこの試験化合物が、ＮＯＶタンパク質に結合する能力が、決定される。例えば、細胞は、哺乳動物起源または酵母細胞であり得る。この試験化合物がＮＯＶタンパク質に結合する能力の決定は、例えば、その試験化合物を放射性同位体または酵素標識とカップリングさせて、その結果、この試験化合物のＮＯＶタンパク質またはその生物学的に活性な部分に対する結合が、複合体におけるその標識化合物を検出することによって決定され得ることによって達成され得る。例えば、試験化合物は、^{125}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ、または^{3}Ｈで直接的または間接的のいずれかで標識され得、そしてその放射性同位体が、放射線放射の直接の計数により、またはシンチレーション計数により、検出され得る。あるいは、試験化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、そしてこの酵素的標識が、適切な基質の生成物への転換を決定することにより、検出され得る。１つの実施形態において、このアッセイは、膜結合形態のＮＯＶタンパク質、またはその生物学的に活性な部分をその細胞表面上に発現する細胞を、ＮＯＶと結合する既知の化合物と接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物に試験化合物を接触させる工程、ならびにこの試験化合物がＮＯＶタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がＮＯＶタンパク質と相互作用する能力を決定する工程によって、この試験化合物が、既知の化合物と比較して、ＮＯＶまたはその生物学的に活性な部分と優先的に結合する能力を決定する工程を包含する。別の実施形態において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、これは、膜結合形態のＮＯＶタンパク質またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上で発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程、ならびにこの試験化合物が、ＮＯＶタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。

【０１７９】
この試験化合物が、ＮＯＶまたはその生物学的に活性な部分の活性を調節する能力の決定は、例えば、ＮＯＶタンパク質が、ＮＯＶ標的分子に結合またはこれら標的分子と相互作用する能力を決定することによって、達成され得る。本明細書中において使用する場合に

は、「標的分子」とは、ＮＯＶタンパク質が天然に結合または相互作用する分子であり、例えば、ＮＯＶ相互作用タンパク質を発現する細胞表面上の分子、第二の細胞表面上の分子、細胞外環境中の分子、細胞膜の内面と会合する分子、または細胞質分子である。ＮＯＶ標的分子は、非ＮＯＶ分子あるいは本発明のＮＯＶタンパク質またはポリペプチドであり得る。１つの実施形態において、ＮＯＶ標的分子は、シグナル伝達経路の構成要素であり、これは、細胞膜を通って細胞内への細胞外シグナル（例えば、化合物が膜結合ＮＯＶ分子に結合することにより発生するシグナル）の伝達を促進する。その標的は、例えば、触媒活性を有する第二の細胞内タンパク質、または下流シグナル伝達分子のＮＯＶとの会合を容易にするタンパク質であり得る。

【０１８０】

ＮＯＶタンパク質がＮＯＶ標的分子に結合するかまたはその標的分子と相互作用する能力の決定は、直接的結合を決定するための上記方法の１つにより、達成され得る。１つの実施形態において、ＮＯＶタンパク質がＮＯＶ標的分子に結合するかまたはその標的分子と相互作用する能力の決定は、その標的分子の活性を決定することにより、達成され得る。例えば、この標的分子の活性は、その標的の細胞性セカンドメッセンジャー（すなわち、細胞内Ca^{2+}、ジアシルグリセロール、ＩＰ３など）の誘導を検出すること、適切な基質への標的の触媒活性／酵素活性を検出すること、レポーター遺伝子（検出可能なマーカー（例えば、ルシフェラーゼ）をコードする核酸に作動可能に連結されたＮＯＶ応答性調節エレメントを含む）の誘導を検出すること、または細胞応答（例えば、細胞生存度、細胞分化、または細胞増殖）を検出することにより、決定され得る。

【０１８１】

なお別の実施形態において、本発明のアッセイは、無細胞（ｃｅｌｌ－ｆｒｅｅ）アッセイであり、ＮＯＶタンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物に接触させる工程、ならびにその試験化合物がＮＯＶタンパク質またはその生物学的に活性な部分と結合する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物の、ＮＯＶタンパク質への結合は、上記のように、直接的または間接的にのいずれかで決定され得る。１つのこのような実施形態において、このアッセイは、ＮＯＶタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、ＮＯＶを結合する既知の化合物に接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物に接触させる工程、ならびにその試験化合物がＮＯＶタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がＮＯＶタンパク質と相互作用する能力を決定する工程は、この試験化合物が、既知の化合物と比較して、ＮＯＶ、またはその生物学的に活性な部分と優先的に結合する能力を決定する工程を包含する。

【０１８２】

なお別の実施形態において、アッセイは、無細胞アッセイであり、ＮＯＶタンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させる工程、ならびにその試験化合物がＮＯＶタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物がＮＯＶの活性を調節する能力の決定は、例えば、ＮＯＶタンパク質が、ＮＯＶ標的分子に結合する能力を、直接的結合の決定のための上記方法の１つによって決定することにより、達成され得る。代替の実施形態において、この試験化合物がＮＯＶタンパク質の活性を調節する能力の決定は、ＮＯＶタンパク質が、ＮＯＶ標的分子をさらに調節する能力を決定することにより、達成され得る。例えば、この標的分子の適切な基質に対する触媒活性／酵素活性は、上記のように決定され得る。

【０１８３】

さらに別の実施形態において、無細胞アッセイは、ＮＯＶタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、ＮＯＶタンパク質を結合する既知の化合物に接触させてアッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、ならびにこの試験化合物がＮＯＶタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がＮＯＶタンパク質と相互作用する能力の決定は、ＮＯＶタンパク質が、ＮＯＶ

標的分子と優先的に結合するか、またはその標的分子の活性を優先的に調節する能力を決定する工程を包含する。

【０１８４】

本発明の無細胞アッセイは、ＮＯＶタンパク質の、可溶性の形態または膜結合形態の両方の使用に受け入れられる。膜結合形態のＮＯＶタンパク質を含む無細胞アッセイの場合には、ＮＯＶタンパク質の膜結合形態が溶液中に維持されるように、可溶化剤を利用することが所望され得る。このような可溶化剤の例には、非イオン性界面活性剤が挙げられ、例えば、ｎ－オクチルグルコシド、ｎ－ドデシルグルコシド、ｎ－ドデシルマルトシド、オクタノイル－Ｎ－メチルグルカミド、デカノイル－Ｎ－メチルグルカミド、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１００、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１１４、Ｔｈｅｓｉｔ（登録商標）、イソトリデシルポリ（エチレングリコールエーテル）$_n$（Ｉｓｏｔｒｉｄｅｃｙｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ　ｇｌｙｃｏｌ　ｅｔｈｅｒ）$_n$、Ｎ－ドデシル－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アンモニオ－１－プロパンスルホネート、３－（３－コラミドプロピル）ジメチルアンミニオール－１－プロパンスルホネート（３－（３－ｃｈｏｌａｍｉｄｏｐｒｏｐｙｌ）ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｍｉｎｉｏｌ－１－ｐｒｏｐａｎｅ　ｓｕｌｆｏｎａｔｅ）（ＣＨＡＰＳ）、または３－（３－コラミドプロピル）ジメチルアンミニオール－２－ヒドロキシ－１－プロパンスルホネート（３－（３－ｃｈｏｌａｍｉｄｏｐｒｏｐｙｌ）ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｍｉｎｉｏｌ－２－ｈｙｄｒｏｘｙ－１－ｐｒｏｐａｎｅ　ｓｕｌｆｏｎａｔｅ）（ＣＨＡＰＳＯ）である。

【０１８５】

本発明の上記アッセイ方法の１つより多い実施形態において、ＮＯＶタンパク質またはその標的分子のいずれかを固定して、そのタンパク質の一方または両方の非複合形態からの複合形態の分離を促進し、そしてそのアッセイの自動化に適合させることが、所望され得る。試験化合物の、ＮＯＶタンパク質への結合、または候補化合物の存在下および非存在下での、ＮＯＶタンパク質の標的分子との相互作用は、これらの反応物を収容するために適切な任意の容器内で、達成され得る。このような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。１実施形態において、そのタンパク質の一方または両方がマトリックスに結合することを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が、提供され得る。例えば、ＧＳＴ－ＮＯＶ融合タンパク質またはＧＳＴ標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され得、次いでこれらは、試験化合物と合わせられるか、あるいは試験化合物および未吸着標的タンパク質またはＮＯＶタンパク質のいずれかと合わせられ、そしてこの混合物が、複合体形成を誘導する条件下（例えば、塩およびｐＨに関して生理学的条件）でインキュベートされる。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して、結合していないあらゆる成分を除去し、ビーズの場合にはマトリックスを固定し、例えば上記のように、複合体を直接的または間接的のいずれかで決定する。あるいは、複合体がマトリックスから解離され得、そしてＮＯＶタンパク質の結合レベルまたは活性レベルを、標準的な技術を使用して決定し得る。

【０１８６】

タンパク質をマトリックスに固定するための他の技術もまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、ＮＯＶタンパク質、またはその標的分子のいずれかが、ビオチンとストレプトアビジンとの結合を利用して、固定され得る。ビオチン化ＮＯＶタンパク質、または標的分子は、当該分野において周知の技術を使用して、ビオチン－ＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド）から調製され得（例えば、ビオチン化キット、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、Ｉｌｌ．）、そしてストレプトアビジンでコーティングした９６ウェルのプレート（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ）のウェルに固定され得る。あるいは、ＮＯＶタンパク質、または標的分子と反応性であるがＮＯＶタンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体が、そのプレートのウェルに誘導体化され得、そして結合していない標的またはＮＯＶタンパク質が、抗体の結合

によってウェル内に捕捉され得る。このような複合体を検出するための方法には、ＧＳＴ固定複合体に関しての上記で述べた方法に加えて、ＮＯＶタンパク質または標的分子と反応性の抗体を使用する、複合体の免疫検出、ならびにＮＯＶタンパク質、または標的分子に関する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

【０１８７】

別の実施形態において、ＮＯＶタンパク質発現のモジュレーターは、細胞を候補化合物と接触させ、そして細胞中のＮＯＶ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現を決定する方法において同定される。候補化合物の存在下でのＮＯＶ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現レベルは、候補化合物の非存在下でのＮＯＶ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現レベルと比較される。次いで、候補化合物は、この比較に基づいて、ＮＯＶ　ｍＲＮＡまたはタンパク質発現のモジュレーターとして同定され得る。例えば、ＮＯＶ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下より、その存在下における方が大きい（すなわち、統計的に有意に大きい）場合、この候補化合物は、ＮＯＶ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現の刺激物質として同定される。あるいは、ＮＯＶ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下よりその存在下の方が少ない（統計的に有意に少ない）場合、この候補化合物は、ＮＯＶ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現のインヒビターとして同定される。細胞中のＮＯＶ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現レベルは、ＮＯＶ　ｍＲＮＡまたはタンパク質を検出するために本明細書中に記載の方法によって決定され得る。本発明のなお別の局面において、ＮＯＶタンパク質は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイにおいて「餌（ｂａｉｔ）タンパク質」として使用されて（例えば、米国特許第５，２８３，３１７号；Ｚｅｒｖｏｓら（１９９３）Ｃｅｌｌ　７２：２２３－２３２；Ｍａｄｕｒａら、１９９３　Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：１２０４６－１２０５４；Ｂａｒｔｅｌら、１９９３　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１４：９２０－９２４；Ｉｗａｂｕｃｈｉら、１９９３　Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　８：１６９３－１６９６；およびＢｒｅｎｔ　ＷＯ９４／１０３００を参照のこと）、ＮＯＶ（「ＮＯＶ結合タンパク質」または「ＮＯＶ－ｂｐ」）に結合するか、またはこれと相互作用し、そしてＮＯＶ活性を調節する他のタンパク質を同定し得る。このようなＮＯＶ結合タンパク質はまた、例えば、ＮＯＶ経路の上流または下流エレメントとしてＮＯＶタンパク質によるシグナル伝達に関与する可能性がある。

【０１８８】

ツーハイブリッドシステムは、分離可能なＤＮＡ結合ドメインおよび活性化ドメインからなる、大部分の転写因子のモジュール的性質に基づく。簡潔には、このアッセイは、２つの異なるＤＮＡ構築物を利用する。一方の構築物においては、ＮＯＶをコードする遺伝子が既知の転写因子（例えば、ＧＡＬ－４）のＤＮＡ結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他方の構築物においては、ＤＮＡ配列のライブラリー由来の、未同定タンパク質（「餌食（ｐｒｅｙ）」または「サンプル」）をコードするＤＮＡ配列が、既知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合される。「餌」および「餌食」タンパク質がインビボで相互作用して、ＮＯＶ依存性複合体を形成し得る場合、この転写因子のＤＮＡ結合ドメインおよび活性化ドメインは、非常に近くにある。近位にあることにより、転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結されたレポーター遺伝子（例えば、ＬａｃＺ）の転写が可能となる。レポーター遺伝子の発現が検出され得、そして機能的転写因子を含む細胞コロニーが、単離され得、そしてＮＯＶと相互作用するタンパク質をコードするクローニングされた遺伝子を得るために使用され得る。

【０１８９】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規な薬剤および本明細書中に記載されるような処置のためのこの薬剤の使用に関する。

【０１９０】

（検出アッセイ）

本明細書中で同定されるｃＤＮＡ配列の一部またはフラグメント（および対応する完全な遺伝子配列）は、ポリヌクレオチド試薬として多くの方法で使用され得る。例えば、これ

らの配列を使用して、（ｉ）染色体上にそれぞれの遺伝子をマッピングし得；従って遺伝病と関連する遺伝子領域を位置決定し得る；（ｉｉ）微量の生物学的サンプルから個体を同定し得る（組織型決定）；および（ｉｉｉ）生物学的サンプルの法医学的識別を助け得るが、これに限定されない。これらの適用は、以下の節において記載される。

【０１９１】

（染色体マッピング）

一旦遺伝子の配列（または配列の一部分）が単離されると、この配列を用いて染色体上に遺伝子の位置をマッピングし得る。このプロセスは、染色体マッピングとよばれる。従って、本明細書中に記載のＮＯＶ配列の一部またはフラグメント、配列番号１、４、もしくは６、またはそのフラグメントもしくは誘導体を用いて、それぞれ、ＮＯＶ遺伝子の位置を染色体上にマッピングし得る。ＮＯＶ配列を染色体にマッピングすることは、これらの配列と、疾患と関連する遺伝子とを相関付ける際の重要な第一歩である。

【０１９２】

簡潔には、ＮＯＶ遺伝子は、ＮＯＶ配列からＰＣＲプライマー（好ましくは、１５～２５ｂｐの長さ）を調製することにより染色体にマッピングし得る。ＮＯＶ配列のコンピューター分析を用いて、ゲノムＤＮＡにおける１つを超えるエキソンにまたがらないプライマーを迅速に選択し得、従って、増幅プロセスを複雑にし得る。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのＰＣＲスクリーニングのために使用され得る。ＮＯＶ配列に対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドのみが増幅されたフラグメントを生じる。

【０１９３】

体細胞ハイブリッドは、異なる哺乳動物由来の体細胞（例えば、ヒトおよびマウス細胞）を融合することにより調製される。ヒトおよびマウスのハイブリッドが増殖および分裂するにつれ、それらは、無作為な順序で徐々にヒト染色体を失うが、マウス染色体を維持する。マウス細胞は増殖できないが、ヒト細胞は増殖できる培地を使用することにより、それらは特定の酵素を失うので、必要な酵素をコードする遺伝子を含む１つのヒト染色体が維持される。種々の培地を使用することによって、ハイブリッド細胞株のパネルが確立され得る。パネルにおける各細胞株は、単一のヒト染色体または少数のヒト染色体いずれかおよびマウス染色体の完全なセットを含み、これにより、個々の遺伝子を特定のヒト染色体にマッピングすることが容易に可能になる（Ｄ’Ｅｕｓｔａｃｈｉｏら（１９８３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２０：９１９－９２４を参照のこと）。ヒト染色体のフラグメントのみを含む体細胞ハイブリッドはまた、転座および欠失を伴うヒト染色体を使用することにより生成され得る。

【０１９４】

体細胞ハイブリッドのＰＣＲマッピングは、特定の染色体に特定の配列を割り当てるためには迅速な手順である。１つのサーマルサイクラーを用いて一日に３つ以上の配列が割り当てられ得る。ＮＯＶ配列を使用して、オリゴヌクレオチドプライマーを設計すると、下位位置決定（ｓｕｂｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ）は、特定の染色体由来のフラグメントのパネルを用いて達成され得る。

【０１９５】

中期染色体スプレッドに対するＤＮＡ配列の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）をさらに使用して、一工程で正確な染色体位置を提供し得る。染色体スプレッドは、コルセミド（染色体紡錘体を破壊する）のような化学物質により分裂が中期においてブロックされた細胞を使用して行われ得る。この染色体は、トリプシンで短時間処理され得、次いで、ギムザ染色され得る。薄いバンドおよび濃いバンドのパターンが各染色体で発生し、その結果、この染色体は、個々に同定され得る。ＦＩＳＨ技術は、５００または６００塩基ほどの短さのＤＮＡ配列と共に使用され得る。しかし、１，０００塩基より大きなクローンは、簡単な検出に十分なシグナル強度で、独特の染色体位置に結合する可能性がより高い。好ましくは、１，０００塩基、そしてより好ましくは、２，０００塩基が妥当な時間量で良好な結果を得るために十分である。この技術の総説については、Ｖｅ

ｒｍａら、ＨＵＭＡＮ　ＣＨＲＯＭＯＳＯＭＥＳ：Ａ　ＭＡＮＵＡＬ　ＯＦ　ＢＡＳＩＣ　ＴＥＣＨＮＩＱＵＥＳ（Ｐｅｒｇａｍｏｎ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　１９８８）を参照のこと。

【０１９６】

染色体マッピングの試薬は、単一の染色体またはその染色体上の単一部位を印付けするために個々に使用され得るか、または試薬のパネルは複数部位および／または複数染色体を印付けするために使用され得る。遺伝子の非コード領域に対応する試薬は、実際に、マッピング目的のために好ましい。コード配列は、遺伝子ファミリー内に保存されており、従って、染色体マッピングの間に交叉ハイブリダイゼーションの機会が増大する可能性が高い。

【０１９７】

一旦配列が正確な染色体位置にマッピングされると、その配列の染色体上の物理的位置は、遺伝子マップデータと相関し得る。このようなデータは、例えば、ＭｃＫｕｓｉｃｋ，ＭＥＮＤＥＬＩＡＮ　ＩＮＨＥＲＩＴＡＮＣＥ　ＩＮ　ＭＡＮ（Ｊｏｈｎｓ　Ｈｏｐｋｉｎｓ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｗｅｌｃｈ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｌｉｂｒａｒｙを通じてオンラインで入手可能）において見いだされる。次いで、同じ染色体領域にマッピングされる遺伝子と疾患との間の関係は、例えば、Ｅｇｅｌａｎｄら（１９８７）Ｎａｔｕｒｅ，３２５：７８３－７８７に記載される連鎖分析（物理的に隣接する遺伝子の同時遺伝）によって同定され得る。

【０１９８】

さらに、ＮＯＶ遺伝子と関連する疾患に罹患した個体と、この疾患に罹患していない個体との間のＤＮＡ配列における差異が決定され得る。罹患した個体のいくらかまたは全てにおいて変異が認められるが、非罹患個体のいずれにおいても認められない場合、この変異は特定の疾患の候補薬剤である可能性が高い。罹患個体と非罹患個体の比較は、一般に、染色体における構造的変化（例えば、染色体スプレッドから可視であるか、またはそのＤＮＡ配列に基づいたＰＣＲを用いて検出可能な欠失または転座）を最初に探すことを包含する。最終的に、いくらかの個体に由来する遺伝子の完全な配列決定を行って、変異の存在を確認し、かつ多型に由来する変異を区別する。

【０１９９】

（組織型決定（ｔｉｓｓｕｅ　ｔｙｐｉｎｇ））

本発明のＮＯＶ配列はまた、わずかな生物学的サンプルから個体を識別するために使用され得る。この技術において、個体のゲノムＤＮＡは、１つ以上の制限酵素で消化され、そして同定のために独特のバンドを生成するためにサザンブロット上でプローブされる。本発明の配列は、ＲＦＬＰ（米国特許第５，２７２，０５７号に記載の「制限フラグメント長多型」）のためのさらなるＤＮＡマーカーとして有用である。

【０２００】

さらに、本発明の配列を用いて、個体のゲノムの選択された部分について実際の塩基ごとにＤＮＡ配列を決定する代替的技術を提供し得る。従って、本明細書中に記載のＮＯＶ配列を用いて、配列の５’末端および３’末端から２つのＰＣＲプライマーを調製し得る。次いで、これらのプライマーを使用して、個体のＤＮＡを増幅し得、引き続いて、配列決定し得る。

【０２０１】

このように調製された個体由来の対応するＤＮＡ配列のパネルは、各個体が、対立遺伝子差異に起因するこのようなＤＮＡ配列の独特のセットを有するので、唯一の個体識別を提供し得る。本発明の配列は、個体由来および組織由来の配列のこのような識別を得るために使用され得る。本発明のＮＯＶ配列は、ヒトゲノムの部分を独特に表す。対立遺伝子変異は、これらの配列のコード領域においてある程度生じ、そして非コード領域においてより大きな程度に生じる。個々のヒト間での対立遺伝子変異は、各５００塩基につき約１回の頻度で生じると見積もられる。対立遺伝子変異の多さは、制限フラグメント長多型（ＲＦＬＰ）を含む単一ヌクレオチド多型（ＳＮＰ）に起因する。

【０２０２】
本明細書中で記載の配列の各々は、ある程度、標準物質（これに対して個体からのＤＮＡが識別の目的で比較され得る）として使用され得る。より多くの多型が非コード領域で生じるので、個体を区別するために、それほど多くの配列が必要であるわけではない。非コード配列は、おそらく１０～１，０００プライマーのパネルを用いてポジティブな個体識別を不自由なく提供し得る。これらのプライマーは、各々が１００塩基の増幅された非コード配列を生じる。推定コード配列（例えば、配列番号１、４もしくは６における配列）が使用される場合、ポジティブな個体識別に関するプライマーのより適切な数は、５００～２，０００である。
【０２０３】
（予測医療）
本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイ、薬物ゲノム（ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｏｍｉｃｓ）およびモニタリング臨床試験が、予後（予測）の目的に使用され、これによって個体を予防的に処置する、予測医療の分野に関する。従って、本発明の１つの局面は、ＮＯＶタンパク質および／または核酸の発現、ならびにＮＯＶの活性を、生物学的サンプル（例えば、血液、血清、細胞、組織）の関連で決定するための診断アッセイに関し、これによって、異常なＮＯＶの発現または活性に関連して、個体が疾患または障害に罹患するかどうか、あるいは障害を発症するリスクがあるかどうかを決定する。本発明はまた、個体が、ＮＯＶのタンパク質、核酸の発現または活性と関連した障害を発症するリスクがあるかどうかを決定するための予後的（または予測的）アッセイを提供する。例えば、ＮＯＶの遺伝子における変異が、生物学的サンプルにおいてアッセイされ得る。このようなアッセイは、予後的または予測的な目的に使用され得、これによってＮＯＶのタンパク質、核酸の発現または生物学的活性によって特徴付けられるかまたは関連した障害の発病の前に個体を予防的に処置する。
【０２０４】
本発明の別の局面は、個体におけるＮＯＶのタンパク質、核酸の発現あるいは活性を決定するための方法を提供し、これによって、その個体についての適切な治療的または予防的試薬（本明細書において「薬物ゲノム」とよばれる）を選択する。薬物ゲノムは、個体の遺伝型（例えば、特定の試薬に対して応答する個体の能力を決定するために試験された個体の遺伝型）に基づいて個体の治療的または予防的処置のための試薬（例えば、薬物）の選択を可能にする。
【０２０５】
本発明のなお別の局面は、臨床試験におけるＮＯＶの発現または活性に対する試薬（例えば、薬物、化合物）の影響をモニタリングすることに関する。
【０２０６】
これらおよび他の試薬は、以下の節でさらに詳細に記載される。
【０２０７】
（診断アッセイ）
生物学的サンプルにおけるＮＯＶの存在または非存在を検出するための例示的な方法は、試験被験体から生物学的サンプルを得る工程、およびその生物学的サンプルをＮＯＶのタンパク質またはＮＯＶタンパク質をコードする核酸（例えば、ｍＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ）を検出し得る化合物もしくは薬剤とを接触させ、その結果、ＮＯＶの存在が、その生物学的サンプルにおいて検出される、工程を包含する。ＮＯＶのｍＲＮＡもしくはゲノムＤＮＡを検出するための薬剤は、ＮＯＶ　ｍＲＮＡもしくはゲノムＤＮＡにハイブリダイズし得る、標識された核酸プローブである。この核酸プローブは、例えば、全長のＮＯＶの核酸（例えば、配列番号１、４、６の核酸またはそれらの一部）（例えば、少なくとも、１５、３０、５０、１００、２５０もしくは５００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、ストリンジェントな条件下でＮＯＶのｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡと特異的にハイブリダイズするに十分である核酸）であり得る。本発明の診断アッセイにおける使用のための他の適切なプローブは本明細書において記載されている。

【０２０８】
ＮＯＶのタンパク質を検出するための薬剤は、ＮＯＶのタンパク質に結合し得る抗体であり、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナルであり得るか、またはより好ましくはモノクローナル抗体であり得る。インタクトな抗体またはそのフラグメント（例えば、ＦａｂまたはＦ（ａｂ’）$_2$）が使用され得る。用語「標識（された）」とは、プローブまたは抗体に関して、検出可能な物質をそのプローブもしくは抗体にカップリングさせる（すなわち、物理的に連結する）ことによってそのプローブまたは抗体を直接標識すること、ならびに、直接標識された別の試薬との反応性によってそのプローブもしくは抗体の間接的な標識をすることを包含することが意図される。間接的な標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を用いた一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出され得るようにＤＮＡプローブのビオチンを用いた末端標識が挙げられる。用語「生物学的サンプル」とは、被験体から単離された、組織、細胞および生物学的流体ならびに被験体に存在する組織、細胞および流体を含むことが意図される。すなわち、本発明の検出方法を用いて、ＮＯＶのｍＲＮＡ、タンパク質またはゲノムＤＮＡを、生物学的サンプル中で、インビトロおよびインビボで検出し得る。例えば、ＮＯＶのｍＲＮＡの検出のためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。ＮＯＶのタンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素連結免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ウェスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光が挙げられる。ＮＯＶのゲノムＤＮＡを検出するためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、ＮＯＶのタンパク質の検出のためのインビボ技術としては、標識された抗ＮＯＶ抗体を被験体に導入することが挙げられる。例えば、その抗体は、放射性マーカーを用いて標識され得る。被験体における放射性マーカーの存在および位置は、標準的な画像化技術によって検出され得る。１つの実施形態において、この生物学的サンプルは、その試験被験体からのタンパク質分子を含む。あるいは、その生物学的サンプルは、その試験被験体からのｍＲＮＡ分子またはその試験被験体からのゲノムＤＮＡ分子を含み得る。好ましい生物学的サンプルは、被験体から従来の手段によって単離された末梢血白血球サンプルである。

【０２０９】
別の実施形態において、本発明の方法はさらに、コントロール被験体からコントロール生物学的サンプルを得る工程、そのコントロールサンプルを、ＮＯＶのタンパク質、ｍＲＮＡもしくはゲノムＤＮＡを検出し得る化合物もしくは薬剤と接触させ、その結果、ＮＯＶのタンパク質、ｍＲＮＡもしくはゲノムＤＮＡの存在がその生物学的サンプルにおいて検出される、工程、およびそのコントロールサンプルにおけるＮＯＶのタンパク質、ｍＲＮＡもしくはゲノムＤＮＡの存在と、その試験サンプルにおけるＮＯＶのタンパク質、ｍＲＮＡもしくはゲノムＤＮＡの存在とを比較する工程を包含する。

【０２１０】
本発明はまた、生物学的サンプルにおけるＮＯＶの存在を検出するためのキットを包含する。例えば、このキットは、以下を備え得る：生物学的サンプルにおいてＮＯＶのタンパク質またはｍＲＮＡを検出し得る、標識された化合物もしくは薬剤；そのサンプルにおいてＮＯＶの量を決定するための手段；およびそのサンプルにおいて、標準と、ＮＯＶの量とを比較するための手段。この化合物または薬剤は、適切な容器内に包装され得る。このキットは、さらに、ＮＯＶのタンパク質または核酸を検出するためにキットを用いるための指示書を備え得る。

【０２１１】
（予後アッセイ）
本明細書において記載された診断方法をさらに利用して、ＮＯＶの異常発現または異常活性に関連した疾患もしくは障害を有するか、またはその発症の危険性を有する被験体を同定し得る。例えば、本明細書に記載されるアッセイ（例えば、上述の診断アッセイまたは下記のアッセイ）を利用して、ＮＯＶのタンパク質、核酸の発現または活性に関連する障

害を有するかまたはその発症の危険性を有する被験体を同定し得る。例えば、これらには、以下が挙げられる：胸腺免疫細胞の発達、分化および活性を含む状態；精子形成および男性避妊症に関連する病理；いくらかのヒト新形成の診断；血液循環中の細胞の疾患または病理（例えば、赤血球および血小板）；神経、心臓および血管の病理；慢性関節リウマチ；先天性筋ジストロフィー；種々の筋肉障害；固定変形（関節拘縮症）；小細胞肺癌ＮＣＩ－Ｈ２３；前立腺癌；および異常白質。あるいは、この予後アッセイを利用して、疾患または障害を有するかまたはその発症の危険性を有する被験体を同定し得る。従って、本発明は、ＮＯＶの異常発現または異常活性に関連する疾患もしくは障害を同定するための方法を提供する。ここで、試験サンプルは、被験体から得られ、そしてＮＯＶのタンパク質または核酸（例えば、ｍＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ）が検出され、ここで、ＮＯＶのタンパク質または核酸の存在は、ＮＯＶの異常発現または異常活性に関連する疾患または障害を有するかまたはその発症の危険性を有する被験体についての診断指標である。本明細書において使用される場合「試験サンプル」とは、目的の被験体から得られた生物学的サンプルをいう。例えば、試験サンプルは、生物学的流体（例えば、血清）、細胞サンプル、または組織であり得る。

【０２１２】

さらに、本明細書に記載される予後アッセイを使用して、被験体に薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬物候補）を投与してＮＯＶの異常発現または異常活性に関連する疾患または障害を処置し得るか否かを、決定し得る。例えば、このような方法を使用して、被験体が障害のための薬剤で有効に処置され得るか否かを決定し得る。従って、本発明は、ＮＯＶの異常発現または異常活性に関連する障害についての薬剤を用いて、被験体が有効に処置され得るか否かを決定するための方法を提供する。ここで、試験サンプルが得られ、そしてＮＯＶのタンパク質または核酸が検出される（例えば、ここで、ＮＯＶのタンパク質または核酸の存在は、この薬剤が投与されてＮＯＶの異常発現または異常活性に関連する障害が処置され得る被験体についての、診断指標である）。

【０２１３】

本発明の方法はまた、ＮＯＶ遺伝子における遺伝的損傷を検出し、それによって、その損傷遺伝子を有する被験体が異常な細胞増殖および／または分化によって特徴付けられる障害についての危険性を有するか否かを決定するためにも使用され得る。種々の実施形態において、この方法は、その被験体からの細胞のサンプルにおいて、ＮＯＶタンパク質をコードする遺伝子の統合性に影響を与える少なくとも１つの変更によって特徴付けられる遺伝的損傷の存在または非存在、あるいはＮＯＶ遺伝子の誤発現を検出する工程を包含する。例えば、そのような遺伝的損傷は、以下の少なくとも１つの存在を確認することによって検出され得る：（ｉ）ＮＯＶ遺伝子からの１つ以上のヌクレオチドの欠失；（ｉｉ）ＮＯＶ遺伝子への１つ以上のヌクレオチドの付加；（ｉｉｉ）ＮＯＶ遺伝子の１つ以上のヌクレオチドの置換、（ｉｖ）ＮＯＶ遺伝子の染色体再配置；（ｖ）ＮＯＶ遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ転写物のレベルにおける変更、（ｖｉ）ＮＯＶ遺伝子の異常改変（例えば、ゲノムＤＮＡのメチル化パターンの異常改変）、（ｖｉｉ）ＮＯＶ遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、（ｖｉｉｉ）ＮＯＶタンパク質の非野生型レベル、（ｉｘ）ＮＯＶ遺伝子の対立遺伝子の欠失、ならびに（ｘ）ＮＯＶタンパク質の不適切な翻訳後修飾。本明細書において記載されるように、当該分野において、ＮＯＶ遺伝子における損傷を検出するために使用され得る、多数の公知のアッセイ技術が存在する。好ましい生物学的サンプルは、従来手段によって被験体から単離された末梢血白血球サンプルである。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプルが使用され得、これには、例えば、頬粘膜細胞が挙げられる。

【０２１４】

特定の実施形態において、損傷の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）（例えば、米国特許第４，６８３，１９５号および同第４，６８３，２０２号を参照のこと）（例えば、アンカーＰＣＲまたはＲＡＣＥ　ＰＣＲ）、あるいは、連結連鎖反応（ＬＣＲ）（例え

ば、Ｌａｎｄｅｇｒａｎら（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４１：１０７７－１０８０；およびＮａｋａｚａｗａら（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｉｃ．ＵＳＡ ９１：３６０－３６４を参照のこと）におけるプローブ／プライマーの使用を包含する。後者は、ＮＯＶ遺伝子における点変異を検出するために特に有用であり得る）（Ａｂｒａｖａｙａら，１９９５ Ｎｕｃｌ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ２３：６７５－６８２を参照のこと）。この方法は、患者から細胞のサンプルを収集する工程、核酸（例えば、ゲノム、ｍＲＮＡまたはその両方）をそのサンプルの細胞から単離する工程、ＮＯＶの遺伝子に特異的にハイブリダイズする１つ以上のプライマーとその核酸サンプルとを、ＮＯＶ遺伝子（存在する場合）のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じるような条件下で接触させる工程、ならびに増幅産物の存在もしくは非存在を検出する工程、またはその増幅産物のサイズを検出する工程およびその長さをコントロールサンプルと比較する工程を包含し得る。ＰＣＲおよび／またはＬＣＲは、本明細書中に記載される変異を検出するために使用される技術のいずれかとともに予備的増幅工程として使用されることが望ましくあり得ることが予想される。

【０２１５】

代替的な増幅方法としては、以下が挙げられる：当業者に周知な技術を用いた、その増幅された分子の検出の前の、自己維持配列複製（Ｇｕａｔｅｌｌｉら、１９９０、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：１８７４－１８７８を参照のこと）、転写増幅系（Ｋｗｏｈら、１９８９、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：１１７３－１１７７を参照のこと）、Ｑレプリカーゼ（Ｌｉｚａｒｄｉら、１９８８、ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ６：１１９７を参照のこと）、または他の任意の核酸増幅方法。これらの検出スキームは、核酸分子が非常に極少数で存在する場合に、そのような核酸分子の検出のために特に有用である。

【０２１６】

代替の実施形態において、サンプル細胞からのＮＯＶ遺伝子における変異は、制限酵素切断パターンにおける変更によって同定され得る。例えば、サンプルおよびコントロールのＤＮＡが単離され、増幅され（必要に応じて）、１つ以上の制限エンドヌクレアーゼを用いて消化され、そしてフラグメント長の大きさがゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルＤＮＡとコントロールＤＮＡとの間のフラグメント長の大きさにおける差異は、そのサンプルＤＮＡにおける変異を示す。さらに、配列特異的なリボザイムの使用（例えば、米国特許第５，４９３，５３１号を参照のこと）を使用して、リボザイム切断部位の発生または喪失によって特異的な変異の存在についてスコア付けし得る。

【０２１７】

他の実施形態において、ＮＯＶにおける遺伝子変異は、サンプル核酸およびコントロール核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）を、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイに対してハイブリダイズさせることによって同定され得る（Ｃｒｏｎｉｎら（１９９６）Ｈｕｍａｎ Ｍｕｔａｔｉｏｎ ７：２４４－２５５；Ｋｏｚａｌら（１９９６）Ｎａｔ．Ｍｅｄ．２：７５３－７５９を参照のこと）。例えば、ＮＯＶにおける遺伝子変異は、Ｃｒｏｎｉｎら（前出）に記載されるように光生成ＤＮＡプローブを含む二次元アレイにおいて同定され得る。手短には、プローブの第一ハイブリダイゼーションアレイを用いて、サンプルおよびコントロールにおける長いストレッチのＤＮＡにわたって走査し、連続的に重複するプローブの線形アレイを作成することによって、その配列間の塩基変化を同定し得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。この工程に第二のハイブリダイゼーションアレイが続き、これは、検出される全ての改変体または変異体に相補的な、より小さな特化されたプローブアレイを用いることによる特定の変異の特徴付けを可能にする。各変異アレイは、一方が野生型遺伝子に対して相補的であり、そして他方が変異遺伝子に対して相補である並行プローブセットから構成される。

【０２１８】

なお別の実施形態において、当該分野で公知の種々の配列決定反応のいずれかを使用して、ＮＯＶ遺伝子を直接配列決定し得、そしてサンプルＮＯＶ配列と対応する野生型（コン

トロール）配列とを比較することによって、変異を検出し得る。配列決定反応の例としては、ＭａｘａｍおよびＧｉｌｂｅｒｔ（１９７７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｉｃ．ＵＳＡ　７４：５６０またはＳａｎｇｅｒ（１９７７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｉｃ．ＵＳＡ　７４：５４６３によって開発された技術に基づくものが挙げられる。診断アッセイを実施する場合、種々の自動化配列決定手順のいずれかを利用し得ることもまた意図される（例えば、Ｎａｅｖｅら（１９９５）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１９：４４８を参照のこと）。これらには、質量分析法による配列決定法（例えば、ＰＣＴ国際公開番号ＷＯ　９４／１６１０１；Ｃｏｈｅｎら（１９９６）Ａｄｖ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ　３６：１２７－１６２；およびＧｒｉｆｆｉｎら（１９９３）Ａｐｐｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　３８．：１４７－１５９を参照のこと）が含まれる。

【０２１９】

ＮＯＶ遺伝子における変異を検出するための他の方法としては、切断剤からの保護を使用して、ＲＮＡ／ＲＮＡもしくはＲＮＡ／ＤＮＡのヘテロ二重鎖に基づくミスマッチ塩基を検出する方法が挙げられる（Ｍｙｅｒｓら（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３０：１２４２を参照のこと）。一般に、「ミスマッチ切断」の当該分野の技術は、野生型のＮＯＶ配列を含む（標識された）ＲＮＡまたはＤＮＡを、組織サンプルから得られた潜在的な変異体ＲＮＡまたはＤＮＡとハイブリダイズさせることによって形成されるヘテロ二重鎖を提供する工程によって始まる。この二本鎖の二重鎖を、二重鎖の一本鎖領域（例えば、そのコントロールとサンプルの鎖との間の塩基対ミスマッチに起因して存在するもの）を切断する薬剤を用いて処理する。例えば、ＲＮＡ／ＤＮＡ二重鎖を、ＲＮａｓｅを用いて処理し得、そしてＤＮＡ／ＤＮＡハイブリッドを、そのミスマッチ領域を酵素的に消化することに対して、S_1ヌクレアーゼを用いて処理し得る。他の実施形態において、ＤＮＡ／ＤＮＡまたはＲＮＡ／ＤＮＡのいずれかの二重鎖を、ミスマッチ領域を消化するために、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウム、およびピペリジンを用いて処理し得る。そのミスマッチ領域の消化後、次いで、得られた物質を変性ポリアクリルアミドゲル上で、大きさにより分離して、変異の部位を決定する。例えば、Ｃｏｔｔｏｎら（１９８８）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　８５：４３９７；Ｓａｌｅｅｂａら（１９９２）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ　２１７：２８６－２９５を参照のこと。１つの実施形態において、コントロールのＤＮＡまたはＲＮＡは、検出のために標識され得る。

【０２２０】

なお別の実施形態において、ミスマッチ切断反応は、二本鎖ＤＮＡにおけるミスマッチ塩基対を認識する１つ以上のタンパク質（いわゆる「ＤＮＡミスマッチ修復」酵素）を、細胞のサンプルから得られたＮＯＶ　ｃＤＮＡにおける点変異を検出およびマッピングするために規定された系において使用する。例えば、Ｅ．ｃｏｌｉのｍｕｔＹ酵素は、Ｇ／Ａミスマッチでを切断し、そしてＨｅＬａ細胞からのチミジンＤＮＡグリコシラーゼは、Ｇ／ＴミスマッチでＴを切断する（Ｈｓｕら（１９９４）Ｃａｒｃｉｎｏｇｅｎｅｓｉｓ　１５：１６５７～１６６２）。例示的な実施形態に従って、ＮＯＶ配列（例えば、野生型ＮＯＶ配列）に基づくプローブは、試験細胞由来のｃＤＮＡまたは他のＤＮＡ産物にハイブリダイズされる。二重鎖は、ＤＮＡミスマッチ修復酵素を用いて処理され、そしてその切断産物（もしあれば）は、電気泳動プロトコルなどから検出され得る。例えば、米国特許第５，４５９，０３９号を参照のこと。

【０２２１】

他の実施形態において、電気泳動の移動度における変化は、ＮＯＶ遺伝子における変異を同定するために使用される。例えば、一本鎖コンホメーション多型（ＳＳＣＰ）は、変異体と野生型核酸との間の電気泳動の移動度における差異を検出するために使用され得る（Ｏｒｉｔａら（１９８９）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ：８６：２７６６、またＣｏｔｔｏｎ（１９９３）Ｍｕｔａｔ　Ｒｅｓ　２８５：１２５～１４４；Ｈａｙａｓｈｉ（１９９２）Ｇｅｎｅｔ　Ａｎａｌ　Ｔｅｃｈ　Ａｐｐｌ　９：７３～７９を参照のこと）。サンプルおよびコントロールＮＯＶ核酸の一本鎖ＤＮＡフラグメントは

、変性され、そして再生される。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従って変化し、電気泳動の移動度において得られる変化は、１つの塩基変化の検出さえも可能にする。ＤＮＡフラグメントは、標識され得るか、または標識されたプローブを用いて検出され得る。アッセイの感度は、ＤＮＡよりもむしろ、二次構造が配列中の変化に対してより感受的であるＲＮＡを使用することによって増強され得る。１つの実施形態において、本発明の方法は、ヘテロ二重鎖分析を利用して、電気泳動の移動度における変化に基づいて二本鎖のヘテロ二重鎖分子を分離する。例えば、Ｋｅｅｎら（１９９１）Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ ７：５を参照のこと。

【０２２２】

なお別の実施形態において、一定勾配の変性剤を含有するポリアクリルアミドゲルにおける変異体または野生型フラグメントの移動は、変性勾配ゲル電気泳動（ＤＧＧＥ）を使用してアッセイされる。例えば、Ｍｙｅｒｓら（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ ３１３：４９５を参照のこと。ＤＧＧＥが分析の方法として使用される場合、ＤＮＡは、例えば、ＰＣＲにより約４０ｂｐの高融点ＧＣリッチＤＮＡのＧＣクランプを付加することによって、完全には変性されないことを確実するように改変される。さらなる実施形態において、温度勾配は、コントロールおよびサンプルＤＮＡの移動度における差異を同定するために、変性剤勾配の代わりに使用される。例えば、ＲｏｓｅｎｂａｕｍおよびＲｅｉｓｓｎｅｒ（１９８７）Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｃｈｅｍ ２６５：１２７５３を参照のこと。

【０２２３】

点変異を検出するための他の技術の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーは、既知の変異が中心的に配置されるように調製され得、次いで、完全なマッチが見出される場合にのみハイブリダイゼーションを許容する条件下で標的ＤＮＡにハイブリダイズされる。例えば、Ｓａｉｋｉら（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ ３２４：１６３）；Ｓａｉｋｉら（１９８９）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ８６：６２３０を参照のこと。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、このオリゴヌクレオチドがハイブリダイズ膜に付着され、そして標識された標的ＤＮＡとハイブリダイズされる場合に、ＰＣＲ増幅された標的ＤＮＡまたは多くの異なる変異にハイブリダイズされる。

【０２２４】

あるいは、選択的ＰＣＲ増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、本発明と合わせて使用され得る。特異的増幅についてのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心において（その結果、増幅は、差次的ハイブリダイゼーションに依存する）（Ｇｉｂｂｓら（１９８９）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ １７：２４３７～２４４８）か、あるいは適切な条件下でミスマッチが妨げられ得るかまたはポリメラーゼ伸長を減少し得る、１つのプライマーの３’の最末端で、目的の変異を保有し得る（Ｐｒｏｓｓｎｅｒ（１９９３）Ｔｉｂｔｅｃｈ １１：２３８）。さらに、切断に基づく検出を行うために、変異領域に新規な制限部位を導入することは、切断に基づく検出を行うために望ましくあり得る。例えば、Ｇａｓｐａｒｉｎｉら（１９９２）Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｂｅｓ ６：１を参照のこと。特定の実施形態において、増幅はまた、増幅用Ｔａｑリガーゼを使用して実施され得ることが予測される。例えば、Ｂａｒａｎｙ（１９９１）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８８：１８９を参照のこと。このような場合において、連結は、５’配列の３’末端に完全なマッチが存在する場合にのみ生じ、増幅の存在または非存在を探索することによって、特定の部位における既知の変異の存在を検出することを可能にする。

【０２２５】

本明細書中に記載される方法は、例えば、本明細書中に記載れる少なくとも１つのプローブ核酸または抗体試薬を含む、予めパッケージングされた診断キットを利用することによって実施され得、これは、例えば、ＮＯＶ遺伝子を含む疾患または疾病の症状または家族病歴を示す患者を診断するための臨床的設定において簡便に使用され得る。

【０２２６】
さらに、ＮＯＶが発現される任意の細胞型または組織（好ましくは、末梢血白血球）は、本明細書中に記載される予後アッセイにおいて利用され得る。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプル（例えば、頬粘膜細胞を含む）が、使用され得る。
【０２２７】
（薬理ゲノム学（Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｏｍｉｃｓ））
ＮＯＶ活性（例えば、ＮＯＶ遺伝子発現）に対する刺激性または阻害性の影響を有する因子、すなわちモジュレーターは、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定されるように、障害（例えば、癌、異常ＮＯＶ活性に関連する免疫障害）を（予防的または治療的に）処置するために個体に投与され得る。このような処置と合わせて、個体の薬理ゲノム学（すなわち、個体の遺伝子型と外来化合物または薬物に対するその個体の応答との間の関係についての研究）が、考慮され得る。治療剤の代謝における差異は、薬理学的に活性な薬物の用量と血中濃度との間の関係を変更することによって、重篤な毒性または治療の失敗を導き得る。従って、個体の薬理ゲノム学は、個体の遺伝子型の考慮に基づく予防的または治療的処置のために有効な薬剤（例えば、薬物）の選択を許容する。このような薬理ゲノム学は、さらに、適切な投薬量および治療剤レジメンを決定するために使用され得る。従って、ＮＯＶタンパク質の活性、ＮＯＶ核酸の発現、あるいは個体におけるＮＯＶ遺伝子の変異含量が決定されて、それによって個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。
【０２２８】
薬理ゲノム学は、罹患された人おける変更された薬物の性質および異常な作用に起因して、薬物に応答する臨床的に有意な遺伝性変更を扱う。例えば、Ｅｉｃｈｅｌｂａｕｍ、１９９６、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ，２３：９８３～９８５およびＬｉｎｄｅｒ、１９９７、Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ，４３：２５４～２６６を参照のこと。一般に、２つの型の薬理ゲノム学状態が、区別され得る。薬物が身体に作用する方法を変更する１つの因子として伝達される遺伝的状態（変更された薬物作用）、または身体が薬物に作用する方法を変更する１つの因子として伝達される遺伝的状態（変更された薬物代謝）。これらの薬理ゲノム学状態は、稀な欠損としてか、または多型としてのいずれかで生じ得る。例えば、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ（Ｇ６ＰＤ）欠損は、一般的な遺伝性酵素病であり、この主な臨床的合併症は、酸化剤薬物（抗マラリア剤、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン）の摂取およびソラマメの摂食後の溶血である。
【０２２９】
例示的な実施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度および持続期間の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素（例えば、Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ２（ＮＡＴ２）およびシトクロムＰ４５０酵素ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９）の遺伝的多型の発見は、幾人かの患者が予期される薬物効果を得ないか、または標準的かつ安全な用量の薬物を摂取した後に過大な薬物応答および深刻な毒性を示すことに関しての説明を提供した。これらの多型は、集団において２つの表現型（高い代謝能を持つ人（ｅｘｔｅｎｓｉｖｅ　ｍｅｔａｂｏｌｉｚｅｒ）（ＥＭ）および低い代謝能を持つ人（ｐｏｏｒ　ｍｅｔａｂｏｌｉｚｅｒ）（ＰＭ））で表現される。ＰＭの有病率は、異なる集団の間で異なる。例えば、ＣＹＰ２Ｄ６をコードする遺伝子は高度に多型であり、そしていくらかの変異がＰＭにおいて同定されており、この全ては機能的ＣＹＰ２Ｄ６の非存在に至る。ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９の低い代謝能を持つ人は、彼らが標準的な用量を受ける場合に、かなり頻繁に過大な薬物応答および副作用を経験する。代謝産物が活性な治療的部分である場合、そのＣＹＰ２Ｄ６形成代謝産物であるモルヒネによって媒介されるコデインの鎮痛効果について実証されるように、ＰＭは治療的応答を示さない。他の極端なものは、標準的な用量に応答しない、いわゆる超迅速な代謝能を持つ人である。最近、超迅速な代謝の基準となる分子は、ＣＹＰ２Ｄ６遺伝子増幅に起因していることが同定されている。
【０２３０】

従って、ＮＯＶのタンパク質の活性、ＮＯＶの核酸の発現、あるいは個体におけるＮＯＶの遺伝子の変異内容を決定して、それによって、その個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。さらに、薬理ゲノム学の研究を使用して、個体の薬物応答性の表現型の同定に対して薬物代謝酵素をコードする多型対立遺伝子の遺伝子型を適用し得る。この知見は、用量または薬物選択に適用される場合、有害な反応または治療の失敗を回避し得、従って、被験体をＮＯＶの調節因子（例えば、本明細書中に記載される例示的なスクリーニングアッセイの１つによって同定される調節因子）を用いて処置する場合に治療的または予防的効率を増強し得る。

【０２３１】

（臨床試験中の効果のモニタリング）

ＮＯＶの発現または活性（例えば、異常な細胞増殖および／または分化を調節する能力）に対する薬剤（例えば、薬物、化合物）の影響をモニタリングすることは、基本的な薬物スクリーニングおよび臨床試験に適用され得る。例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイによって決定される、ＮＯＶの遺伝子発現、タンパク質レベルを増加するため、またはＮＯＶ活性をアップレギュレートする薬剤の効力は、減少したＮＯＶの遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートしたＮＯＶの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。あるいは、スクリーニングアッセイによって決定される、ＮＯＶの遺伝子発現、タンパク質レベルを減少、またはＮＯＶの活性をダウンレギュレートする薬剤の効力は、増加したＮＯＶの遺伝子発現、タンパク質レベル、またはアップレギュレートしたＮＯＶの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。このような臨床試験において、ＮＯＶの発現または活性、および好ましくは、例えば、細胞増殖または免疫障害に関与するような他の遺伝子が、「リードアウト（読み出し）（ｒｅａｄ　ｏｕｔ）」、すなわち、特定の細胞の免疫応答性のマーカーとして使用され得る。

【０２３２】

例えば、ＮＯＶを含む遺伝子（これは、ＮＯＶ活性（例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイにおいて同定される）を調節する薬剤（例えば、化合物、薬物または低分子）を用いる処置によって、細胞内で調節される）が同定され得るが、これらに限定されない。従って、細胞性増殖障害に対する薬剤の効果を研究するために、例えば、臨床試験において、細胞が単離され得、そしてＲＮＡが調製され得、そしてＮＯＶおよびこの障害に関与する他の遺伝子の発現のレベルについて分析され得る。遺伝子発現のレベル（すなわち、遺伝子発現パターン）は、本明細書中に記載されるように、ノーザンブロット分析もしくはＲＴ－ＰＣＲによるか、あるいは産生されるタンパク質の量を測定することによるか、本明細書中に記載されるような方法の１つによるか、あるいはＮＯＶまたは他の遺伝子の活性のレベルを測定することによって、定量され得る。この様式で、この遺伝子発現パターンは、この薬剤に対する細胞の生理学的応答の指標であるマーカーとして作用し得る。従って、この応答状態は、この薬剤を用いる個体の処置の前、および処置の間の種々の時点で、決定され得る。

【０２３３】

１つの実施形態において、本発明は、薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、タンパク質、ペプチド、核酸、ペプチド模倣物、低分子、または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される他の薬物候補物）を用いる、被験体の処置の効力をモニタリングするための方法を提供し、これは、以下の工程を包含する：（ｉ）薬剤の投与の前に、被験体から投与前サンプルを得る工程；（ｉｉ）この投与前サンプルにおいて、ＮＯＶのタンパク質、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの発現のレベルを検出する工程；（ｉｉｉ）この被験体から１つ以上の投与後サンプルを得る工程；（ｉｖ）この投与後サンプルにおいて、ＮＯＶのタンパク質、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの発現または活性のレベルを検出する工程；（ｖ）この投与前サンプルにおけるＮＯＶのタンパク質、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの発現または活性のレベルを、この投与後サンプルにおけるＮＯＶのタンパク質、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの発現または活性のレベルと比較す

る工程；ならびに（ｖｉ）従って、この被験体に対する薬剤の投与を変更する工程。例えば、この薬剤の増加した投与は、検出されるよりも高いレベルにＮＯＶの発現または活性を増加することが（すなわち、この薬剤の効力を増加すること）望ましくあり得る。あるいは、この薬剤の減少した投与は、検出されるよりも低いレベルにＮＯＶの発現または活性を減少することが（すなわち、この薬剤の効力を減少すること）望ましくあり得る。

【０２３４】

（処置方法）

本発明は、異常なＮＯＶの発現または活性に関連する障害の危険性のある（または感受性）か、またはこの障害を有する被験体を処置する予防的および治療的の両方の方法を提供する。このように関連する疾患または障害としては、ＮＯＶ１に対して、例えば、胸腺免疫細胞の発達、分化および活性を含む状態；精子形成および男性避妊症に関連する病理；いくらかのヒト新形成の診断；血液循環中の細胞の疾患または病理（例えば、赤血球および血小板）；および小細胞肺癌ＮＣＩ－Ｈ２３；ＮＯＶ２に対して、例えば、神経、心臓および血管の病理；ＮＯＶ３に対して、例えば、慢性関節リウマチ；先天性筋ジストロフィー；種々の筋肉障害；固定変形（関節拘縮症）；前立腺癌；および異常白質が挙げられる。これらの治療方法は、以下により詳細に記載される。

【０２３５】

（疾患および障害）

（その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して）増加したレベルまたは生物学的活性によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を拮抗する（すなわち、低減または阻害する）治療剤を用いて処置され得る。活性を拮抗する治療剤は、治療的または予防的な様式で、投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：（ｉ）上記ペプチド、またはそのアナログ、誘導体、フラグメントもしくはホモログ；（ｉｉ）上記ペプチドに対する抗体；（ｉｉｉ）上記ペプチドをコードする核酸；（ｉｖ）相同組換えによって上記ペプチドの内因性機能を「ノックアウトする」ために利用される、アンチセンス核酸および「機能不全性」である（すなわち、上記ペプチドに対するコード配列のコード配列内の異種挿入に起因する）核酸の投与、（例えば、Ｃａｐｅｃｃｈｉ、１９８９、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４４：１２８８～１２９２を参照のこと）；または（ｖ）上記ペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用を変化させる、調節因子（すなわち、インヒビター、アゴニストおよびアンタゴニスト（本発明のさらなるペプチド模倣物または本発明のペプチドに対して特異的な抗体を含む））。

【０２３６】

（その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して）減少したレベルまたは生物学的活性によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を増加させる（すなわち、活性に対するアゴニストである）治療剤を用いて処置され得る。活性をアップレギュレートする治療剤は、治療的または予防的な様式で、投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：上記ペプチド、またはそのアナログ、誘導体、フラグメントもしくはホモログ；あるいはバイオアベイラビリティーを増加させるアゴニスト。

【０２３７】

増加したレベルまたは減少したレベルは、ペプチドおよび／またはＲＮＡを定量することによって、容易に検出され得る。この定量は、患者の組織サンプルを（例えば、生検組織から）入手し、そしてそのサンプルを、その発現したペプチド（または上記ペプチドのｍＲＮＡ）のＲＮＡレベルまたはペプチドレベル、構造および／または活性をインビトロでアッセイすることによる。当該分野において周知の方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：イムノアッセイ（例えば、ウェスタンブロット分析、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）ポリアクリルアミドゲル電気泳動が後に続く免疫沈降、免疫細胞化学などによる）および／またはｍＲＮＡの発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、ノーザンアッセイ、ドットブロット、インサイチュハイブリダイゼーションなど）。

【０２３８】
（予防的方法）
１つの局面において、本発明は、被験体において異常なＮＯＶの発現または活性と関連する疾患または状態を、ＮＯＶの発現または少なくとも１つのＮＯＶ活性を調節する薬剤をこの被験体に投与することによって予防するための方法を提供する。これらの状態には、ＮＯＶ１に対して、例えば、胸腺免疫細胞の発達、分化および活性を含む状態；精子形成および男性避妊症に関連する病理；いくらかのヒト新形成の診断；血液循環中の細胞の疾患または病理（例えば、赤血球および血小板）；および小細胞肺癌ＮＣＩ－Ｈ２３；ＮＯＶ２に対して、例えば、神経、心臓および血管の病理；ＮＯＶ３に対して、例えば、慢性関節リウマチ；先天性筋ジストロフィー；種々の筋肉障害；固定変形（関節拘縮症）；前立腺癌；および異常白質が挙げられる。異常なＮＯＶの発現または活性によって引き起こされるかまたはこれらに起因する、疾患にかかる危険がある被験体は、例えば、本明細書中に記載の診断アッセイまたは予後アッセイのいずれか、またはそれらの組み合わせによって、同定され得る。予防薬剤の投与は、疾患または障害が予防されるか、あるいはその進行を遅らせられるように、このＮＯＶ異常の特徴である症状の発現の前に行い得る。このＮＯＶ異常の型に依存して、例えば、ＮＯＶアゴニスト薬剤またはＮＯＶアンタゴニスト薬剤が、その被験体を処置するために使用され得る。その適切な薬剤は、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。本発明の予防方法は、以下の小区分において、さらに議論される。

【０２３９】
（治療方法）
本発明の別の局面は、治療目的のためにＮＯＶの発現または活性を調節する方法に関する。本発明の調節方法は、細胞を、その細胞に関するＮＯＶタンパク質活性の活性のうちの１つ以上を調節する薬剤と接触させる工程を包含する。ＮＯＶタンパク質活性を調節する薬剤は、核酸またはタンパク質、ＮＯＶタンパク質の天然に存在する同族リガンド、ペプチド、ＮＯＶペプチド模倣物、または他の低分子のような、本明細書中に記載されるような薬剤であり得る。１つの実施形態において、この薬剤は、ＮＯＶタンパク質活性のうちの１つ以上を刺激する。このような刺激薬剤の例としては、活性なＮＯＶタンパク質、およびその細胞に導入されたＮＯＶをコードする核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、この薬剤は、ＮＯＶタンパク質活性のうちの１つ以上を阻害する。このような阻害薬剤の例としては、アンチセンスＮＯＶ核酸分子、および抗ＮＯＶ抗体が挙げられる。これらの調節方法は、インビトロで（例えば、その薬剤とともにその細胞を培養することによって）、あるいはインビボで（例えば、被験体にその薬剤を投与することによって）実施され得る。このように、本発明は、ＮＯＶのタンパク質または核酸分子の、異常な発現または異常な活性によって特徴付けられる、疾患または障害に罹患した個体を処置する方法を提供する。１つの実施形態において、この方法は、ＮＯＶの発現または活性を調節する（例えば、アップレギュレートまたはダウンレギュレートする）薬剤（例えば、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイによって同定される薬剤）あるいはそのような薬剤の組み合わせを投与する工程を包含する。別の実施形態において、この方法は、ＮＯＶのタンパク質または核酸分子を、低減したかまたは異常な、ＮＯＶの発現または活性を補償するための治療として、投与する工程を包含する。

【０２４０】
ＮＯＶ活性の刺激は、ＮＯＶが異常にダウンレギュレートされている状況、および／またはＮＯＶ活性の増加が有益な効果を有するようである状況において、望ましい。このような状況の１つの例は、被験体が、異常な細胞増殖および／または細胞分化によって特徴付けられる障害（例えば、癌または免疫関連）を有する場合である。このような状況の別の例は、被験体が妊娠性疾患（例えば、プレクランプシア（ｐｒｅｃｌａｍｐｓｉａ））を有する場合である。

【０２４１】
（治療剤の生物学的効果の決定）

本発明の種々の実施形態において、適切なインビトロまたはインビボアッセイを行って、特定の治療剤の効果およびその投与が罹患組織の処置を示すか否かを決定する。

【０２４２】

種々の特定の実施形態において、インビトロアッセイが患者の障害に関与する代表的な細胞型で行われ、所定の治療剤がこの細胞型に対して所望の効果を発揮するか否かを決定し得る。治療において使用する化合物は、ヒト被験体において試験する前に適切な動物モデル系において試験され得る。これらの動物モデル系としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなど。同様に、インビボ試験については、当該分野で公知の任意の動物モデル系が、ヒト被験体に対する投与の前に使用され得る。

【０２４３】

（本発明の組成物の予防的用途および治療的用途）

本発明のＮＯＶ核酸およびタンパク質は、以下を含むが、これらに限定されない種々の障害に関連する強力な予防的適用および治療的適用に有用である：ＮＯＶ１について、胸腺免疫細胞の発達、分化、および活性化に関する適用；精子形成および男性の不妊に関連した病理学に関する適用；いくつかのヒト新形成の診断に関する適用；赤血球および血小板のような血液循環における細胞の疾患または病理学に関する適用；ＮＯＶ２について、神経学的病理学、心臓病理学、および血管病理学に関する適用；ＮＯＶ３について、慢性関節リウマチに関する適用；先天性筋ジストロフィー；種々の筋肉障害；固定変形（ｆｉｘｅｄ　ｄｅｆｏｒｍｉｔｙ）（関節拘縮症）；および異常な白質に関する適用。

【０２４４】

例のように、本発明のＮＯＶタンパク質をコードするｃＤＮＡは、遺伝子治療に有用であり、そしてこのタンパク質は、遺伝子治療を必要とする被験体に投与される場合、有用であり得る。非制限的例示として、本発明の組成物は、上記の障害に罹患した患者の処置についての効力を有する。

【０２４５】

本発明のＮＯＶタンパク質をコードする新規の核酸、およびＮＯＶタンパク質の両方、またはそれらのフラグメントは、診断適用に有用で有り得る。ここで、核酸またはタンパク質の存在または量が評価される。さらなる用途は、抗菌分子（すなわち、いくつかのペプチドは、抗菌特性を有することが見出されている）としての用途である。これらの材料は、治療的または診断的な方法における用途に関する本発明の新規の物質に免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。これらは、胸腺免疫細胞の発達、分化、および活性化；精子形成および男性の不妊に関連した病理学；いくつかのヒト新形成の診断；赤血球および血小板のような血液循環における細胞の疾患または病理学；神経学的病理学、心臓病理学、および血管病理学；慢性関節リウマチに関する適用；先天性筋ジストロフィー；種々の筋肉障害；固定性変形（ｆｉｘｅｄ　ｄｅｆｏｒｍｉｔｙ）（関節拘縮症）；および異常な白質に関与する。

【０２４６】

（実施例）

以下の実施例は、本発明の非制限的実施例の種々の局面により例示する。

【０２４７】

（実施例１．種々の細胞および組織におけるＮＯＶ１およびＮＯＶ２の定量的発現分析）

種々のクローンの定量的な発現を、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　ＡＢＩ　ＰＲＩＳＭ（登録商標）７７００　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍで行ったリアルタイム定量ＰＣＲ（ＴＡＱＭＡＮ（登録商標））によって４１の正常サンプルおよび約５５の腫瘍サンプルにおいて評価した。この結果を、以下の表１２、１３、および１４に示し、以下の略語を使用した：

ｃａ．＝癌（Ｃａｒｃｉｎｏｍａ）

＊＝転移から定着した（Ｅｓｔａｂｌｉｓｈｅｄ　ｆｒｏｍ　Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ）

ｍｅｔ＝転移（Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ）

ｓ　ｃｅｌｌ　ｖａｒ＝小細胞変異体（Ｓｍａｌｌ　Ｃｅｌｌ　Ｖａｒｉａｎｔ）
ｎｏｎ－ｓ＝非小（Ｎｏｎ－Ｓｍａｌｌ）
ｓｑｕａｍ＝鱗状（Ｓｑｕａｍｏｕｓ）
ｐｌ．ｅｆｆ＝胸水（Ｐｌｅｕｒａｌ　Ｅｆｆｕｓｉｏｎ）
ｇｌｉｏ＝神経膠腫（Ｇｌｉｏｍａ）
ａｓｔｒｏ＝星状細胞腫（Ａｓｔｒｏｃｙｔｏｍａ）
ｎｅｕｒｏ＝神経芽細胞腫（Ｎｅｕｒｏｂｌａｓｔｏｍａ）
ＮＡＴ＝隣接する正常な組織
第１に、９６ＲＮＡサンプルをβアクチンおよびＧＡＰＤＨに対して正規化し、た。ＲＮＡ（合計約５０ｎｇまたは約１ｎｇポリＡ＋）を、製造者のプロトコールに従って、ＴＡＱＭＡＮ（登録商標）Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔｓ　Ｋｉｔ（ＰＥ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ；ｃａｔ＃Ｎ８０８－０２３４）およびランダムヘキサマーを使用してｃＤＮＡに変換した。反応を、２０μｌで実施し、そして３０分間４８℃でインキュベートした。次いで、ｃＤＮＡ（５μｌ）を、製造業者のプロトコールに従って、βアクチンおよびＧＡＰＤＨ　ＴＡＱＭＡＮ（登録商標）Ａｓｓａｙ　Ｒｅａｇｅｎｔｓ（ＰＥ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ；カタログ番号４３１０８８１Ｅおよび４３１０８８４Ｅの各々）およびＴＡＱＭＡＮ（登録商標）ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（ＰＥ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ；カタログ番号４３０４４４７）を使用するＴＡＱＭＡＮ（登録商標）反応のために、別個のプレートに移した。反応を、以下のパラメータを使用して２５μｌで実施した：５０℃で２分；９５℃で１０分；９５℃で１５秒／６０℃で１分（４０サイクル）。結果を、対数スケールを使用するＣＴ値（所与のサンプルが、蛍光の閾値レベル超えるサイクル）として記録し、所与のサンプルと最も低いＣＴ値を有するサンプルとの間のＲＮＡ濃度の差は、２のΔＣＴ乗として示した。次いで、相対発現パーセントを、このＲＮＡの差の逆数をとって１００を掛けることにより得る。相対発現パーセントは、βアクチンおよびＧＡＰＤＨレベルに関する。正常組織対癌性組織におけるより高い相対発現は、遺伝子が癌の型についてのマーカーである癌性組織における遺伝子の発現の増加を示す。βアクチンおよびＧＡＰＤＨについて得られたＣＴの平均値は、ＲＮＡサンプルを正規化するために使用した。最も高いＣＴ値を生じるＲＮＡサンプルは、さらなる希釈を必要としないが、他の全てのサンプルは、β－アクチン／ＧＡＰＤＨの平均ＣＴ値に従ってこのサンプルと比較して希釈した。

【０２４８】

正規化ＲＮＡ（５μｌ）を、ｃＤＮＡに転換し、製造者の指示に従って、Ｏｎｅ　Ｓｔｅｐ　ＲＴ－ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ　Ｒｅａｇｅｎｔｓ（ＰＥ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ；カタログ番号４３０９１６９）および遺伝子特異的プライマーを使用するＴＡＱＭＡＮ（登録商標）によって分析した。プローブおよびプライマーを、インプットとして標的クローンの配列を使用する、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　ＢｉｏｓｙｓｔｅｍのＰｒｉｍｅｒ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　Ｓｏｆｔｗａｒｅパッケージ（Ａｐｐｌｅ　ＣｏｍｐｕｔｅｒのＭａｃｉｎｔｏｓｈ　Ｐｏｗｅｒ　ＰＣ用のヴァージョンＩ）または類似のアルゴリズムに従って、各アッセイに対して設定した。デフォルトの設定を、反応条件に対して使用し、そして以下のパラメータを、プライマーを選択する前に設定した：プライマーの濃度＝２５０ｎＭ、プライマーの融点（T_m）範囲＝５８℃～６０℃、プライマーの最適T_m＝５９℃、プライマーの最大差＝２℃、プローブは、５’Ｇを有さず、プローブT_mは、プライマーT_mよりも１０℃高くなければならず、アンプリコンサイズ７５ｂｐ～１００ｂｐ。選択されるプローブおよびプライマー（以下を参照のこと）は、Ｓｙｎｔｈｅｇｅｎ（Ｈｏｕｓｔｏｎ，ＴＸ，ＵＳＡ）によって合成された。プローブを、未反応の色素を除去するために2回ＨＰＬＣ精製し、プローブのそれぞれ５’末端および３’末端へのレポーター色素およびクエンチャー色素のカップリングを立証するために、マススペクトルによって評価した。正方向プライマーおよび逆方向プライマーの最終濃度は、各々９００ｎＭであり、そしてプローブの濃度は、２００ｎＭであった。

【０２４９】
ＰＣＲ条件：各組織および各細胞株由来の正規化ＲＮＡを、９６ウェルＰＣＲプレート（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）の各ウェルにスポットした。２つのプローブ（ＳＥＱＸプローブで多重化されたＳＥＱＸ特異的プローブおよび別の遺伝子特異的プローブ）を含むＰＣＲカクテルを、ＰＥ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　７７００の１×ＴａｑＭａｎ^{TM} ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$、ｄＮＴＰ（ｄＡ、Ｇ、Ｃ、Ｕ（１：１：１：２の比））、０．２５Ｕ／ｍｌ　ＡｍｐｌｉＴａｑ　Ｇｏｌｄ^{TM}（ＰＥ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）、および０．４Ｕ／μｌのＲＮａｓｅインヒビター、および０．２５Ｕ／μｌの逆転写酵素を含む）を用いて設定した。逆転写を、４８℃で３０分間実施し、次いで以下の増幅／ＰＣＲサイクルを実施した：９５℃で１０分、次いで９０℃で１５秒間、６０℃で１分間を４０サイクル。
【０２５０】
（Ａ．ＮＯＶ１）
【０２５１】
【化１７】

プローブ名：Ag190

プローブ	配列	長さ	開始位置	配列番号
順方向	5'-TGGAGGAAGAATCACCACAAGA-3'	22	243	8
プローブ	TET-5'-CAAGCCACAAACTGTGACGTGAACCTG-3'-TAMRA	27	271	9
逆方向	5'-GTGGCATCAGCACGGAGTG-3'	19	300	10

プライマープローブセットＡｇ１９０を用いるクローンＮＯＶ１について得られた結果を、表１２に示す。
【０２５２】
【表２】

表 12.

組織名	相対的発現 %
内皮細胞	0.0
内皮細胞（処置）	0.0
脾臓	0.0
脾臓癌 CAPAN 2	0.0
副腎 (new lot*)	92.0
甲状腺	0.0
唾液腺	23.8
下垂体	0.0
脳（胎児）	0.0
脳（全体）	0.0
脳（扁桃）	0.0
脳（小脳）	0.0
脳（海馬）	0.0
脳（視床）	0.0
大脳皮質	1.2
脊髄	0.0
CNS癌(膠芽/星状) U87-MG	2.5
CNS 癌（膠芽/星状）U-1 18-MG	0.0
CNS 癌（星状）SW1783	0.0
CNS 癌*(神経; met)SK-N-AS	7.8
CNS 癌（星状）SF-539	0.0
CNS 癌（星状）SNB-75	0.0
CNS 癌（膠芽）SNB-19	2.1
CNS 癌（膠芽）U251	0.0
CNS 癌（膠芽）SF-295	0.3
心臓	0.0
骨格筋 (new lot*)	0.0
骨髄	0.0
胸腺	0.0
脾臓	0.0
リンパ節	0.0
大腸	0.0
胃	0.0
小腸	7.3
大腸癌 SW480	0.0
大腸癌* (SW480met)SW620	0.4

組織名	相対的発現 %
腎臓癌/腎臓-786-0	0.0
腎臓癌/腎臓-A498	0.0
腎臓癌/腎臓-RXF 393	0.0
腎臓癌/腎臓-ACHN	0.9
腎臓癌/腎臓-UO-31	0.0
腎臓癌/腎臓-TK-10	0.6
肝臓	0.0
肝臓(胎児)	0.0
肝臓癌（肝芽細胞腫）HepG2	32.1
肺	0.0
肺（胎児）	0.0
肺 癌（小細胞）LX-1	0.0
肺 癌（小細胞）NCI-H69	22.9
肺 癌（小細胞変異）SHP-77	0.0
肺 癌（大細胞）NCI-H460	4.0
肺 癌（非小細胞）A549	8.4
肺 癌（非小細胞）NCI-H23	100.0
肺 癌（非小細胞）HOP-62	0.8
肺 癌（非小細胞）NCI-H522	15.4
肺 癌（扁平）SW 900	0.0
肺 癌（扁平）NCI-H596	42.3
乳腺	0.0
乳癌 *（胞水）-MCF-7	2.1
乳癌 *（胞水）MDA-MB-231	0.0
乳癌 *（胞水）-T47D	21.0
乳癌 BT-549	0.0
乳癌 MDA-N	16.5
卵巣	0.0
卵巣癌-OVCAR-3	1.0
卵巣癌-OVCAR-4	0.2
卵巣癌-OVCAR-5	1.8
卵巣癌-OVCAR-8	7.5
卵巣癌-IGROV-1	3.9
卵巣癌*-(腹水) SK-OV-3	0.5
子宮	0.0
胎盤	0.0

表12つづき

大腸癌	HT29	0.0
大腸癌	HCT-116	14.6
大腸癌	CaCo-2	14.5
83219 CC Well to Mod Diff (ODO3866)		0.0
大腸癌	HCC-2998	55.1
胃癌*	(肝臓met)NCI-N87	0.0
膀胱		0.0
気管		0.0
腎臓		4.4
腎臓（胎児）		6.1

前立腺		2.1
前立腺癌 *（骨 met）PC-3		11.5
精巣		0.0
黒色腫	Hs688 (A). T	0.0
黒色腫*	(met) Hs688 (B). T	0.0
黒色腫	UACC-62	0.0
黒色腫	M14	0.0
黒色腫	/-LOX IMVI	0.0
黒色腫*/	骨- (met) SK-MEL-5	0.0

クローンＮＯＶ－１発現は、特定の癌細株（特に、非小細胞肺癌ＮＣＩ－Ｈ２３）において増強されるが、対応する正常な組織由来の細胞株においては増強されない。従って、ＮＯＶ－１は、このような組織における癌特異的マーカーとして有用で有り得る。

【０２５３】

（Ｂ．ＮＯＶ２）

【０２５４】

【化１８】

ﾌﾟﾛｰﾌﾞ名：Ag087

プライマー	配列	長さ	開始位置	配列番号
順方行	5'-CGCAGTTTCACTCGGGAGAT-3'	20	1870	11
ﾌﾟﾛｰﾌﾞ	TET-5'-CCTCTAGGATCCACATCGAGAAAATCATCGG-3'-TAMRA	31	1895	12
逆方行	5'-AGCAGACTTCCCCGGAGTCT-3'	20	1932	13

プライマープローブセットＡｇ８０７を用いるクローンＮＯＶ２について、細胞株のパネルにおいて得られた結果を表１３に示し、外科的組織サンプルの第２のパネルにおいて得られた結果を、表１４に示す。表１４において「ＮＡＴ」は、腫瘍または癌に直に隣接する領域から外科医により得られた非癌性と判断した外科的組織を表す。

【０２５５】

【表３】

表 13.

組織名	相対的発現 %	組織名	相対的発現 %
内皮細胞	0.3	膵臓(胎児)	1.0
内皮細胞（処置）	0.6	腎臓癌/腎臓-786-0	0.6
膵臓	1.0	腎臓癌/腎臓-A498	0.3
膵臓癌 CAPAN 2	2.5	腎臓癌/腎臓-RXF 393	0.2
脂肪	1.8	腎臓癌/腎臓-ACHN	0.4
副腎	0.2	腎臓癌/腎臓-UO-31	0.3
甲状腺	0.1	腎臓癌/腎臓-TK-10	1.3
唾液腺	0.2	肝臓	0.3
下垂体	0.2	肝臓(胎児)	0.1
脳（胎児）	0.9	肝臓癌（肝芽細胞腫）HepG2	1.0
脳（全体）	3.0	肺	0.2
脳（扁桃）	0.7	肺（胎児）	0.8
脳（小脳）	7.1	肺癌（小細胞）LX-1	0.3
脳（海馬）	2.8	肺癌（小細胞）NCI-H69	0.7
脳（視床）	2.7	肺癌（小細胞変異）SHP-77	25.9
	2.5	肺癌（大細胞）NCI-H460	0.7

表13つづき

	脳(視床下部)	
	脊髄	
	CNS癌(膠芽/星状) U87-MG	
	CNS 癌 (膠芽/星状) U-1 18-MG	
	CNS 癌 (星状) SW1783	
	CNS 癌*(神経; met)SK-N-AS	
	CNS 癌 (星状) SF-539	
	CNS 癌 (星状) SNB-75	
	CNS 癌 (膠芽) SNB-19	
	CNS 癌 (膠芽) U251	
	CNS 癌 (膠芽) SF-295	
	心臓	
	骨格筋	
	骨髄	
	胸腺	
	脾臓	
	リンパ節	
	大腸 (上行)	
	胃	
	小腸	
	大腸癌 SW480	
	大腸癌* (SW480met)SW620	
	大腸癌 HT29	
	大腸癌 HCT-116	
	大腸癌 CaCo-2	
	大腸癌 HCT-15	
	大腸癌 HCC-2998	
	胃癌* (肝臓met)NCI-N87	
	膀胱	
	気管	
	腎臓	
0.3	肺 癌 (非小細胞) A549	1.1
2.1	肺 癌 (非小細胞) NCI-H23	0.6
0.4	肺 癌 (非小細胞) HOP-62	1.0
0.3	肺 癌 (非小細胞) NCI-H522	0.3
0.3	肺 癌 (扁平) SW 900	11.5
1.1	肺 癌 (扁平) NCI-H596	0.8
0.0	乳腺	1.8
2.2	乳癌 * (胞水)-MCF-7	0.3
2.0	乳癌 * (胞水) MDA-MB-231	1.6
0.9	乳癌 * (胞水)-T47D	0.5
0.0	乳癌 BT-549	4.7
0.4	乳癌 MDA-N	1.6
0.1	卵巣	0.6
0.1	卵巣癌-OVCAR-3	0.6
3.5	卵巣癌-OVCAR-4	0.5
0.4	卵巣癌-OVCAR-5	4.6
0.4	卵巣癌-OVCAR-8	0.3
0.6	卵巣癌-IGROV-1	0.6
1.3	卵巣癌*-(腹水) SK-OV-3	1.0
0.5	子宮	1.8
0.3	胎盤	1.5
0.2	前立腺	0.5
2.8	前立腺癌 * (骨 met) PC-3	100.0
8.0	精巣	4.6
1.2	黒色腫 Hs688 (A). T	0.1
0.9	黒色腫* (met) Hs688 (B). T	0.1
1.5	黒色腫 UACC-62	0.8
2.8	黒色腫 M14	0.3
0.4	黒色腫 LOX IMVI	0.7
1.3	黒色腫* (met) SK-MEL-5	0.2
1.7	黒色腫 SK-MEL-28	0.3

【０２５６】
【表４】

表 14.

組織名/実行名	相対的発現% 2tm7231	2tm8191	組織名/実行名	相対的発現% 2tm7231	2tm8191
正常結腸 GENPAK 061003	0.0	0.0	腎 NAT Clontech 8120608	0.0	0.0
83219 CC Well to Mod Diff (OD03866)	0.0	0.0	脳癌 Clontech 8120613	0.0	0.0
83220 CC NAT (OD03866)	0.0	0.0	脳癌 NAT Clontech 8120614	0.0	0.0
83221 CC Gr.2 右腸S状結腸(OD03868)	0.0	0.0	脳癌 Clontech 9010320	0.0	0.0
83222 CC NAT (OD03868)	0.0	0.0	脳 NAT Clontech 9010321	0.0	0.0
83235 CC Mod Diff (OD03920)	0.0	0.0	正常子宮 GENPAK 061018	4.2	0.0
83236 CC NAT (OD03920)	0.0	0.0	子宮癌 GENPAK 064011	0.0	0.0
83237 CC Gr.2 上行結腸 (OD03921)	0.0	0.0	正常甲状腺 Clontech A+ 6570-1**	0.0	0.0
83238 CC NAT (OD03921)	0.0	0.0	甲状腺 GENPAK 064010	3.3	1.3
83241 CC 対応する肝切除由来 (OD04309)	27.0	3.0	甲状腺 NAT INVITROGEN A302152	0.0	0.0
83242 肝 NAT (OD04309)	0.0	0.0	正常乳房 INVITROGEN A302153	3.8	2.9
87472 Colon mets to lung (OD04451-01)	0.0	0.0	乳癌 GENPAK 061019	42.6	56.6
87473 肺 NAT (OD04451-02)	0.0	0.0	84877 乳癌 (OD04566)	7.6	6.0
正常前立腺 Clontech A+ 6546-1	5.6	6.8	85975 乳癌 (OD04590-01)	39.2	38.4
84140 前立腺癌 (OD04410)	0.0	0.0	85976 乳癌 転移性 Mets (OD04590-03)	35.4	45.7
84141 前立腺 NAT (OD04410)	100.0	100.0	87070 乳癌 (OD04655-05)	50.7	55.1
87073 前立腺癌 (OD04720-01)	0.6	0.0	GENPAK Breast Cancer 064006	46.0	28.5
87074 前立腺 NAT (OD04720-02)	0.0	0.0	乳癌 Clontech 9100266	2.1	0.0
正常肺 GENPAK 061010	0.0	0.0	乳癌 NAT Clontech 9100265	8.5	0.0
83239 肺 Met (肺AD) (OD04286)	0.4	0.0	乳癌 INVITROGEN A209073	4.2	1.3
83240 肺 NAT (OD04286)	1.2	0.0	乳房 NAT INVITROGEN A2090734	0.6	0.0
84136 肺 悪性癌 (OD03126)	0.0	0.0	正常肝 GENPAK 061009	0.0	0.0
84137 肺 NAT (OD03126)	1.7	0.0	肝癌 GENPAK 064003	0.5	0.0
84871 肺 癌 (OD04404)	0.0	0.0	肝癌 Research Genetics RNA 1025	0.0	0.0
84872 肺 NAT (OD04404)	0.0	0.4	肝癌 Research Genetics RNA 1026	0.0	0.0
84875 肺癌 (OD04565)	0.0	0.0	対性(paired)肝癌 Tissue Research Genetics RNA 6004-T	0.0	0.0
85950 肺癌 (OD04237-01)	0.0	0.0	対小性肝 Tissue Research Genetics RNA 6004-N	0.9	0.0
85970 肺 NAT (OD04237-02)	1.6	0.8	対小性肝癌 Tissue Research Genetics RNA 6005-T	2.7	0.0
83255 眼 Mel Met (肝AD) (OD04310)	48.6	1.8	対性 Tissue Research Genetics RNA 6005-N	1.4	0.0
83256 肝 NAT (OD04310)	0.0	0.0	正常膀胱 GENPAK 061001	0.0	0.0
84139 メラノーマ Mets (肺AD) (OD04321)	0.0	0.0	膀胱癌 Research Genetics RNA 1023	0.0	0.0
84138 肺 NAT (OD04321)			膀胱癌 INVITROGEN A302173		

表14つづき

正常腎	GENPAK 061008		0.0	0.0	87071	膀胱癌	(OD04718-01)		6.0	1.0
83786 腎	Ca, Nuclear grade 2 (OD04338)		0.0	0.0	87072	膀胱（正常隣接）	(OD04718-03)		2.7	0.0
組織名/実行名			相対的発現%		組織名/実行名				相対的発現%	
			2tm7231	2tm8191					2tm7231	2tm8191
83787	腎	NAT (OD04338)	0.0	0.0	正常卵巣	Res. Gen.			6.5	0.0
83788	腎	Ca Nuclear grade 1/2 (OD04339)	0.0	0.0	卵巣癌	GENPAK 064008			0.0	0.0
83789	腎	NAT (OD04339)	0.9	0.6	87492 卵巣癌	(OD04768-07)			25.9	11.7
83790	腎	Ca, Clear cell type (OD04340)	0.0	0.0	87493 卵巣	NAT (OD04768-08)			0.0	0.0
83791	腎	NAT (OD04340)	0.0	0.0	正常胃	GENPAK 061017			0.0	0.0
83792	腎	Ca, Nuclear grade 3 (OD04348)	0.0	0.0	NAT 胃	Clontech 9060359			0.0	0.0
83793	腎	NAT (OD04348)	0.0	0.0	胃癌	Clontech 9060395			20.7	27.9
87474	腎癌	(OD04622-01)	0.0	0.0	NAT 胃	Clontech 9060394			1.7	0.0
87475	腎	NAT (OD04622-03)	0.0	0.0	胃癌	Clontech 9060397			0.0	0.0
85973	腎癌	(OD04450-01)	0.0	0.0	NAT 胃	Clontech 9060396			0.0	0.0
85974	腎	NAT (OD04450-03)	0.0	0.0	胃癌	GENPAK 064005			0.0	0.0
腎癌		Clontech 8120607	0.0	0.0						

表１３および１４における結果は、クローンＮＯＶ２は、特定の腫瘍（特に前立腺癌転移（ｐｒｏｓｔａｔｅ　ｃａｎｃｅｒ　ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ））において高度に発現されるが、対応する正常な細胞株においては高度に発現されない（表１３）こと、そしてこのクローンは、多くの外科的腫瘍サンプル（特に前立腺癌（ｐｒｏｓｔａｔｅ　ｃａｎｃｅｒ））において高度に発現されるが、直に隣接する正常な組織（ｉｍｍｅｄｉａｔｅ　ｎｏｒｍａｌ　ａｄｊａｃｅｎｔ　ｔｉｓｓｕｅ）においては最小に発現されるか、または

検出可能ではないことを実証する。これらの結果は、クローンＮＯＶ２が、特定の癌（特に前立腺癌（ｐｒｏｓｔａｔｅ　ｃａｎｃｅｒ））についてのマーカーとして用いられ得ることを示す。

【０２５７】

（実施例２：放射ハイブリッドマッピングは、ＮＯＶ２およびＮＯＶ３の染色体位置を提供する）

ヒト染色体マーカーを用いる放射ハイブリッドマッピングを、本発明のＮＯＶ２およびＮＯＶ３について実施した。これらの結果を得るために使用した手順は、Ｓｔｅｅｎ，ＲＧら（Ａ　Ｈｉｇｈ－Ｄｅｎｓｉｔｙ　Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ｌｉｎｋａｇｅ　ａｎｄ　Ｒａｄｉａｔｉｏｎ　Ｈｙｂｒｉｄ　Ｍａｐ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｒａｔ，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　１９９９（１９９９年５月２１日オンラインで公開）第９巻：ＡＰ１－ＡＰ８、１９９９）に記載される手順に類似する。無作為化した照射により誘導したヒト染色体フラグメントを含む９３細胞クローンのパネルを、９６ウェルプレートで、所定のクローンを独特の様式で同定するよう設計したＰＣＲプライマーを使用して、スクリーニングした。表１５は、本発明の３つのクローンのうち２つについて得られた結果を提供する。これは、本発明の遺伝子にまたがるマーカー、およびこれらを隔てるｃＲの距離を示す。

【０２５８】

【表５】

表 15

クローン	染色体	マーカーからの距離，cR
NOV2	1	AFMA129ZB5, 0.0
NOV3	11	D11S913, 5.5
NOV3	11	WI-1409, 4.7

（実施例３：ＮＯＶ２の分子クローニング）

クローンＮＯＶ２のオープンリーディングフレームは、残基５４０～５６６の間にあると、ＰＳＯＲＴにより予想される、膜貫通ドメインを有するＩ型膜タンパク質をコードする。さらに、ＳＩＧＮＡＬＰは、シグナルペプチダーゼ切断部位が、残基２７と２８との間に生じることを予想する。従って、クローンＮＯＶ２の予想される細胞外ドメインの成熟形態を、残基２８～５３８のクローニングの標的とした。オリゴヌクレオチドプライマーを、ＮＯＶ２のこの成熟ドメインをコードするＤＮＡセグメントをＰＣＲ増幅するために設計した。正方向プライマーは、インフレームＢａｍＨＩ制限部位を含む。逆方向プライマーは、インフレームＸｈｏＩ制限部位を含む。２つのプライマーの配列は、以下に示される：

【０２５９】

【化１９】

NOV2 順方向 : GGATCCGCGCGCGGCGAAGTGAATTTGCTGG (SEQ ID NO:14) および

NOV2 逆方向 : CTCGAGGGTCCTGGTGTCATAGCGGGGCC (SEQ ID NO:15).

ＰＣＲ反応は、５０μｌの総反応容量中に、テンプレートとして５ｎｇのヒト視床下部ｃＤＮＡ、１μＭのＮＯＶ２順方向プライマーおよびＮＯＶ２逆方向プライマーの各々、５μＭのｄＮＴＰ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ；Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，ＣＡ）および１μｌの５０×Ａｄｖａｎｔａｇｅ－ＨＦ２ポリメラーゼ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ；Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，ＣＡ）を用いてセットアップした

。以下の反応条件が使用された：
（ａ）　９６℃　３分間
（ｂ）　９６℃　３０秒間変性
（ｃ）　７０℃　３０秒間、プライマーアニーリング。この温度を１℃／サイクルで次第に低下させた
（ｄ）　７２℃　１分間伸長
工程（ｂ）～（ｄ）を全１０回繰り返す
（ｅ）　９６℃　３０秒間、変性
（ｆ）　６０℃　３０秒間、アニーリング
（ｇ）　７２℃　１分間、伸長
工程（ｅ）～（ｇ）を全２５回繰り返す
（ｈ）　７２℃　５分間、最終伸長。
【０２６０】
約１５００ｂｐのサイズを有する単一の増幅産物が、アガロースゲル電気泳動によって検出された。産物を単離し、そしてｐＣＤＮＡ２．１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）に連結した。
【０２６１】
この構築物を以下の遺伝子特異的プライマーを用いて配列決定した：
【０２６２】
【化２０】

NOV2 S1: TACCTGGAGTCGGACCGC (SEQ ID NO:16),
NOV2 S2: GCGGTCCGACTCCAGGTA (SEQ ID NO:17),
NOV2 S3: CAGTGCGTGCGGCACTCAG (SEQ ID NO:18),
NOV2 S4: TGAGTGCCGCACGCACTGG (SEQ ID NO:19),
NOV2 S5: CTGGACCCAGGTGGCCGC (SEQ ID NO:20),
NOV2 S6: GCGGCCACCTGGGTCCAG (SEQ ID NO:21),
NOV2 S7: CCCGAGCAGCCGAACGGC (SEQ ID NO:22), および
NOV2 S8: GCCGTTCGGCTGCTCGGG (SEQ ID NO:23).

このクローンを、クローンＮＯＶ２のヌクレオチド配列（配列番号（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：）２）の２８～５３８のヌクレオチド配列に１００％同一であることを検証した。この構築物をｐＣＲ２．１－ｃｇＮＯＶ２－Ｓ３４０－１Ｃと呼ぶ。
【０２６３】
（実施例４．ＮＯＶ３のクローニング）
クローンＮＯＶ３のオープンリーディングフレームは、残基５４７～５８０の間にあると、ＰＳＯＲＴにより予想される、膜貫通ドメインを有するＩ型膜タンパク質をコードする。ＳＩＧＮＡＬＰは、シグナルペプチダーゼ切断部位が、残基５１と５２との間にあることを予想する。上記の理由により、細胞外ドメインの成熟形態を、残基５２～５４６のクローニングの標的とした。オリゴヌクレオチドプライマーを、この成熟細胞外ドメインをコードするＤＮＡセグメントをＰＣＲ増幅するために設計した。正方向プライマーは、インフレームＢａｍＨＩ制限部位を含む。逆方向プライマーは、インフレームＸｈｏＩ制限部位を含む。２つのプライマーの配列は、以下に示される：
【０２６４】
【化２１】

NOV3Forw: GGATCCACCACCTGCCCCTCGGTGTGC (SEQ ID NO:24)および
NOV3Rev: CTCGAGGCCAGCGTTCTGCTCCTGGTTGAGTGTGG (SEQ ID NO:25).

ＰＣＲ反応は、５０μｌの総反応容量中に、５ｎｇのヒト胎児脳ｃＤＮＡテンプレート、１μＭのＮＯＶ３順方向（Ｆｏｒｗ）プライマーおよびＮＯＶ３逆方向（Ｒｅｖ）プライマーの各々、５μＭのｄＮＴＰ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ；Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ）および１μｌの５０×Ａｄｖａｎｔａｇｅ－ＨＦ２ポリメラーゼ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ；Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ）を用いてセットアップした。用いられた反応条件は、実施例Ａに記載されるのと同じであった。

【０２６５】

約１５００ｂｐのサイズを有する単一の増幅産物が、アガロースゲル電気泳動によって検出された。産物を単離し、そしてｐＣＤＮＡ２．１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）に連結した。

【０２６６】

この構築物を以下の遺伝子特異的プライマーを用いて配列決定した：

【０２６７】

【化２２】

NOV3S1: CGCACCATTGCCAGGGAC (SEQ ID NO:26),
NOV3S2: GTCCCTGGCAATGGTGCG (SEQ ID NO:27),
NOV3S3: CTGGTGCGCAATTCGCTGGCC (SEQ ID NO:28),
NOV3S4: GGCCAGCGAATTGCGCACCAG (SEQ ID NO:29),
NOV3S5: CACGCCTCTGCCACCACG (SEQ ID NO:30),および
NOV3S6; CGTGGTGGCAGAGGCGTG (SEQ ID NO:31).

このクローンを、クローンＮＯＶ３のヌクレオチド配列（配列番号（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：）６）の５６～５４６のヌクレオチド配列に１００％同一であることを検証した。この構築物をｐＣＲ２．１－ｃｇＮＯＶ３－Ｓ３３１－３Ａと呼ぶ。

【０２６８】

（実施例５．哺乳動物発現ベクターｐＣＥＰ４／Ｓｅｃの調製）

オリゴヌクレオチドプライマー

【０２６９】

【化２３】

pSec-V5-His 順方向 : CTCGTCCTCGAGGGTAAGCCTATCCCTAAC (SEQ ID NO:32)および
pSec-V5-His 逆方向 : CTCGTCGGGCCCCTGATCAGCGGGTTTAAAC (SEQ ID NO:33),

を設計して、Ｖ５およびＨｉｓ６を含むｐｃＤＮＡ３．１－Ｖ５Ｈｉｓ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）からフラグメントを増幅する。ＰＣＲ増幅産物を、ＸｈｏＩおよびＡｐａＩで消化し、そしてＩｇκリーダー配列（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を有するＸｈｏＩ／ＡｐａＩ－消化ｐＳｅｃＴａｇ２ Ｂベクターに連結した。得られたベクター（ｐＳｅｃＶ５Ｈｉｓ）の正確な構造（インフレームＩ

ｇκリーダーおよびＶ５－Ｈｉｓ６を含む）を、ＤＮＡ配列分析によって検証した。ベクターｐＳｅｃＶ５Ｈｉｓを、正しいフレームで、上述の配列を保持するフラグメントを提供するために、ＰｍｅＩおよびＮｈｅＩで消化した。次いで、ＰｍｅＩ－ＮｈｅＩフラグメントを、ＢａｍＨＩ／クレノウで処理し、そしてＮｈｅＩで処理したベクターｐＣＥＰ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）に連結した。得られたベクターは、ｐＣＥＰ４／Ｓｅｃと命名され、そしてＰＣＭＶおよび／またはＰＴ７プロモーターの制御下でインフレームＩｇκリーダー配列、目的のクローンの挿入部位、Ｖ５およびＨｉｓ６配列を含む。ｐＣＥＰ４／Ｓｅｃは、任意のタンパク質をＩｇκ鎖シグナルペプチドに融合することにより、異種タンパク質を発現および分泌させる発現ベクターである。発現されたタンパク質の検出および精製は、Ｃ末端のＶ５エピトープタグおよび６Ｘ Ｈｉｓタグの存在によって補助される（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）。

【０２７０】

（実施例６：ヒト胚腎臓（ＨＥＫ）２９３細胞におけるＮＯＶ２の発現）

ＮＯＶ２配列を含むＢａｍＨＩ－ＸｈｏＩフラグメントは、ｐＣＲ２．１－ｃｇＮＯＶ２－Ｓ３４０－１Ｃ（実施例３）から単離され、そしてｐＣＥＰ４／Ｓｅｃ（実施例５）にサブクローニングし、発現ベクターｐＣＥＰ４／Ｓｅｃ－ＮＯＶ２を生成させた。このｐＣＥＰ４／Ｓｅｃ－ＮＯＶ２ベクターを、製造業者の指示に従って、ＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅＰｌｕｓ試薬（Ｇｉｂｃｏ／ＢＲＬ／Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｏｌｏｇｉｅｓ；Ｒｏｃｈｖｉｌｌｅ，ＭＤ）を用いて、ＨＥＫ２９３細胞にトランスフェクトした。細胞のペレットおよび上清をトランスフェクションの７２時間後に収集し、そしてＮＯＶ２発現について、還元条件下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥ泳動後、抗Ｖ５抗体を用いて、ウエスタンブロットにより検査した。図１は、ＮＯＶ２が、トランスフェクトした２９３細胞により分泌される約６４ｋＤａのタンパク質の見かけの分子量を有するポリペプチドとして上清培地において発現される。用いた分子量標準は、ＳｅｅＢｌｕｅ Ｍａｒｋｅｒ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）であった。この結果は、５６８４２．５Ｄａの予想分子量に合理的に一致する。プログラムＰＯＳＩＴＥは、このポリペプチド中に３つのＮ－グリコシル化部位が存在することを予想する。トランスフェクトした細胞において発現されるポリペプチドのグリコシル化は、予想された分子量と観察した分子量との間の差異に合理的であり得る。

【０２７１】

（実施例７：ヒト胚腎臓（ＨＥＫ）２９３細胞におけるＮＯＶ３の発現）

ＮＯＶ３配列を含むＢａｍＨＩ－ＸｈｏＩフラグメントは、ｐＣＲ２．１－ｃｇＮＯＶ３－Ｓ３３１－３Ａ（実施例４）から単離され、そしてｐＣＥＰ４／Ｓｅｃ（実施例５）にサブクローニングし、発現ベクターｐＣＥＰ４／Ｓｅｃ－ＮＯＶ３を生成させた。このｐＣＥＰ４／Ｓｅｃ－ＮＯＶ３ベクターを、製造業者の指示に従って、ＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅＰｌｕｓ試薬（Ｇｉｂｃｏ／ＢＲＬ／Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｏｌｏｇｉｅｓ；Ｒｏｃｈｖｉｌｌｅ，ＭＤ）を用いて、ＨＥＫ２９３細胞にトランスフェクトした。細胞のペレットおよび上清をトランスフェクションの７２時間後に収集し、そしてＮＯＶ３発現について、還元条件下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥ泳動後、抗Ｖ５抗体を用いて、ウエスタンブロットにより検査した。図２は、ＮＯＶ３が、トランスフェクトした２９３細胞により分泌される約７０ｋＤａのタンパク質の見かけの分子量を有するポリペプチドとして上清に発現される。用いた分子量標準は、ＳｅｅＢｌｕｅ Ｍａｒｋｅｒ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）であった。この結果は、５４５７２．３Ｄａの予想分子量に合理的に一致する。プログラムＰＯＳＩＴＥは、このポリペプチド中に３つのＮ－グリコシル化部位が存在することを予想する。トランスフェクトした細胞において発現されるポリペプチドのグリコシル化は、分子量における差異に合理的であり得る。プログラムＰＯＳＩＴＥは、このポリペプチド中に２つのＮ－グリコシル化部位が存在することを予想する。トランスフェクトした細胞において発現されるポリペプチドのグリコシル化は、予想された分子量と観察した分子量との間の差異に合理的であり得る。

【０２７２】

（他の実施形態）
本発明は、その詳細な記載と供に記載されたが、先の記載は、例示のためであり、本発明の範囲を限定しない。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって規定される。他の局面、利点、および改変は、上記の請求項の範囲内である。
【図面の簡単な説明】
【図１】
図１は、２９３細胞によって分泌されたＮＯＶ２ポリペプチドのウエスタンブロットを示す。
【図２】
図２は、２９３細胞によって分泌されたＮＯＶ３ポリペプチドのウエスタンブロットを示す。

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
26 April 2001 (26.04.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/29217 A2

(51) International Patent Classification⁷: C12N 15/12, 15/16, C07K 14/575, 14/705, 14/47, G01N 33/68, C12Q 1/68, C07K 16/18, 16/26, 16/28, C12N 5/10, A61K 31/7088, 38/17, 38/22, 39/395, 48/00

(21) International Application Number: PCT/US00/28474

(22) International Filing Date: 13 October 2000 (13.10.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/159,805	15 October 1999 (15.10.1999)	US
60/159,992	18 October 1999 (18.10.1999)	US
60/160,952	22 October 1999 (22.10.1999)	US
Not Furnished	12 October 2000 (12.10.2000)	US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:

US	60/159,805 (CIP)
Filed on	15 October 1999 (15.10.1999)
US	60/159,992 (CIP)
Filed on	18 October 1999 (18.10.1999)
US	60/160,952 (CIP)
Filed on	22 October 1999 (22.10.1999)
US	Not furnished (CIP)
Filed on	12 October 2000 (12.10.2000)

(71) Applicant (*for all designated States except US*): CURAGEN CORPORATION [US/US]; 555 Long Wharf Drive, 11th floor, New Haven, CT 06511 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): PRAYAGA, Sudhirdas, K. [IN/US]; 140 Mill Street, Apt. 18 136, East Haven, CT 06512 (US). TALPIER, Raymond, J., Jr. [US/US]; 407 Holmes Street, East Haven, CT 06512 (US). BANDARU, Raj [IN/US]; 3C 107 Cottage Street, New Haven, CT 06511 (US).

(74) Agent: ELRIFI, Ivor, R.; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky, and Popeo, P.C., One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

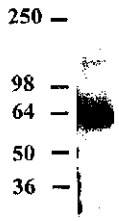
(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
Without international search report and to be republished upon receipt of that report.

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

(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDES AND POLYNUCLEOTIDES ENCODING SAME

(57) Abstract: Disclosed herein are novel human nucleic acid sequences. Also disclosed are polypeptides encoded by these nucleic acid sequences, and antibodies which immunospecifically-bind to the polypeptide, as well as derivatives, variants, mutants, or fragments of the aforementioned polypeptide, polynucleotide, or antibody. The invention further discloses therapeutic, diagnostic and research methods for diagnosis, treatment, and prevention of disorders involving those novel nucleic acids and proteins.



WO 01/29217 A2

WO 01/29217 PCT/US00/28474

NOVEL POLYPEPTIDES AND POLYNUCLEOTIDES ENCODING SAME

BACKGROUND OF THE INVENTION

The invention generally relates to nucleic acids and polypeptides encoded therefrom. More specifically, the invention relates to nucleic acids encoding membrane bound and secreted polypeptides, as well as vectors, host cells, antibodies, and recombinant methods for producing these nucleic acids and polypeptides.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention is based in part upon the discovery of novel nucleic acid sequences encoding polypeptides. Nucleic acids encoding these polypeptides and derivatives and fragments thereof, will hereinafter be collectively designated as "NOV."

In one aspect, the invention provides an isolated NOV1 nucleic acid molecule encoding a NOV1 polypeptide that has identity to the polypeptide sequence for the small actin-sequestering peptide thymosin-beta-10. In another aspect, the invention provides an isolated NOV2 nucleic acid molecule encoding a NOV2 polypeptide that has identity to ephrin type-A receptor 8. In yet another aspect, the invention provides an isolated NOV3 nucleic acid molecule encoding a NOV3 polypeptide that has homology to a family of proteoglycans.

In some embodiments, the NOV nucleic acid molecule can hybridize under stringent conditions to a nucleic acid sequence complementary to a nucleic acid molecule that includes a protein-coding sequence of the nucleic acid sequence. Also included in the invention is an oligonucleotide, e.g., an oligonucleotide which includes at least 6 contiguous nucleotides of a NOV nucleic acid (e.g., SEQ ID NO:1, 4, or 6) or a complement of said oligonucleotide.

Also included in the invention are substantially purified NOV polypeptides (SEQ ID NO:2, 5, or 7. The invention also features antibodies that immunoselectively-bind to NOV polypeptides.

In another aspect, the invention includes pharmaceutical compositions which include therapeutically- or prophylactically-effective amounts of a therapeutic and a pharmaceutically-acceptable carrier. The therapeutic can be, e.g., a NOV nucleic acid, a NOV polypeptide, or an antibody specific for a NOV polypeptide. In a further aspect, the invention includes, in one or more containers, a therapeutically- or prophylactically-effective amount of this pharmaceutical composition.

In a further aspect, the invention includes a method of producing a polypeptide by culturing a cell that includes a NOV nucleic acid, under conditions allowing for expression of the NOV polypeptide encoded by the DNA. If desired, the NOV polypeptide can then be recovered.

In another aspect, the invention includes a method of detecting the presence of a NOV polypeptide in a sample. In the method, a sample is contacted with a compound that selectively binds to the polypeptide under conditions allowing for formation of a complex between the polypeptide and the compound. The complex is detected, if present, thereby identifying the NOV polypeptide within the sample.

Also included in the invention is a method of detecting the presence of a NOV nucleic acid molecule in a sample by contacting the sample with a NOV nucleic acid probe or primer, and detecting whether the nucleic acid probe or primer bound to a NOV nucleic acid molecule in the sample.

In a further aspect, the invention provides a method for modulating the activity of a NOV polypeptide by contacting a cell sample that includes the NOV polypeptide with a compound that binds to the NOV polypeptide in an amount sufficient to modulate the activity of said polypeptide. The compound can be, e.g., a small molecule, such as a nucleic acid, peptide, polypeptide, peptidomimetic, carbohydrate, lipid or other organic (carbon containing) or inorganic molecule, as further described herein.

Also within the scope of the invention is the use of a therapeutic in the manufacture of a medicament for treating or preventing disorders or syndromes outlined in the preferred embodiment below. The therapeutic can be, e.g., a NOV nucleic acid, a NOV polypeptide, or a NOV-specific antibody, or biologically-active derivatives or fragments thereof.

In the preferred embodiments, the invention further includes methods for screening for a modulator of disorders or syndromes including, e.g., those involving development, differentiation, and activation of thymic immune cells; in pathologies related to spermatogenesis and male infertility; diagnosis of several human neoplasias; in diseases or pathologies of cells in blood circulation such as red blood cells and platelets; neurological, cardiac and vascular pathologies; rheumatoid arthritis; congenital muscular dystrophies; various muscle disorders; fixed deformities (arthrogryposis); small cell lung cancer NCI-H23; prostate cancer; and abnormal white matter. The method includes contacting a test compound with a NOV polypeptide and determining if the test compound binds to said NOV polypeptide. Binding of the test compound to the NOV polypeptide indicates the test

compound is a modulator of activity, or of latency or predisposition to the aforementioned disorders or syndromes.

Also within the scope of the invention is a method for screening for a modulator of activity, or of latency or predisposition to disorders or syndromes listed above by administering a test compound to a test animal at increased risk for the aforementioned disorders or syndromes. The test animal expresses a recombinant polypeptide encoded by a NOV nucleic acid. Expression or activity of NOV polypeptide is then measured in the test animal, as is expression or activity of the protein in a control animal which recombinantly-expresses NOV polypeptide and is not at increased risk for the disorder or syndrome. Next, the expression of NOV polypeptide in both the test animal and the control animal is compared. A change in the activity of NOV polypeptide in the test animal relative to the control animal indicates the test compound is a modulator of latency of the disorder or syndrome.

In yet another aspect, the invention includes a method for determining the presence of or predisposition to a disease associated with altered levels of a NOV polypeptide, a NOV nucleic acid, or both, in a subject (e.g., a human subject). The method includes measuring the amount of the NOV polypeptide in a test sample from the subject and comparing the amount of the polypeptide in the test sample to the amount of the NOV polypeptide present in a control sample. An alteration in the level of the NOV polypeptide in the test sample as compared to the control sample indicates the presence of or predisposition to a disease in the subject. Preferably, the predisposition including those listed in the preferred embodiment above.

In a further aspect, the invention includes a method of treating or preventing a pathological condition associated with a disorder in a mammal by administering to the subject a NOV polypeptide, a NOV nucleic acid, or a NOV -specific antibody to a subject (e.g., a human subject), in an amount sufficient to alleviate or prevent the pathological condition.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which the invention belongs. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the invention, suitable methods and materials are described below. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative purposes only, and not intended to be limiting in any manner. Other features and

advantages of the invention will be apparent from the following detailed description and claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1. Western blot of a NOV2 polypeptide secreted by 293 cells.

Figure 2. Western blot of a NOV3 polypeptide secreted by 293 cells.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides novel nucleotides and polypeptides encoded thereby. Included in the invention are the novel nucleic acid sequences and their polypeptides. The sequences are collectively referred to as "NOV nucleic acids" or "NOV polynucleotides" and the corresponding encoded polypeptides are referred to as "NOV polypeptides" or "NOV proteins." Unless indicated otherwise, "NOV" is meant to refer to any of the novel sequences disclosed herein. Table 11 provides a summary of the NOV nucleic acids and their encoded polypeptides.

NOV nucleic acids and their encoded polypeptides are useful in a variety of applications and contexts. The various NOV nucleic acids and polypeptides according to the invention are useful as novel members of the protein families according to the presence of domains and sequence relatedness to previously described proteins.

For example, NOV1 is homologous to members of the thymosin beta 10 family of proteins. As a result, NOV1 has various marker utilities as described herein. Also, NOV1 has efficacy in treatment of conditions involving development, differentiation, and activation of thymic immune cells; in pathologies related to spermatogenesis and male infertility; diagnosis of several human neoplasias; in diseases or pathologies of cells in blood circulation such as red blood cells and platelets; and detection of small cell lung cancer. NOV2 is homologous to members of the ephrin A receptor family. As a result, NOV2 has various marker utilities as described herein. NOV2 has efficacy in the treatment of conditions involving neurological, cardiac and vascular pathologies. NOV2 also has utility in the detection of prostate cancer. NOV3 is homologous to members of the proteoglycan family. As a result, NOV3 has various marker utilities as described herein. NOV3 also has efficacy in the treatment of conditions involving rheumatoid arthritis; congenital muscular dystrophies; various muscle disorders; fixed deformities (arthrogryposis); and abnormal white matter. Additional utilities for NOV nucleic acids and polypeptides according to the invention as also discussed herein.

NOV1

A NOV1 nucleic acid sequence according to the invention includes nucleic acids encoding a polypeptide related to the small actin-sequestering peptide thymosin-beta-10. An example of this nucleic acid and its encoded polypeptide is presented in Table 1. The disclosed nucleic acid (SEQ ID NO:1) is 430 nucleotides in length and contains an open reading frame (ORF) that begins with an ATG initiation codon at nucleotides 61-63 and ends with a TAG stop codon at nucleotides 235-237.

The representative ORF includes a 58 amino acid polypeptide (SEQ ID NO:2) and is flanked by putative upstream and downstream untranslated regions that are underlined in Table 1. The encoded polypeptide has a high degree of homology (approximately 85 percent identity) with thymosin beta 10 from human (Table 2). A search of the PROSITE database of protein families and domains confirmed that a NOV1 polypeptide is a member of the thymosin beta family, which is defined by polypeptides containing a stretch of 11 highly conserved amino acid residues

K-L-K-K-T-[E or N]-T-[Q or E]-E-K-N (SEQ ID NO:3)

located in the central part of the thymosin beta proteins (Table 2). The PROSITE database consists of biologically significant sites, patterns and profiles that help to reliably identify to which known protein family a new sequence belongs.

Furthermore, a search of the PFAM database reveals that a NOV1 polypeptide conforms to the sequence profile of thymosin beta family of proteins (Table 3). The query sequence in the table is a NOV1 polypeptide and the subject is a consensus sequence formed from the thymosin beta family of proteins. The presently disclosed NOV1 polypeptide has 84 percent identity across its entire length to the consensus thymosin beta sequence (Table 4). The NOV1 polypeptide bears more homology to the consensus thymosin beta sequence than do many other members of the family. Also, this degree of homology between a NOV1 polypeptide and the thymosin beta consensus (both in terms of length and complexity) is very unlikely to have occurred by change alone (Expect value in Table 3 less than 1 in $5 * 10^{10}$ by chance). Pfam is a large collection of multiple sequence alignments and profile hidden Markov models covering many common protein domain families. It is designed to be both an accurate and comprehensive method to determine homology. A multiple alignment of the thymosin-beta family is presented in Table 3. Based on its relatedness to the thymosin-beta-10 protein, the NOV1 protein is a novel member of the actin-sequestering protein family.

The thymosin-betas comprise a family of structurally related, highly conserved acidic polypeptides that sequester actin and regulate actin dynamics within cells. During embryogenesis the control of actin polymerization is essential in processes such as cell migration, angiogenesis and neurogenesis. Direct visualization and quantitation of actin filaments has shown that thymosin-betas, like agonists, induced actin depolymerization at the apical membrane where exocytosis occurs (Muallem S, Kwiatkowska K, Xu X, Yin HL, J Cell Biol 1995 Feb;128(4):589-98). Thymosin-beta-10 is widely distributed in mammalian tissues including the nervous system, and the presence of this transcript in different regions of the rat forebrain, including hippocampus, neocortex and several brain nuclei, provides evidence for the participation of thymosin-beta-10 in the control of the actin dynamics that takes place in neurons. Thymosin-beta-10 is expressed at relatively high levels in embryonic and developing tissues (Hall AK *Cell Mol Biol Res* 1995;41(3):167-80), and given that it is involved in the inhibition of actin polymerization, the thymosin-beta-10 protein-like proteins can play an important role in early development.

mRNA species of similar molecular weights encoding thymosin beta-10 are found in most tissues of the rat; however, Lin and Morrison-Bogorad (J Biol Chem. 1991 Dec 5;266(34):23347-53) identified an additional thymosin-beta-10 mRNA of higher molecular weight in the testis of sexually mature rats. The latter mRNA differs from the ubiquitous form only in its 5-prime untranslated region, beginning 14 nucleotides upstream of the translation initiation codon. This finding, together with primer extension experiments, suggested that the two mRNA types are transcribed from the same gene through a combination of differential promoter utilization and alternative splicing. Both mRNAs were present in pachytene spermatocytes; only the testis-specific mRNA was detected in postmeiotic haploid spermatids. Immunohistochemical analysis showed that the protein was present in differentiating spermatids, suggesting that the testis-specific thymosin-beta-10 mRNA is translated in haploid male germ cells. Immunoblot analysis using specific antibodies showed that the thymosin-beta-10 protein synthesized in adult testis was identical in size to that synthesized in brain.

Thymosin-beta-10-like proteins also influence several properties of lymphocytes including cyclic nucleotide levels, migration inhibitory factor production, T-dependent antibody production, as well as the expression of various cell surface maturation/differentiation markers (Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE Int J Immunopharmacol 2000 Apr;22(4):261-73). These and other observations suggest that thymosin beta-10 (a) plays a significant and possibly obligatory role in cellular processes controlling apoptosis possibly by acting as an actin-mediated tumor suppressor, (b) functions

as a neoapoptotic influence during embryogenesis, and (c) can mediate some of the pro-apoptotic anticancer actions of retinoids. Thymosin-beta-10 mRNA is also abundant in a variety of tumors and tumor cell lines.

Thymosin-beta-10 gene overexpression is a general event in human carcinogenesis. Analysis of thymosin-beta-10 mRNA levels in human colon carcinomas, germ cell tumors of different histological types, breast carcinomas, ovarian carcinomas, uterine carcinomas, colon and esophageal carcinoma cell lines all indicated thymosin-beta-10 was over expressed in all of the neoplastic tissues and cell lines compared to the respective normal tissues. Therefore, detection of thymosin-beta-10-like expression can be considered a potential tool for the diagnosis of several human neoplasias. (Santelli G, Califano D, Chiappetta G, Vento MT, Bartoli PC, Zullo F, Trapasso F, Viglietto G, Fusco A Am J Pathol 1999 Sep;155(3):799-804). Not only can thymosins like thymosin beta-10 be used for early detection and diagnosis of neoplasms, but also in recent clinical trials derivatives of thymic hormones, mostly of thymosins, have been used to help treat neoplasms (Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Int J Immunopharmacol. 2000 Apr;22(4):261-73). Thymic hormones strengthen the effects of immunomodulators in immunodeficiencies, autoimmune diseases, and neoplastic malignancies. Combined chemo-immunotherapeutical anti-cancer treatment seems to be more efficacious than chemotherapy alone, and the significant hematopoietic toxicity associated with most chemotherapeutical clinical trials can be reduced significantly by the addition of immunotherapy.

Based on its relatedness to the thymosin-beta-10 protein, the NOV1 protein is a novel member of the actin-sequestering protein family. The discovery of molecules related to thymosin-beta-10 satisfies a need in the art by providing new diagnostic or therapeutic compositions useful in the treatment of disorders associated with alterations in the expression of members of thymosin-beta-10- like proteins. Nucleic acids, polypeptides, antibodies, and other compositions of the present invention are useful in a variety of diseases and pathologies, including by way of nonlimiting example, those involving development, differentiation and activation of thymic immune cells, pathologies related to spermatogenesis and male infertility, diagnosis of several human neoplasias, and diseases or pathologies of cells in blood circulation such as red blood cells and platelets.

A NOV1 nucleic acid is useful for detecting specific cell-types. For example a variant splice form of a NOV1 nucleic acid according to the invention can be present in different levels in postmeiotic haploid spermatids. Also, according to the invention the expression of a NOV1 nucleic acid has utility in identifying developing and embryonic tissues from other

tissue types. Thymosin-beta-10 mRNA is overexpressed in a variety of tumors and tumor cell lines. Expression levels of thymosin-beta-10 like nucleic acids such as NOV1 are also useful in distinguishing T cell types given that expression of various cell surface/differentiation markers is influenced by thymosin-beta-10 like proteins such as a NOV1 polypeptide. A NOV1 nucleic acid has enhanced expression in certain cancer cell lines, especially non-small cell lung cancer NCI-H23, but not in cell lines from the corresponding normal tissue; therefore, NOV1 nucleic acids are useful as a cancer specific marker in such tissues (Example 1).

Given that thymosin-beta-10 related proteins can sequester actin and regulate actin dynamics within cells, proteins related to the NOV1 polypeptide are useful in screens for test compounds that can modulate actin polymerization or the formation or stability of actin-thymosin beta-10 complexes. Finally, since thymic hormones strengthen the effects of immunomodulators in immunodeficiencies, autoimmune diseases, and neoplastic malignancies, NOV1 related proteins can be used in combined chemo-immunotherapeutical anti-cancer treatments.

Table 1.
A representative cDNA sequence encoding the thymosin-beta-10-like protein according to the invention

Putative untranslated regions are underlined. The start and stop codons are in bold type.

GCCAGCAGGAGTGCCATGGTGAAGGCACTGGCAGGGAATGCTAGGATTGTTTTAACAAAATGGCAGACAAACCAGACATAGGG
GAAATCGCCAGCTTCAATAAGGCCAAGCTGAAGAAAACAGAGACTGCAGGAGAACACCCTGCTGACCAAACAGCCCATTGAGCAG
GAGAACCGGCTGAAATTTCCTAAGAGCCTGGAGGATTCCCTACCGTGTCATCTTCGAGACCCCAGTAGTAATGTGGAGGAAGA
ATCACCACAAGATGGACACAACCCACAAACTGTGACGTGAACCTGGGCACTCCGTGCTGATGCCACCAGCCTGAGGGTCCCTAT
GGGTCCAATCAGACTGCCAAATTCTCTGGTTTGCCCTGGGATATTATAGAAAATTATTTGCGTGAATAATGAAAACACAGCTCA
TGGCAAAAAA (SEQ ID NO:1)

A representative amino acid sequence of the thymosin-beta-10-like protein according to the invention

MADKPDTGEIASFNKAKLKKTETQENTLLTKEAIEQEKRVKFFKSLEDSLPLSSSRPQ (SEQ ID NO:2)

Table 2.
Comparison between a NOV1 polypeptide and thymosin beta-10 from human

```
>gb|AAA36746.1| (M92383) thymosin beta-10 [Homo sapiens]
          Length = 43

 Score = 84.5 bits (192), Expect = 3e-16
 Identities = 34/40 (85%), Positives = 36/40 (90%), Gaps = 1/40 (2%)

NOV1 : 1  MADKPDTGEIASFNKAKLKKTETQE-NTLLTKEAIEQEKR 39
          !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!  !! !!! !.! !! !!!
```

```
Sbjct: 6  MADKPDMGEIASFDKAKLKKTETQEKNTLPTKETIEQEKR 45
```

Table 3.
Multiple Sequence alignment of a NOV1 polypeptide and the thymosin beta family

(Black outlined amino acids indicate potential regions of conserved sequence; grayed amino acids represent amino acids conservatively substituted; and non-highlighted amino acids indicate positions in which mutations to a broad range of alternative amino acid residues occurs. Sequences may be referenced by the SWISSPROT or TREMBL ID.)

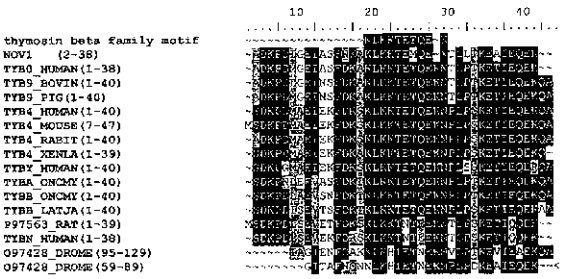


Table 4.
PFAM alignment of a NOV1 polypeptide to the consensus sequence of the thymosin beta family

```
>PF00516 (Closest domain: TYB0_HUMAN 1-38)
Number of sequences in family: 16
Most frequent protein names:   TYB4(4) TYB9(2) TYBB(2)
Commentary (automatic):
          THYMOSIN ACETYLATION T-CELL DIFFERENTIATION
          IMMUNOPOTENTIATION THYMUS BETA-4 ACTIN-BINDING PROTEIN
          BETA
          Length = 38
  Score = 145  (60.9 bits), Expect = 5e-10
 Identities = 32/38 (84%), Positives = 34/38 (89%), Gaps = 1/38 (2%)

NOV1:      2 ADKPDIGEIASFNKAKLKKTEMQE-NTLLTKEAIEQEK 38
             +++++++++++++++++++++ ++ ++ +++ +++++
Sbjct:     1 ADKPDMGKIASFDKAKLKKTETQEKNTLPTKETIEQEK 38
```

NOV2

A NOV2 nucleic acid according to the invention includes nucleic acids encoding a polypeptide related to ephrin type-A receptors. An example of nucleic acid and its encoded polypeptide is presented in Table 5. The disclosed nucleic acid (SEQ ID NO:4) is 3018 nucleotides in length and contains an open reading frame that begins with an ATG initiation codon at nucleotide 1-3 and ends at nucleotides 2974-2976.

The representative ORF includes a 992 amino acid polypeptide (SEQ ID NO:5). The encoded polypeptide has a high degree of homology (approximately 95 percent identity) with mouse ephrin type-A receptor 8 precursor (Table 6) (SWISSPROT ACC: O09127, 956 out of 1005 residues). The NOV2 polypeptide also has an even higher degree of homology (100 percent identity) to a human eph- and elk-related kinase known as ephrin receptor EphA8 (Table 6A, partial sequence disclosed in Chan et al. (1991) Oncogene 6 1057-1061; the full length human ephrin receptor EphA8 full length sequence was deposited in Genbank September 14, 2000 as accession number NP_065387.1.) A multiple alignment with similar proteins showed comparable degrees of similarity to ephrin receptors from mouse (EPA8_mouse), human (EPA5_human), and chicken (EPA5_chick) (Table 7). In the predicted extracellular domain, a cysteine-rich region and tandem fibronectin type III repeats are present while a catalytic domain is present in the intracellular domain. These features are consistent with other members of the Eph family. Based on its relatedness, the NOV2 protein is a member of the ephrin type-A receptor tyrosine-protein kinase family.

The Eph receptors constitute the largest known family of receptor protein tyrosine kinases. They have been implicated in mediating developmental events, particularly in the nervous system. Receptors in the Eph subfamily typically have a single kinase domain and an extracellular region containing a Cys-rich domain and two fibronectin type III repeats. These receptors play important roles along with their ligands, called ephrins, in neural development, angiogenesis, and vascular network assembly. (Choi S, Jeong J, Kim T, Park S., Mol. Cells 9(4):440-45 (1999)).

The ephrin type-A receptor 8 (EC 2.7.1.112) (tyrosine-protein kinase receptor eck) (eph-and elk-related kinase) (fragment) is designated as the gene product of the gene: *epha8 or eek*. It is a Type I membrane bound receptor, and its function is to serve as a receptor for members of the ephrin-a family. Its catalytic activity is as a protein tyrosine kinase, phosphorylating tyrosine in appropriate target proteins. It is similar to other protein-tyrosine kinases in the catalytic domain and belongs to the ephrin receptor family.

Eph receptors have tyrosine-kinase activity, and, together with their ephrin ligands, mediate contact-dependent cell interactions that are implicated in the repulsion mechanisms that guide migrating cells and neuronal growth cones to specific destinations. Since Eph receptors and ephrins have complementary expression in many tissues during embryogenesis, bidirectional activation of Eph receptors may occur at interfaces of their expression domains, for example, at segment boundaries in the vertebrate hindbrain. Indeed, Eph receptors play key roles in development of the nervous system and angiogenesis. In the nervous system, they

provide positional information by empolying mechanisms that involve repulsion of migrating cells and growing axons (Frisen et al EMBO J. 18(19) .5159-5165). Also, an important function of Eph receptors and ephrins is to mediate cell-contact-dependent repulsion.

A NOV2 sequence according to the invention is useful for detecting cells that express GPI-anchored ephrin-A ligands. For example, cells expressing either a NOV2 nucleic acid or a NOV2 protein have utility in screening for other cells that express GPI-anchored ephrin-A ligands or mimics therefore. As a result, a NOV2 sequence is useful for screening for new ephrin-A ligands expressed on cells. NOV2 is highly expressed in many surgical tumor samples, especially prostate cancer, but minimally or not detectably in the immediate normal adjacent tissue; therefore, the NOV2 expression can be used as a marker for certain cancers, especially prostate cancer (Example 1).

Also, a NOV2 sequence according to the invention is useful to direct the development of the nervous system and angiogenesis by modulating the boundaries between arteries and veins. For example, mice expressing defective Eph receptors similar to a NOV2 sequence have been shown to be defective in angiogensis and die in mid-gestation (Wang et al. 1998 Cell 93 741-753). The protein of the present invention will be useful in a variety of diseases and pathologies, including by way of nonlimiting example, those involving neurological, cardiac and vascular pathologies.

Table 5.
A representative DNA sequence encoding the ephrin type-A receptor 8-like protein of the invention

ATGGCCCCGGCCGGGGGCCGCCTGCCCCCTGCGCTCTCGGTCGTCAGGGCCGCGGCGGCGGCGGCCACCT
GCGTGTCCGCGCGCCCGGCGAAGTGAATTCGCTGCACACGTCCACCATCCACGGGGACTGGGGCTGGCT
CACCTATCCGACTCATGGGTGGGACTCCATCAACGAGCTGGACGAGTCCTTCGAGCCCATCCACACGVAC
CAGGTTTGCAACGTCATGAGCCCCAACCAGAACAACTGGCTGCGCACHAGCTGGGTCCCCCAGACGGCG
CCCGGCGCCTCTACGCTGAGATCAAGTTTACCCTCCGCGACTGCAACAGCATCCCTGGTGTGCTGGGCAC
CTGCAAGGAGACCTTCAACCTCTACTACCTCGAGTCCGACCGCGACCTGCCGGCAGCAGCACAVAGAAAGC
CAGTTCCTCAAAATCGACACCATTGCGGCCGACGAGAGCTTCACAGGTGCCGACCTTGGTGTGCGGCGTC
TCAAGCTCAACAGGAGTGGCGCAGTGTGGGTCCCTCAGCAAGCGCGGCTTCTACCTGGCCCTCCAGGA
CATAGGTGCTTGCCTGGCCATCCTCTCTCTCGCGATCTACTATAAGAAGTGCCCTGCCATGGTCGCAAT
CTGCCTGCCTTCTCGGAGGCAGTGACGGGGGGCGACTCGTCGTCACTGGTGGAGGTGAGGGCCAGTGCG
TGCGGCATTCAAGGAGCGGGACACACCCAAGATGTACTGCAGCGCGGAGGGCGAGTGGCTCGTCCCCAT
CGGCAAATGCGTGTGCAGTGCCGGCTACGACGAGCGGCGGATGCCTCTGTGGCCTGTGAGCTGGGCTTC
TACAAGTCAGCCCCTGGGGACCAGCTGTGTGCCCCCTGCCCTCCCCACAGCCACTCCGCAGCTCGAGCCG
CCCAAGCCTGCCACTGTGACCTCAGCTACTACGTGCAGDCCTGGAGCGCGCGTCCTCAGCTGCACGCG
GCCACCCTCGGCACCAGTGAACCTGATCTCCAGTCTGAATGCGACATCAGTGACTCTGGAGTGGGCCCCT
CCCCTGGACCCAGGTGGCCGCAGTGACATCACCTACAATGCGGTGTGCCCCGCTGCCCCTGGGCACTGA
GCCGCTGCGAGGCATGTGGGAGCCGCACCCGCTTTGTGCCCCAGCAGACAAGCCTGGTGCAGGCGAGXCT
CCTGCTGCCCAACCTCCTGGCCCACATGAACTACTCCTTCTGGATCGAGGCCGTCAATGGCGTGTCCGAC
CTGAGCCCGAGCCCCGCCGGCGCCCCTGTGATCAAGATGACGACGAAGCACGCAGCCCCGTCCGAGGTGG
TGGTGATCCGTCAAGAGCCGCCCCAGCCAGCCAGCGTCTGCTGTGGAGGAGCGGAGCGAGCGAA
CGGCATCATCCTGGAGTATGAGATCAAGTACTACGAGAAGGAGAAGGAGATGCAGAGCTACTCCACCCTC
AAGGCGTCACGACCAGAGCCACGTCTCCGGCCTCAAGCCGGGCACCCGCTACGTGTTCCAGGTCCGAG
CCGGCACCTCACCAGCGTGTGGCCGCTTCAGCCAGGCCATGAGGTGGAGACCGGGAAACCCCGGGCCCG
CTATGACACCAGGACCATTGTCTGGATCTGCCTGACGCTCATCACGGGCCTGGTGGTGCTTCTGCTCCTG
CTCATCTGCAAGAAGAGGCACTGTGGCTACAGCAAGGCCTTCCAGGACTCGGACGAGGAGAAGATGCACT

ATCAGAATGGACAGGCACCCCCACCTGTCTTCCTGCCTCTGCATCACCCCCGGCAAAGCTCCCAGAGCC
CCAGTTCTATGCGGAACCCCACACCTACGAGGAGCCAGGCCGGGCGGGCCGCAGTTTCACTCGGGAGATC
GAGCCCTCTAGGATCCACATCGAGAAAATCATCGGCTCTGGAGACTCDGGGAAGTCTGCTACGGAGGC
TGCGGGTGCCAGGCAGCGGGATGTGCCCGTGGCCATCAAGCCCTCAAAGCCGGCTACACGGAGAGACA
GACGCGGGACTTCCTCAGCGAGGCGTCCATCATCGGCAATTCGACCATCCCAACATCATCCGCCTCGAG
GSTGTCGTCACCCSTGCCCGCCTGGCAATGATTGTGACTGAGTACATGGAGAACGGCTCTCTGGACACCT
TCGTGAGSACCACGACGGGCAGTTCACCATCATGCAGCTGG'GGGCATGCTGAGAGGAGTCGCGTGCCGG
CATGGGCTACCTCTCAGACCTGGGCTATGTCCACCGAGACCTGCCCGCCCGCAACGTCCTGGTTGACAGC
AACCTGGTCTGCAAGGTGTCTGACTTCGGCCTCTCACGGGTGCTGGAGGACGACCCGGATGCTGCCTACA
CCACCACGGGCGGGAAGATCCCCATCCGCTGGACGGCCCCAGAGGCCATCGCCTTCCGCACCTTCTCCTC
GGCAGCGAGTGTGGAGCTTCGGCGTGGTCATGTGGGAGGTGCTGGCCTATGGGCAGCGGCCCTACTGG
AACATGACCAACCGGGATGTGATCAGCTCTGTCGAGGAGGGGTACCGCCTCCCCCGCACCCATGGCCTGCC
CCCACGCCCTGCACCAGCTCATGCTCGACTGTTGGCACAAGGACCGGGCGCAGCGGCCTCGCTTCTCCCA
GATTGTCAGTGTCTCGATGCGTTCATCCGCAGCCCTGAGAGTCTCAGGGCCACCGCCACAGTCAGCAGG
TGCCACCCGTGGCTTCGTCCGGAGCTGCTTGACCTCCGAGGGGGCAGCGGTGCCGGTGGGGCCTCA
CGGTGGGGGACTGGCTGGACTCCATCCGCATGGGCCGGTACCGAGACCACTTCGCTGCGGGCGGATACTC
CTCTCTGGGCATGGTGCTACCCATGAACGCCCAGCACGTGCGCGCCCTGGGCATCACCCTCATGGGCCAC
CAGAAGAAGATCCTGGGCAGCATTCAGACCATGCGGGCCCAGCTGACCAGCACCCAGGGGCCCCGCCGGC
ACCTCTGA (SEQ ID NO:4)

A representative amino acid sequence of the ephrin type-A receptor 8-like protein of the invention.

MAPARGRLPPALWVVTAAAAATCVSAARGEVNLLDTSTIHGDWGWLTYPARGWDSINEVDESFQPIHTYQVCNVMSPNQNNWL
RTSWVPRDGARRVYAEIKFTLRDCNSMPGVLGTCKETFNLYYLESDRDLGAQTGESFTGADLGVRRLKLNT
EVRSVGPLSKRGFYLAFQDIGACIALLSLRIYYKKCPAMVRNLAAFSEAVTGADSSSLVEVRGQCVRHSEER
KLVPIGKCVCSAGYEERRDACVACELGHYKSAPGDQACARCPPHSHSAAPAAQACTCDLSYYRAALDPPSSACTRPPSAPVNLI
SSVNGTSVTLEWAPPLDGGGPSDITYNAVCRACPWALSRCEACGSGTRFVPQQTSLVQASLLVANLLAHMNYSFWIEAVNGVSD
LSPEPRRAAVVNITTHQAAPSQVVVIRQERAGQTSVSLLWQEPSQPNGIILEYEIKYYEKDKFMQSYSTLKAVTTRATVSGLKP
GTRYVFQVRARTSAGCGRFSQAMEVETGKPRPYDCRIVMICLTLITGMVVLLLLICKKRHCGYSKAFQDSDEEKMHYQNGQ
APPPVPLPLHHPPGKLPEPQFYAEPHTYEEPGRAGHSFTREIEASRIHIEKIIGSGDSGEVCYGRLRVPGQRDVPVAIKALKAG
YTERQRRDFLSEASIMGQFDHPNIIRLEGVVTRGRLAMIVTEYMENGSLDTFLRTHDGQFTIMQLVGMLRGVGAGMRYLSDLGY
VHRDLAARNVLVDSNLVCKVSDFGLSRVLEDDPDAAYTTTGGKIPIRWTAPEAIAFRTFSSASDVWSFGVVMWEVLAYGERPYW
NMTNRDVISSVEEGYRLPAPMGCPHALHQLMLDCWHKDRAQRRPRFSQIVSVLDALIRSPESLRATATVSRCPPPAEVRSCPDLR
GGSGGGGGLTVGDWLDSIRMGRYRDHFAAGGYSSIGMVLRMNAQDVRALGITLMGHQKKILGSIQTMR (SEQ ID NO:5)

Table 6.
Comparison between a NOV2 polypeptide and mouse ephrin type-A receptor 8 precursor

```
>re|NP_03:965.1| Eph receptor A8
 sp|O09127|EPA8_MOUSE EPHRIN TYPE-A RECEPTOR 8 PRECURSOR (TYROSINE-PROTEIN KINASE
          RECEPTOR ERK) (EPH AND ELK-RELATED KINASE)
 gb|AAB39218.1| (U72207) Eph-and Elk-related kinase (Mus musculus)
          Length = 1004

 Score = 3036 bits (7728), Expect = 0.0
 Identities = 945/992 (95%), Positives = 964/992 (96%), Gaps = 1/992 (0%)

NOV2:  1   MAPARGRLPPALWVVTAAAAATCVSAARGEVNLLDTSTIHGDWGWLTYPARGWDSINEV 60
           |||||| || |.|||||.|||| |||||.|||||||||||||||||||||||.|||||||||
Sbjct: 1   MAPARRLSPALWVVTAAAAA-TCVSAGRGEVNLLDTSTIHGDWGWLTYPARGWDSINEV 59

NOV2:  61  DESFQPIHTYQVCNVMSPNQNNWLRTSWVPRDGARRVYAEIKFTLRDCNSMPGVLGTCKE 120
           |||||+||||||' |||'|||||||||+|||||||||||||||||||||| |+|||.|||||
Sbjct: 60  DESFRPIHTYQVCKVMGPNQNNWLSTNWVPRDGARRVYAEIKFTLRDCNSIPGVLGTCKE 119

NOV2:  121 TFNLYYLESDRDLGAQTGESFTGADLGVRRLKLNTEVRSVGPLSKRG 180
           || |+ |||| |||| |||||:|||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct: 120 TFNLKYLESDRDLGASTGKSFTGADLGVRRLKLNTEVRGVGPLSKRG 179

NOV2:  181 FYLAFQDIGACIALLSLRIYYKKCPAMVRNLAAFSEAVTGADSSSLVEVRGQCVRHSEER 240
           |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 180 FYLAFQDIGACIALSLRIYYKKCPAMVRNLAAFSEAVTGADSSSLVEVRGQCVRHSEER 239
```

```
NOV2:  241 DTPKMYCSAEGEWLVPIGKCVCSAGYEERRDACVACSLGFYKSAPGDQLCARCPPHSHSA 300
           |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 240 DTPKMYCSAEGEWLVPIGKCVCSAGYEERRDACMACELGFYKSAPGDQLCARCPPHSHSA 299

NOV2:  301 APAAQACHCDLSYYRAALDPPSSACTRPPSAPVNLISSVNGTSVTLEWAPPLDPGGRSDI 360
           |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 300 TPAAQTCRCDLSYYRAALDPPSAACTRPPSAPVNLISSVNGTSVTLEWAPPLDPGGRSDI 359

NOV2:  361 TYNAVCRRCPWALSRCEACGSGTRFVPQQTSLVQASLLVANLLAHMNYSFWIEAVNGVSD 420
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 360 TYNAVCRRCPWALSHCEACGSGTRFVPQQTSLAQASLLVANLLAHMNYSFWIEAVNGVSN 419

NOV2:  421 LSPEPRRAAVVNITTNQAAPSQVVVIRQERAGQTSVSLLWQEPEQPNGIILEYEIKYYEK 480
           |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 420 LSPEPRSAAVVKITTNQAAPSQVVVIRQERAGQTSVSLLWGEPEQPNGIILEYEIKYYEK 479

NOV2:  481 DKEMQSYSTLKAVTIRATVSGLKPGTRYVFQVRARTSAGCGRFSQAMEVETGKPREPRYDT 540
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 480 DKEMQSYSTLKAVTIRATVSGLKPGTRYVFQVRARTSAGCGRFSQAMEVETGKPREPRYDT 539

NOV2:  541 RTIVWICLTLITGLVVLLLLICKKRHCGYSKAFQDSDEKMHYQNGQAPPPVFLPLHRP 600
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 540 RTIVWICLTLITGLVVLLLLICKKRHCGYSKAFQDSDEKMHYQNGQAPPPVFLPLNRP 599

NOV2:  601 PGKLPEPQFYAEPHTYEEPGRAGRGFTREIEASRIHIEKIIGSGDSGEVCYGRLRVPGQR 660
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 600 PGKFPKTQFSAEPHTYEEPGRAGRGFTREIEASRIHIEKIIGSGESGEVCYGRLQVPGQR 659

NOV2:  661 DVPVAIKALKAGYTERQRRDFLSEASIMGQFDHPNIIRLEGVVTRGRLAMIVTEYMENGS 720
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 660 DVPVAIKALKAGYTERQRQDFLSEAAIMGQFDHPNIIRLEGVVTRGRLAMIVTEYMENGS 719

NOV2:  721 LDTFLRTHDGQFTIMQLVGMLRGVGAGMRYLSDLGYVHRDLAARNVLVDSNLVCKVSDFG 780
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 720 LDAFLRTHDGQFTIVQLVGMLRGVGAGMRYLSDLGYIHRDLAARNVLVDCRLVCKVSDFG 779

NOV2:  781 LSRVLEDDPDAAYTTTGGKIPIRWTAPEAIAFRTFSSASDVWSFGVVMWEVLAYGERPYW 840
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 780 LSRALEDDPEAAYTTAGGKIPIRWTAPEAIAFRTFSSASDVWSFGVVMWEVLAYGERPYW 839

NOV2:  841 NMTNRDVISSVEEGYRLPAPMGCPHALHQLMLDCWHKDRAQRPRFSQIVSVLDALIRSPE 900
           |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 840 NMTNQDVISSVEEGYRLPAPMGCPKALHQLMLDCWHKDRAQRPRFAHVVSVLDALVHSPE 899

NOV2:  901 SLRATATVSRCPPPAEVRSCFDLRGGSGCGGGLTVGDWLDSIRMGRYKDHFAAGGYSSLG 960
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 900 SLRATATVSRCPPPAFARSCFDLRAGSGGMGDLTVGDWLDSIRMGRYKDHFAAGGYSSLG 959

NOV2:  961 MVLRMNAQDVRALGITLMGHQKKILGSIQTMR 992
           ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 960 MVLRMNAQDVRALGITLMGHQKKILGSIQTMR 991
```

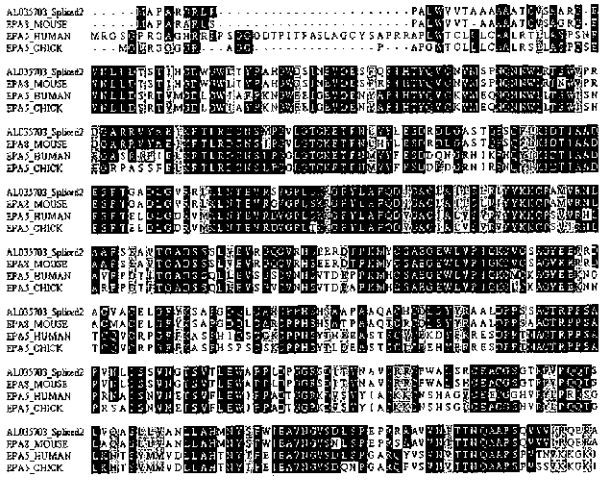
Table 6A.
Comparison between a NOV2 polypeptide and human ephrin receptor EphA8

```
>ref|NP_065387.1| EphA8; Ephrin receptor EphA8 (eph- and elk-related kinase); Hek3;
          eph-, elk-related tyrosine kinase; ephrin receptor EphA8
 emb|CAB81612.1| (AL035703) dJ61A9.1 (tyrosine kinase ) [Homo sapiens]
          Length = 1005

 Score = 2054 bits (5262), Expect = 0.0
 Identities = 992/992 (100%), Positives = 992/992 (100%)

NOV2 : 1   MAPARGRLPPALWVVTAAAAAATCVSAARGEVNLLDTSTIHGDWGWLTYPAHGWDSINEV 60
           ||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1   MAPARGRLPPALWVVTAAAAAATCVSAARGEVNLLDTSTIHGDWGWLTYPAHGWDSINEV 60
```

```
NOV2 :  61  DESFQPIHTYQVCNVMSPNQNNWLRTSWVPRDGARRVYAEIKFTLRDCNSMPGVLGTCKE 120
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:  61  DESFQPIHTYQVCNVMSPNQNNWLRTSWVPRDGARRVYAEIKFTLRDCNSMPGVLGTCKE 120

NOV2 : 121  TFNLYYLESDRDLGASTQESQFLKIDTIAADESFTGADLGVRRLKLNTEVRSVGPLSKRG 180
            TFNLYYLESDRDLGASTQESQFLKIDTIAADESFTGADLGVRRLKLNTEVRSVGPLSKRG
Sbjct: 121  TFNLYYLESDRDLGASTQESQFLKIDTIAADESFTGADLGVRRLKLNTEVRSVGPLSKRG 180

NOV2 : 181  FYLAFQDIGACLALLSLRIYYKKCPAMVRNLAAFSEAVTGADSSSLVEVRGQCVRHSEER 240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 181  FYLAFQDIGACLALLSLRIYYKKCPAMVRNLAAFSEAVTGADSSSLVEVRGQCVRHSEER 240

NOV2 : 241  DTPKMYCSAEGEWLVPIGKCVCSAGYEERRDACVACELGFYKSAPGDQLCARCPPHSHSA 300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 241  DTPKMYCSAEGEWLVPIGKCVCSAGYEERRDACVACELGFYKSAPGDQLCARCPPHSHSA 300

NOV2 : 301  APAAQACHCDLSYYRAALDPPSSACTRPPSAPVNLISSVNGTSVTLEWAPPLDPGGRSDI 360
            APAAQACHCDLSYYRAALDPPSSACTRPPSAPVNLISSVNGTSVTLEWAPPLDPGGRSDI
Sbjct: 301  APAAQACHCDLSYYRAALDPPSSACTRPPSAPVNLISSVNGTSVTLEWAPPLDPGGRSDI 360

NOV2 : 361  TYNAVCRRCPWALSRCEACGSGTRFVPQQTSLVQASLLVANLLAHMNYSFWIEAVNGVSD 420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 361  TYNAVCRRCPWALSRCEACGSGTRFVPQQTSLVQASLLVANLLAHMNYSFWIEAVNGVSD 420

NOV2 : 421  LSPEPRRAAVVNITTNQAAPSQVVVIRQERAGQTSVSLLWQEPEQPNGIILEYEIKYYEK 480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 421  LSPEPRRAAVVNITTNQAAPSQVVVIRQERAGQTSVSLLWQEPEQPNGIILEYEIKYYEK 480

NOV2 : 481  DKEMQSYSTLKAVTIRATVSGLKPGTRYVFQVRARTSAGCGRFSQAMEVSTGKPRPRYST 540
            DKEMQSYSTLKAVTIRATVSGLKPGTRYVFQVRARTSAGCGRFSQAMEVSTGKPRPRYST
Sbjct: 481  DKEMQSYSTLKAVTIRATVSGLKPGTRYVFQVRARTSAGCGRFSQAMEVSTGKPRPRYST 540

NOV2 : 541  RTIVWICLTLITGLVVLLLLICKKRHCGYSKAFQQSDEEKMHYQNGQAPPPVFLPLHHP 600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 541  RTIVWICLTLITGLVVLLLLICKKRHCGYSKAFQQSDEEKMHYQNGQAPPPVFLPLHHP 600

NOV2 : 601  PGKLPEPQFYAEPHTYEEPGRAGRSFTREIEASRIHIEKIIGSGDSGEVCYGRLRVPGQR 660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 601  PGKLPEPQFYAEPHTYEEPGRAGRSFTREIEASRIHIEKIIGSGDSGEVCYGRLRVPGQR 660

NOV2 : 661  DVPVAIKALKAGYTERQRRDFLSEASIMGQFDHPNIIRLEGVVTRGRLAMIVTEYMENGS 720
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 661  DVPVAIKALKAGYTERQRRDFLSEASIMGQFDHPNIIRLEGVVTRGRLAMIVTEYMENGS 720

NOV2 : 721  LDTFLRTHDGQFTIMQLVGMLRGVGAGMRYLSDLGYVHRDLAARNVLVDSNLVCKVSDFG 780
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 721  LDTFLRTHDGQFTIMQLVGMLRGVGAGMRYLSDLGYVHRDLAARNVLVDSNLVCKVSDFG 780

NOV2 : 781  LSRVLEDDPDAAYTTTGGKIPIRWTAPEAIAFRTFSSASDVWSFGVVMWEVLAYGERPYW 840
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 781  LSRVLEDDPDAAYTTTGGKIPIRWTAPEAIAFRTFSSASDVWSFGVVMWEVLAYGERPYW 840

NOV2 : 841  NMTNRDVISSVEEGYRLPAPMGCPHALHQLMLDCWHKDRAQRPRFSQIVSVLDALIRSPE 900
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 841  NMTNRDVISSVEEGYRLPAPMGCPHALHQLMLDCWHKDRAQRPRFSQIVSVLDALIRSPE 900

NOV2 : 901  SLRATATVSRCPPPAFVRSCFDLRGGGGGGGGLTVGDWLDSIPMGRYRDHFAAGGYSSLG 960
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 901  SLRATATVSRCPPPAFVRSCFDLRGGSGGGGGLTVGDWLDSIRMCRYRDHFAAGGYSSLG 960

NOV2 : 961  MVLRMNAQDVRALGITLMGHQKKILGSIQTMR 992
            ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 961  MVLRMNAQDVRALGITLMGHQKKILGSIQTMR 992
```

Table 7.
Multiple alignment of the NOV2 ephrin type-A receptor 8-like protein of the invention, shown as AL035703 Spliced2, with similar proteins

(Black outlined amino acids indicate potential regions of conserved sequence; greyed amino acids represent amino acids conservatively substituted; and non-highlighted amino acids indicate positions in which mutations to a broad range of alternative amino acid residues occurs)



NOV3

A NOV3 nucleic acid sequence according to the invention includes nucleic acids encoding a polypeptide related to proteoglycans such as fibromodulin and fibronectin. An example of this nucleic acid and its encoded polypeptide is presented in Table 8. The disclosed nucleic acid sequence (SEQ ID NO:6) is 2025 nucleotides in length and contains an open reading frame that begins with an ATG initiation codon at nucleotides 1-3 and ends with a TGA stop codon at nucleotides 2023-2025.

The representative ORF includes a 674 amino acid polypeptide (SEQ ID NO:7). The encoded polypeptide has a high degree of homology to several leucine-rich repeat members of the proteoglycan family found in the extracellular matrix including fibronectin (Table 9 human

fibronectin like proteins, 99 percent to AAF28459.1 (Lacy et al (1999) Genomics 62 417-426)) and fibromodulin (Table 10, various fibromodulin or fibromodulin-like proteins).

The extracellular matrix (ECM) is composed of collagens, proteoglycans, and noncollagenous glycoproteins that provide cells and tissues with a mechanical scaffold for adhesion, migration, and signal transduction (Aumailley and Gayraud (1998) J. Mol. Med. 76(3-4) 253-265). These varied and complex functions depend on interactions between ECM components and cellular receptors such as proteoglycans that are located on the cell surface. Fibronectins and fibromodulins are both proteoglycans that comprise the extracellular matrix. Disruption of the cell-matrix interactions due to mutations in the genes of the matrix proteins can result in functional failures in all tissues (Bruckner-Tuderman and Bruckner (1998) J. Mol. Med. 76(3-4) 226-237). Included in these disorders are the congenital muscular dystrophies, various muscle disorders, fixed deformities (arthrogryposis), and abnormal white matter by cranial MRI.

Fibronectins are glycoproteins with 2 chains each linked by disulphide bonds that occur in insoluble fibrillar form in the extracellular matrix of animal tissues and soluble in plasma, the latter previously known as cold insoluble globulin. The various slightly different forms of fibronectin appear to be generated by tissue specific differential splicing of fibronectin mRNA, transcribed from a single gene. Fibronectins have multiple domains that confer the ability to interact with many extracellular substances such as collagen, fibrin and heparin and also with specific membrane receptors on responsive cells. Notable is the RGD domain recognized by integrins and two repeats of the EGF like domain. Interaction of a cell's fibronectin receptors (members of the integrin family) with fibronectin adsorbed to a surface results in adhesion and spreading of the cell.

Fibromodulin is collagen-binding protein component of the proteoglycan found in the extracellular matrix. It is mainly expressed in articular cartilage, tendon, and ligament, and is a member of a group of proteins having leucine-rich repeat (LRR) domains; fibromodulin includes as many as ten such motifs. Other components of this family include decorin, biglycan, and lumican. Proteins of this family bind to other matrix macromolecules and thereby help to stabilize the matrix. These proteins may also influence the function of the chondrocytes and bind growth factors.

The core proteins of these proteoglycans are structurally related, consisting of a central region composed of leucine-rich repeats flanked by disulfide-bonded terminal domains. Fibromodulin's central region possesses up to 4 keratan sulfate chains within its leucine-rich domain. Fibromodulin exhibits a wide tissue distribution, with the highest abundance

observed in articular cartilage, tendon, and ligament. It has been suggested that fibromodulin participates in the assembly of the extracellular matrix by virtue of its ability to interact with type I and type II collagen fibrils and to inhibit fibrillogenesis in vitro. The 3-prime untranslated region of the fibromodulin cDNA has previously been cloned and used to map the gene by fluorescence in situ hybridization to 1q32. (Sztrolovics et al., Genomics 23: 715-717 (1994)). In that study, secondary signals were detected at 9q34.1; however, PCR analysis of somatic cell hybrids confirmed the localization to chromosome 1.

Small proteoglycans, including decorin, biglycan, and fibromodulin, bind to other matrix macromolecules and thereby help to stabilize the matrix. They may also influence the function of the chondrocytes and bind growth factors.

In a bovine nasal-cartilage culture system, it was found that interleukin-1 stimulated cartilage catabolism included the effect that the small leucine-rich repeat proteoglycans decorin, biglycan and lumican showed a resistance to both proteolytic cleavage and release throughout the culture period. In contrast, fibromodulin exhibited a marked decrease in size after day 4, presumably due to proteolytic modification (Sztrolovics R, et al., Biochem J, 339 (Pt 3):571-577, 1999).

The nucleic acids and proteins of the invention are useful in potential therapeutic applications implicated in various orthopedic disorders and/or injuries. They are potentially of use in aiding repair of damage to cartilage and ligaments, and in therapeutic applications to joint repair. Additionally they may be used in treatment of inflammatory diseases of connective tissue, including by way of nonlimiting example, rheumatoid arthritis, congenital muscular dystrophies, various muscle disorders, fixed deformities (arthrogryposis), and abnormal white matter. For example, a cDNA encoding the proteoglycan-like protein may be useful in gene therapy, and the proteoglycan -like protein may be useful when administered to a subject in need thereof. The novel nucleic acid encoding proteoglycan -like protein, and the proteoglycan -like protein of the invention, or fragments thereof, may further be useful in diagnostic applications, wherein the presence or amount of the nucleic acid or the protein are to be assessed. For example in identifying tissue from kidney or brain. These materials are further useful in the generation of antibodies that bind immunospecifically to the novel substances of the invention for use in therapeutic or diagnostic methods.

Table 8
A representative DNA sequence of the proteoglycan-like protein of the invention

ATGGTGGTGGCACACCCACCGCCATTGCCACCACCACGCCCACTGCCACTGTCACGGCCACCGTTGTGA
TCACCACGGCCACCATGGACTTGCCGGACTGGCTGTTCCTCTGCTACGGGCTCATCGCCTTCCTGACGGA

GGTCATCGACAGCACCACCTGCCCCTCGGTGTGCCGCTGCGACAACGGCTTCATCTACTGCAACGACGGC
GGACTCAGATCCATCCCCGCAGATATCCCTGATGATGCCACCACCCTCTACCTGCAGAACAACCAGATCA
ACAAGCCCCGCATCCCCCACGACCTCAAGACCAAGGTCAACGTGCAGGTCATCTACCTATACGACAATGA
CCTGGATGAGTTCCCCATCAACCTGCCCCGGTCCCTCCTCCGGGACCTGCACCTGCAGGACAACAATGTGCGC
AGTATTGCCAGGGACTCGCTGGCCCGCATCCCCCTGCTGGACAAGCTCCACCTGGATGACAACTCCGTGT
CCACGGTCAGCATTGAGGAGGACGCCTTCGCCGACAGCAAACAGCTCAAGCTGCTCTTCCTGACCCGGAA
CCACCTGAGCAGCATCCCCTCGGGGCTGCCGCACACGCTGGAGGAGCTGCGGCTGGATGACAACCGCATC
TCCACCATCCGGCTGCATGCCTTCAAGGGCCTCAACAGCCTGCGGCGCCTGGTGCTGGACGGTAACCTGC
TGGCCAACCAGCGCATCGCCGACGACACCTTCAGCCGCCTACAGAACCTCACAGAGCTCTCGCTGGTGCG
CAATTCGCTGGCCGGCGCCACCCCTCAACCTGCCCAGCGCCCACCTGCAGAAGCTCTACCTGCAGGACAAT
GCCATCAGCCACATCCCCTACAACACGGTGGCCAAGATGCGTGAGCTGGAGCGGCTGGACCTGTCCAACA
ACAACCTGACCACGGTGCCCCCGGGCCTGTTCGACGACCTGGGGAACCTGGCCCACCTGCTGCTCAGGAA
CAACCCTTGGTTTTGTGGCTGCAACCTCATGTGGCTGCGGGACTGGGTGAAGGCACGGGCGGCGTGGTC
AACGTGCGGGGCCTCATGTCCAGGGCCCTGAGAAGGTCCGGCGCATGGCCATCAAGGACATTAGCAGCG
AGATGGACGAGTGTTTTGAGACGGGCCGCAGGGCGGCGTGGCCAATGCGGCTGCCAAGACCACGGCCAC
CAACCACGCCTCTGCCACCACGCCCCAGGGTTCGCTGTTACCGTCAAGGCCAAAAGCCAGGGCTGCGC
CTCCCCGACTCCAACATTGACTACCCATGCCACGGCTGATGGCGCCAAGACCTGGCCATCCACGTGA
AGGCCTGACGGCAGACTCCATCCGCATCACGTGGAAGGCCACGCTCCGCGCCTCCTCTTCCGGCTCAG
TTGCTGCCCCTGGCCACACCCAGCCGTGGGCTCCATCACGGAGACCTTGGTGCAGGGGGACAAGACA
GAGTACCTGCTGACAGCCTGGAGCCAAGTCCACCTACATCATCTGCATGGTCACCATGGAGACCAGCA
ATGCCTACGTAGCTGATGAGACACCGTGTCTGCCAAGGCAGAGACAGCCGACAGCTATGGCCTACCAC
GACACTCAACCAGGACCAGAACGCTGGCCCCATGGCGAGCCTGCCCCTGGCGGGCATCATCGGCGGCCA
GTGCTCTCGTCTTCCTCTTCCTGGTCCTGGGGCCATCTGCTGGTACGTGCACCAGCCTGGCGAGCTGC
TGACCCGGGAGAGGGCCTACAACCGGGGCAGCAGGAAAAGGATGACTATATGGAGTCAGGGACCAAGAA
GGATAACTCCATCCTGGAAATCGCGCGGCCTGGGCTGCAGATGCTGCCCATCAACCCGTACCGGCCAAA
GACGACTACGTCGTGCACACTATCTTCCCCTCCAACGGCAGCAGCCTCTGCAAGGCCACACACACCATTG
GCTACCGCACCACGCGGGGCTACCGGGACGGCGGCATCCCCGACATACACTACTCCTACACATGA (SEQ ID NO:6)

A representative amino acid sequence of the proteoglycan-like protein of the invention

MVVAHPTATTTPTATVIATVVMTTATMDLRDWLFLCYGLIAFLTEVIDSTTCPSVCRCDNGFIYCNDR
GLTSIPADIPDDATTLYLQNNQINNAGIPQDLKTKVNVQVIYLYENDLDSFPINLPRSLRELHLQDNNVR
TIARDSLARIPLLEKLHLDDNSVSTVSIEEDAFADSKQLKLLFLSRNHLSSIPSGLPHTLEELRLDDNRI
SFIPLEAFKGLNSLRRLVLDGNLLANQRIADDTFSRLQNLTELSLVRNSLAAPPLNLPSAHLQKLYLQDN
AISHIPYNTLAKNRELERLDLSNNNITTLPRGLPDDLQNLAQLLLRNNPWFCGCNLMWLRDWVKARAAVV
NVRCLMQQPEKVRGMAIKDITSEMDECFETGPQGGVANAAAKTTASNHASATTPQGSLPTLKAKRPGLR
LPDSNIDYPMATGDGAKTLAIHVKALTADSIRITWKATLPASSFRLSHLRLGHSPAVGSITETLVQGDKT
EYLLTALEPKSTYIICMVTMETSNAYVADETPVCAKAETADSYGPTTTLNQEQNAGPMASLPLAGIIGGA
VALVFLFLVLGAICWYVHQAGELLTRERAYNRGSRKRDDYMESGTKKDNSILSIRGPGLQMLPINPYRAK
EKYVVHTIPSMGSSLCKATHTICYGTTRGYRDGGIPDIDYSYT (SEQ ID NO:7)

Table 9.
Multiple sequence and BLAST alignment of a NOV3 polypeptide and the human fibronectin leucine repeat transmembrane family
(Black outlined amino acids indicate potential regions of conserved sequence; greyed amino acids represent amino acids conservatively substituted; and non-highlighted amino acids indicate positions in which mutations to a broad range of alternative amino acid residues occurs)

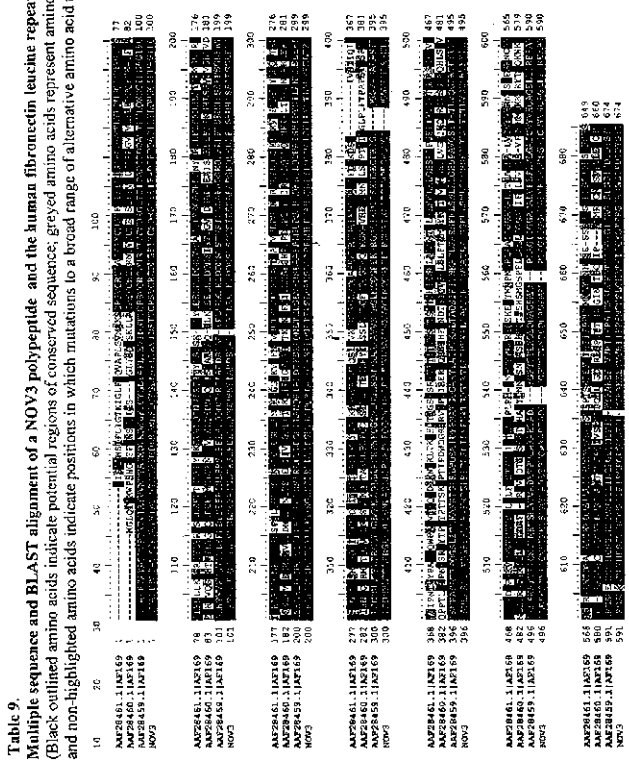


TABLE 9. continued

```
>ref|NP_037412.1| fibronectin leucine rich transmembrane protein 1
 gb|AAF28459.1|AF169675_1 (AF169675) leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT1
[Homo
          sapiens]
         Length = 674

 Score = 1365 bits (3494), Expect = 0.0
Identities = 673/674 (99%), Positives = 674/674 (99%)

NOV3:  1   MVVAHPTATATTPTATVTATVVMTTATMDLRDWLFLCYGLIAFLTEVIDSTTCPSVCRC 60
          ||||| |||||||||||| |||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1   MVVAHPTATATTPTATVTATVVMTTATMDLRDWLFLCYGLIAFLTEVIDSTTCPSVCRC 60

NOV3:  61  CNGFIYCNDRGLTSIPADIPDDATTLYLQNNQINNAGIPQDLKTKVNVQVIYLYENDLDE 120
          ||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 61  CNGFIYCNDRGLTSIPADIPDDATTLYLQNNQINNAGIPQDLKTKVNVQVIYLYENDLDE 120

NOV3:  121 FPINLPRSLRELHLQDNNVRTIARDSLARIPLLEKLHLDDNSVSTVSIEEDAFADSKQLK 180
          ||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 121 FPINLPRSLRELHLQDNNVRTIARDSLARIPLLEKLHLDDNSVSTVSIEEDAFADSKQLK 180

NOV3:  181 LLFLSRNELSSIPSGLPHTLEELRLDDNRISTIPLHAFKGLNSLRRLVLDGNLLANQRIA 240
          ||||||||||.|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 181 LLFLSRNELSSIPSGLPHTLEELRLDDNRISTIPLHAFKGLNSLRRLVLDGNLLANQRIA 240

NOV3:  241 DDTFSRLQNLTRLSLVRNSLAAPPLNLPSAHLQKLYLQDNAISHIPYNTLAKMRELERLD 300
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 241 DDTFSRLQNLTELSLVRNSLAAPPLNLPSAHLQKLYLQDNAISHIPYNILAKMRELERLD 300

NOV3:  301 LSNNNLTTLPRGLFDDLGNLAQLLLHNNPWFCGCNLMWLRDWVKARAAVVNVRGLMCQGP 360
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 301 LSNNNLTTLPRGLFDDLGNLAQLLLRNNPWFCGCNLMWLRDWVKARAAVVNVRGLMCQGP 360

NOV3:  361 EKVRGMAIKDITSEMDECFETGPQCGVANAAAKTCASNHASATTPQGSLFTLKAKEPGLR 420
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 361 EKVRGMAIKDITSEMDECFETGPQCGVANAAAKTTASNHASATTPQGSLFTLKAKEPGLR 420

NOV3:  421 LPDSNIDYPMATGDGAKTLAIHVKALTADSIRITWKATLPASSFRLSWLRLGHSPAVGSI 480
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 421 LPDSNIDYPMATGDGAKTLAIHVKALTADSIRITWKATLPASSFRLSWLRLGHSPAVGSI 480

NOV3:  481 TETLVQSDKTSYLLTALEPKSTYIICMVTMETSNAYVADETPVCAEATADSYGPTTTLN 540
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 481 TETLVQSDKTSYLLTALEPKSTYIICMVTMETSNAYVADETPVCAEATADSYGPTTTLN 540

NOV3:  541 QEQNAGPMASLPLAGIIGGAVALVFLFLVLGAICWYVHQAGSLLTRERAYNRGSRKKDDY 600
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 541 QEQNAGPMASLPLAGIIGGAVALVFLFLVLGAICWYVHQAGSLLTRERAYNRGSREKDDY 600

NOV3:  601 MESGTKKDNSILEIRGPGLQMLPINPYRAKEEYVVHTIPPSNGSSLCKATHTIGYGTTRG 660
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 601 MESGTKKDNSILEIRGPGLQMLPINPYRAKEEYVVHTIPPSNGSSLCKATHTIGYGTTRG 660

NOV3:  661 YRDGCIPDIDYSYT 674
          ||||||||||||||
Sbjct: 661 YRDGGIPDIDYSYT 674
```

Table 10.
Multiple Sequence alignment between NOV3 polypeptide and various fibromodulins
(NOV3 is denoted AP000597_GENSCAN_3)

(Black outlined amino acids indicate potential regions of conserved sequence; greyed amino acids represent amino acids conservatively substituted; and non-highlighted amino acids indicate positions in which mutations to a broad range of alternative amino acid residues occurs)

This page left blank intentionally.

Table 11.
Sequences and Corresponding SEQ ID Numbers

NOV number	clone	SEQ ID number of nucleic acid sequence	SEQ ID number of encoded amino acid sequence	homology	ORF of nucleic acid
1	AL109798_A	1	2	thymosin beta 10	61-237
2	AL035703_A	4	5	ephrin A receptor	1-2976
3	AP000597_A	6	7	proteoglycan	1-2025

NOV Nucleic Acids and Polypeptides

One aspect of the invention pertains to isolated nucleic acid molecules that encode NOV polypeptides or biologically-active portions thereof. Also included in the invention are nucleic acid fragments sufficient for use as hybridization probes to identify NOV-encoding nucleic acids (e.g., NOV mRNAs) and fragments for use as PCR primers for the amplification and/or mutation of NOV nucleic acid molecules. As used herein, the term "nucleic acid molecule" is intended to include DNA molecules (e.g., cDNA or genomic DNA), RNA molecules (e.g., mRNA), analogs of the DNA or RNA generated using nucleotide analogs, and derivatives, fragments and homologs thereof. The nucleic acid molecule can be single-stranded or double-stranded, but preferably is comprised double-stranded DNA.

A NOV nucleic acid can encode a mature NOV polypeptide. As used herein, a "mature" form of a polypeptide or protein disclosed in the present invention is the product of a naturally occurring polypeptide or precursor form or proprotein. The naturally occurring polypeptide, precursor or proprotein includes, by way of nonlimiting example, the full length gene product, encoded by the corresponding gene. Alternatively, it can be defined as the polypeptide, precursor or proprotein encoded by an open reading frame described herein. The product "mature" form arises, again by way of nonlimiting example, as a result of one or more naturally occurring processing steps as they may take place within the cell, or host cell, in which the gene product arises. Examples of such processing steps leading to a "mature" form of a polypeptide or protein include the cleavage of the N-terminal methionine residue encoded by the initiation codon of an open reading frame, or the proteolytic cleavage of a signal peptide or leader sequence. Thus a mature form arising from a precursor polypeptide or protein that has residues 1 to N, where residue 1 is the N-terminal methionine, would have residues 2 through N remaining after removal of the N-terminal methionine. Alternatively, a mature form arising from a precursor polypeptide or protein having residues 1 to N, in which

an N-terminal signal sequence from residue 1 to residue M is cleaved, would have the residues from residue M+1 to residue N remaining. Further as used herein, a "mature" form of a polypeptide or protein may arise from a step of post-translational modification other than a proteolytic cleavage event. Such additional processes include, by way of non-limiting example, glycosylation, myristoylation or phosphorylation. In general, a mature polypeptide or protein may result from the operation of only one of these processes, or a combination of any of them.

The term "probes", as utilized herein, refers to nucleic acid sequences of variable length, preferably between at least about 10 nucleotides (nt), 100 nt, or as many as approximately, e.g., 6,000 nt, depending upon the specific use. Probes are used in the detection of identical, similar, or complementary nucleic acid sequences. Longer length probes are generally obtained from a natural or recombinant source, are highly specific, and much slower to hybridize than shorter-length oligomer probes. Probes can be single- or double-stranded and designed to have specificity in PCR, membrane-based hybridization technologies, or ELISA-like technologies.

The term "isolated" nucleic acid molecule, as utilized herein, is one which is separated from other nucleic acid molecules which are present in the natural source of the nucleic acid. Preferably, an "isolated" nucleic acid is free of sequences which naturally flank the nucleic acid (i.e., sequences located at the 5'- and 3'-termini of the nucleic acid) in the genomic DNA of the organism from which the nucleic acid is derived. For example, in various embodiments, the isolated NOV nucleic acid molecules can contain less than about 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb,
0.5 kb or 0.1 kb of nucleotide sequences which naturally flank the nucleic acid molecule in genomic DNA of the cell/tissue from which the nucleic acid is derived (e.g., brain, heart, liver, spleen, etc.). Moreover, an "isolated" nucleic acid molecule, such as a cDNA molecule, can be substantially free of other cellular material or culture medium when produced by recombinant techniques, or of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized.
A nucleic acid molecules of the invention, e.g., a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 4, or 6, or a complement of this aforementioned nucleotide sequence, can be isolated using standard molecular biology techniques and the sequence information provided herein. Using all or a portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 1, 4, or 6 as a hybridization probe, NOV molecules can be isolated using standard hybridization and cloning techniques (e.g., as described in Sambrook, et al., (eds.),

MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; and Ausubel, et al., (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993.) A nucleic acids of the invention can be amplified using cDNA, mRNA or alternatively, genomic DNA, as a template and appropriate oligonucleotide primers according to standard PCR amplification techniques. The nucleic acid so amplified can be cloned into an appropriate vector and characterized by DNA sequence analysis. Furthermore, oligonucleotides corresponding to NOV nucleotide sequences can be prepared by standard synthetic techniques, e.g., using an automated DNA synthesizer.

As used herein, the term "oligonucleotide" refers to a series of linked nucleotide residues, which oligonucleotide has a sufficient number of nucleotide bases to be used in a PCR reaction. A short oligonucleotide sequence can be based on, or designed from, a genomic or cDNA sequence and is used to amplify, confirm, or reveal the presence of an identical, similar or complementary DNA or RNA in a particular cell or tissue. Oligonucleotides comprise portions of a nucleic acid sequence having about 10 nt, 50 nt, or 100 nt in length, preferably about 15 nt to 30 nt in length. In one embodiment of the invention, an oligonucleotide comprising a nucleic acid molecule less than 100 nt in length would further comprise at least 6 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 1, 4, or 6 or a complement thereof. Oligonucleotides can be chemically synthesized and may also be used as probes.

In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention comprises a nucleic acid molecule that is a complement of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1, 4, or 6, or a portion of this nucleotide sequence (e.g., a fragment that can be used as a probe or primer or a fragment encoding a biologically-active portion of a NOV polypeptide). A nucleic acid molecule that is complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1, 4, or 6, is one that is sufficiently complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1, 4, or 6, that it can hydrogen bond with little or no mismatches to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1, 4, or 6, thereby forming a stable duplex.

As used herein, the term "complementary" refers to Watson-Crick or Hoogsteen base pairing between nucleotides units of a nucleic acid molecule, and the term "binding" means the physical or chemical interaction between two polypeptides or compounds or associated polypeptides or compounds or combinations thereof. Binding includes ionic, non-ionic, van der Waals, hydrophobic interactions, and the like. A physical interaction can be either direct or indirect. Indirect interactions can be through or due to the effects of another polypeptide or

compound. Direct binding refers to interactions that do not take place through, or due to, the effect of another polypeptide or compound, but instead are without other substantial chemical intermediates.

Fragments provided herein are defined as sequences of at least 6 (contiguous) nucleic acids or at least 4 (contiguous) amino acids, a length sufficient to allow for specific hybridization in the case of nucleic acids or for specific recognition of an epitope in the case of amino acids, respectively, and are at most some portion less than a full length sequence. Fragments can be derived from any contiguous portion of a nucleic acid or amino acid sequence of choice.

Derivatives are nucleic acid sequences or amino acid sequences formed from the native compounds either directly or by modification or partial substitution. Analogs are nucleic acid sequences or amino acid sequences that have a structure similar to, but not identical to, the native compound but differs from it in respect to certain components or side chains. Analogs can be synthetic or from a different evolutionary origin and may have a similar or opposite metabolic activity compared to wild type. Homologs are nucleic acid sequences or amino acid sequences of a particular gene that are derived from different species.

Derivatives and analogs can be full length or other than full length, if the derivative or analog contains a modified nucleic acid or amino acid, as described below. Derivatives or analogs of the nucleic acids or proteins of the invention include, but are not limited to, molecules comprising regions that are substantially homologous to the nucleic acids or proteins of the invention, in various embodiments, by at least about 30%, 50%, 70%, 80%, or 95% identity (with a preferred identity of 80-95%) over a nucleic acid or amino acid sequence of identical size or when compared to an aligned sequence in which the alignment is done by a computer homology program known in the art, or whose encoding nucleic acid is capable of hybridizing to the complement of a sequence encoding the aforementioned proteins under stringent, moderately stringent, or low stringent conditions. See e.g. Ausubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993, and below.

A "homologous nucleic acid sequence" or "homologous amino acid sequence," or variations thereof, refer to sequences characterized by a homology at the nucleotide level or amino acid level as discussed above. Homologous nucleotide sequences encode those sequences coding for isoforms of NOV polypeptides. Isoforms can be expressed in different tissues of the same organism as a result of, for example, alternative splicing of RNA. Alternatively, isoforms can be encoded by different genes. In the invention, homologous

nucleotide sequences include nucleotide sequences encoding for a NOV polypeptide of species other than humans, including, but not limited to: vertebrates, and thus can include, e.g., frog, mouse, rat, rabbit, dog, cat, cow, horse, and other organisms. Homologous nucleotide sequences also include, but are not limited to, naturally occurring allelic variations and mutations of the nucleotide sequences set forth herein. A homologous nucleotide sequence does not, however, include the exact nucleotide sequence encoding human NOV protein. Homologous nucleic acid sequences include those nucleic acid sequences that encode conservative amino acid substitutions (see below) in SEQ ID NO:2, 5, or 7, as well as a polypeptide possessing NOV biological activity. Various biological activities of the NOV proteins are described below.

An ORF corresponds to a nucleotide sequence that could potentially be translated into a polypeptide. A stretch of nucleic acids comprising an ORF is uninterrupted by a stop codon. An ORF that represents the coding sequence for a full protein begins with an ATG "start" codon and terminates with one of the three "stop" codons, namely, TAA, TAG, or TGA. For the purposes of this invention, an ORF can be any part of a coding sequence, with or without a start codon, a stop codon, or both. For an ORF to be considered as a good candidate for coding for a *bona fide* cellular protein, a minimum size requirement is often set, e.g., a stretch of DNA that would encode a protein of 50 amino acids or more.

The nucleotide sequences determined from the cloning of the NOV genes allows for the generation of probes and primers designed for use in identifying and/or cloning NOV homologues in other cell types, e.g. from other tissues, as well as NOV homologues from other vertebrates. The probe/primer typically comprises substantially purified oligonucleotide. The oligonucleotide typically comprises a region of nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to at least about 12, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 or 400 consecutive sense strand nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 4, or 6; or an anti-sense strand nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 4, or 6; or of a naturally occurring mutant of SEQ ID NO:1, 4, or 6.

Probes based on the NOV nucleotide sequences can be used to detect transcripts or genomic sequences encoding the same or homologous proteins. In various embodiments, the probe further comprises a label group attached thereto, e.g. the label group can be a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor. Such probes can be used as a part of a diagnostic test kit for identifying cells or tissues which mis-express a NOV protein, such as by measuring a level of a NOV-encoding nucleic acid in a sample of

cells from a subject e.g., detecting NOV mRNA levels or determining whether a genomic NOV gene has been mutated or deleted.

"A polypeptide having a biologically-active portion of a NOV polypeptide" refers to polypeptides exhibiting activity similar, but not necessarily identical to, an activity of a polypeptide of the invention, including mature forms, as measured in a particular biological assay, with or without dose dependency. A nucleic acid fragment encoding a "biologically-active portion of NOV" can be prepared by isolating a portion of SEQ ID NO:1, 4, or 6, that encodes a polypeptide having a NOV biological activity (the biological activities of the NOV proteins are described below), expressing the encoded portion of NOV protein (e.g., by recombinant expression in vitro) and assessing the activity of the encoded portion of NOV.

NOV Nucleic Acid and Polypeptide Variants

The invention further encompasses nucleic acid molecules that differ from the nucleotide sequences shown in SEQ ID NO:1, 4, or 6, due to degeneracy of the genetic code and thus encode the same NOV proteins as that encoded by the nucleotide sequences shown in SEQ ID NO:1, 4, or 6. In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention has a nucleotide sequence encoding a protein having an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, 5, or 7.

In addition to the NOV nucleotide sequences shown in SEQ ID NO:1, 4, or 6, it will be appreciated by those skilled in the art that DNA sequence polymorphisms that lead to changes in the amino acid sequences of the NOV polypeptides may exist within a population (e.g., the human population). Such genetic polymorphism in the NOV genes may exist among individuals within a population due to natural allelic variation. As used herein, the terms "gene" and "recombinant gene" refer to nucleic acid molecules comprising an open reading frame (ORF) encoding a NOV protein, preferably a vertebrate NOV protein. Such natural allelic variations can typically result in 1-5% variance in the nucleotide sequence of the NOV genes. Any and all such nucleotide variations and resulting amino acid polymorphisms in the NOV polypeptides, which are the result of natural allelic variation and that do not alter the functional activity of the NOV polypeptides, are intended to be within the scope of the invention.

Moreover, nucleic acid molecules encoding NOV proteins from other species, and thus that have a nucleotide sequence that differs from the human sequence of SEQ ID NO:1, 4, or 6, are intended to be within the scope of the invention. Nucleic acid molecules corresponding to natural allelic variants and homologues of the NOV cDNAs of the invention can be isolated based on their homology to the human NOV nucleic acids disclosed herein using the human

cDNAs, or a portion thereof, as a hybridization probe according to standard hybridization techniques under stringent hybridization conditions.

Accordingly, in another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention is at least 6 nucleotides in length and hybridizes under stringent conditions to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 4, or 6. In another embodiment, the nucleic acid is at least 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, or 2000 or more nucleotides in length. In yet another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention hybridizes to the coding region. As used herein, the term "hybridizes under stringent conditions" is intended to describe conditions for hybridization and washing under which nucleotide sequences at least 60% homologous to each other typically remain hybridized to each other.

Homologs (i.e., nucleic acids encoding NOV proteins derived from species other than human) or other related sequences (e.g., paralogs) can be obtained by low, moderate or high stringency hybridization with all or a portion of the particular human sequence as a probe using methods well known in the art for nucleic acid hybridization and cloning.

As used herein, the phrase "stringent hybridization conditions" refers to conditions under which a probe, primer or oligonucleotide will hybridize to its target sequence, but to no other sequences. Stringent conditions are sequence-dependent and will be different in different circumstances. Longer sequences hybridize specifically at higher temperatures than shorter sequences. Generally, stringent conditions are selected to be about 5°C lower than the thermal melting point (Tm) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. The Tm is the temperature (under defined ionic strength, pH and nucleic acid concentration) at which 50% of the probes complementary to the target sequence hybridize to the target sequence at equilibrium. Since the target sequences are generally present at excess, at Tm, 50% of the probes are occupied at equilibrium. Typically, stringent conditions will be those in which the salt concentration is less than about 1.0 M sodium ion, typically about 0.01 to 1.0 M sodium ion (or other salts) at
pH 7.0 to 8.3 and the temperature is at least about 30°C for short probes, primers or oligonucleotides (e g., 10 nt to 50 nt) and at least about 60°C for longer probes, primers and oligonucleotides. Stringent conditions may also be achieved with the addition of destabilizing agents, such as formamide.

Stringent conditions are known to those skilled in the art and can be found in Ausubel, et al., (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Preferably, the conditions are such that sequences at least about

65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, or 99% homologous to each other typically remain hybridized to each other. A non-limiting example of stringent hybridization conditions are hybridization in a high salt buffer comprising 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA, and 500 mg/ml denatured salmon sperm DNA at 65°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.01% BSA at 50°C. An isolated nucleic acid molecule of the invention that hybridizes under stringent conditions to the sequences of SEQ ID NO:1, 4, or 6, corresponds to a naturally-occurring nucleic acid molecule. As used herein, a "naturally-occurring" nucleic acid molecule refers to an RNA or DNA molecule having a nucleotide sequence that occurs in nature (e.g., encodes a natural protein).

In a second embodiment, a nucleic acid sequence that can hybridize to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 4, 6, or fragments, analogs or derivatives thereof, under conditions of moderate stringency is provided. A non-limiting example of moderate stringency hybridization conditions are hybridization in 6X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.5% SDS and 100 mg/ml denatured salmon sperm DNA at 55°C, followed by one or more washes in 1X SSC, 0.1% SDS at 37°C. Other conditions of moderate stringency that can be used are well-known within the art. See, e.g., Ausubel ,et al. (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, and Kriegler, 1990; GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY.

In a third embodiment, a nucleic acid that can hybridize to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequences of SEQ ID NO:1, 4, 6, or fragments, analogs or derivatives thereof, under conditions of low stringency, is provided. A non-limiting example of low stringency hybridization conditions are hybridization in 35% formamide, 5X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.2% BSA, 100 mg/ml denatured salmon sperm DNA, 10% (wt/vol) dextran sulfate at 40°C, followed by one or more washes in 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, and 0.1% SDS at 50°C. Other conditions of low stringency that can be used are well known in the art (e.g., as employed for cross-species hybridizations). See, e.g., Ausubel, et al. (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, and Kriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; Shilo and Weinberg, 1981. Proc Natl Acad Sci USA 78: 6789-6792.

Conservative Mutations

In addition to naturally-occurring allelic variants of NOV sequences that may exist in the population, the skilled artisan will further appreciate that changes can be introduced by mutation into the nucleotide sequences of SEQ ID NO:1, 4, or 6, thereby leading to changes in the amino acid sequences of the encoded NOV proteins, without altering the functional ability of said NOV proteins. For example, nucleotide substitutions leading to amino acid substitutions at "non-essential" amino acid residues can be made in the sequence of SEQ ID NO:2, 5, or 7. A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequences of the NOV proteins without altering their biological activity, whereas an "essential" amino acid residue is required for such biological activity. For example, amino acid residues that are conserved among the NOV proteins of the invention are predicted to be particularly non-amenable to alteration. Amino acids for which conservative substitutions can be made are well-known within the art.

Another aspect of the invention pertains to nucleic acid molecules encoding NOV proteins that contain changes in amino acid residues that are not essential for activity. Such NOV proteins differ in amino acid sequence from SEQ ID NO:2, 5, or 7, yet retain biological activity. In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence encoding a protein, wherein the protein comprises an amino acid sequence at least about 45% homologous to the amino acid sequences of SEQ ID NO:2, 5, or 7. Preferably, the protein encoded by the nucleic acid molecule is at least about 60% homologous to SEQ ID NO:2, 5, or 7; more preferably at least about 70% homologous to SEQ ID NO:2, 5, or 7; still more preferably at least about 80% homologous to SEQ ID NO:2, 5, or 7; even more preferably at least about 90% homologous to SEQ ID NO:2, 5, or 7; and most preferably at least about 95% homologous to SEQ ID NO:2, 5, or 7.

An isolated nucleic acid molecule encoding a NOV protein homologous to the protein of SEQ ID NO:2, 5, or 7, can be created by introducing one or more nucleotide substitutions, additions or deletions into the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 4, or 6, such that one or more amino acid substitutions, additions or deletions are introduced into the encoded protein.

Mutations can be introduced into SEQ ID NO:2, 5, or 7, by standard techniques, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Preferably, conservative amino acid substitutions are made at one or more predicted, non-essential amino acid residues. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined within the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid,

glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, a predicted non-essential amino acid residue in the NOV protein is replaced with another amino acid residue from the same side chain family. Alternatively, in another embodiment, mutations can be introduced randomly along all or part of a NOV coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for NOV biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis of SEQ ID NO:2, 5, or 7, the encoded protein can be expressed by any recombinant technology known in the art and the activity of the protein can be determined.

In one embodiment, a mutant NOV protein can be assayed for (i) the ability to form protein:protein interactions with other NOV proteins, other cell-surface proteins, or biologically-active portions thereof, (ii) complex formation between a mutant NOV protein and a NOV ligand; or (iii) the ability of a mutant NOV protein to bind to an intracellular target protein or biologically-active portion thereof; (e.g. avidin proteins). In yet another embodiment, a mutant NOV protein can be assayed for the ability to regulate a specific biological function (e.g., regulation of insulin release).

Antisense Nucleic Acids

Another aspect of the invention pertains to isolated antisense nucleic acid molecules that can hybridize to or complementary to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 4, 6, or fragments, analogs or derivatives thereof. An "antisense" nucleic acid comprises a nucleotide sequence that is complementary to a "sense" nucleic acid encoding a protein (e.g., complementary to the coding strand of a double-stranded cDNA molecule or complementary to an mRNA sequence). In specific aspects, antisense nucleic acid molecules are provided that comprise a sequence complementary to at least about 10, 25, 50, 100, 250 or 500 nucleotides or an entire NOV coding strand, or to only a portion thereof. Nucleic acid molecules encoding fragments, homologs, derivatives and analogs of a NOV protein of SEQ ID NO:2, 5, or 7; or antisense nucleic acids complementary to a NOV nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1, 4, or 6, are additionally provided.

In one embodiment, an antisense nucleic acid molecule is antisense to a "coding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding a NOV protein. The term "coding region" refers to the region of the nucleotide sequence comprising codons which are translated into amino acid residues. In another embodiment, the antisense nucleic acid molecule is antisense

to a "noncoding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding the NOV protein. The term "noncoding region" refers to 5' and 3' sequences which flank the coding region that are not translated into amino acids (i.e., also referred to as 5' and 3' untranslated regions).

Given the coding strand sequences encoding the NOV protein disclosed herein, antisense nucleic acids of the invention can be designed according to the rules of Watson and Crick or Hoogsteen base pairing. The antisense nucleic acid molecule can be complementary to the entire coding region of NOV mRNA, but more preferably is an oligonucleotide that is antisense to only a portion of the coding or noncoding region of NOV mRNA. For example, the antisense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site of NOV mRNA. An antisense oligonucleotide can be, for example, about 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 or 50 nucleotides in length. An antisense nucleic acid of the invention can be constructed using chemical synthesis or enzymatic ligation reactions using procedures known in the art. For example, an antisense nucleic acid (e.g., an antisense oligonucleotide) can be chemically synthesized using naturally-occurring nucleotides or variously modified nucleotides designed to increase the biological stability of the molecules or to increase the physical stability of the duplex formed between the antisense and sense nucleic acids (e.g., phosphorothioate derivatives and acridine substituted nucleotides can be used).

Examples of modified nucleotides that can be used to generate the antisense nucleic acid include: 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xanthine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxylmethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, and 2,6-diaminopurine. Alternatively, the antisense nucleic acid can be produced biologically using an expression vector into which a nucleic acid has been subcloned in an antisense orientation (i.e., RNA transcribed from the inserted nucleic acid will be of an antisense orientation to a target nucleic acid of interest, described further in the following subsection).

The antisense nucleic acid molecules of the invention are typically administered to a subject or generated in situ such that they hybridize with or bind to cellular mRNA and/or genomic DNA encoding a NOV protein to thereby inhibit expression of the protein (e.g., by inhibiting transcription and/or translation). The hybridization can be by conventional nucleotide complementarity to form a stable duplex, or, for example, in the case of an antisense nucleic acid molecule that binds to DNA duplexes, through specific interactions in the major groove of the double helix. An example of a route of administration of antisense nucleic acid molecules of the invention includes direct injection at a tissue site. Alternatively, antisense nucleic acid molecules can be modified to target selected cells and then administered systemically. For example, for systemic administration, antisense molecules can be modified such that they specifically bind to receptors or antigens expressed on a selected cell surface (e.g., by linking the antisense nucleic acid molecules to peptides or antibodies that bind to cell surface receptors or antigens). The antisense nucleic acid molecules can also be delivered to cells using the vectors described herein. To achieve sufficient nucleic acid molecules, vector constructs in which the antisense nucleic acid molecule is placed under the control of a strong pol II or pol III promoter are preferred.

In yet another embodiment, the antisense nucleic acid molecule of the invention is an alpha-anomeric nucleic acid molecule. An alpha-anomeric nucleic acid molecule forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual alpha-units, the strands run parallel to each other. See, e.g., Gaultier, et al., 1987. Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641. The antisense nucleic acid molecule can also comprise a 2'-o-methylribonucleotide (see, e.g., Inoue, et al. 1987. Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148) or a chimeric RNA-DNA analogue (see, e.g., Inoue, et al., 1987. FEBS Lett. 215: 327-330.

Ribozymes and PNA Moieties

Nucleic acid modifications include, by way of non-limiting example, modified bases, and nucleic acids whose sugar phosphate backbones are modified or derivatized. These modifications are carried out at least in part to enhance the chemical stability of the modified nucleic acid, such that they can be used, for example, as antisense binding nucleic acids in therapeutic applications in a subject.

In one embodiment, an antisense nucleic acid of the invention is a ribozyme. Ribozymes are catalytic RNA molecules with ribonuclease activity that are capable of cleaving a single-stranded nucleic acid, such as an mRNA, to which they have a complementary region. Thus, ribozymes (e.g., hammerhead ribozymes as described in Haselhoff and Gerlach 1988. Nature 334: 585-591) can be used to catalytically cleave NOV

mRNA transcripts to thereby inhibit translation of NOV mRNA. A ribozyme having specificity for a NOV-encoding nucleic acid can be designed based upon the nucleotide sequence of a NOV cDNA disclosed herein (i.e., SEQ ID NO:1, 4, or 6). For example, a derivative of a Tetrahymena L-19 IVS RNA can be constructed in which the nucleotide sequence of the active site is complementary to the nucleotide sequence to be cleaved in a NOV-encoding mRNA. See, e.g., U.S. Patent 4,987,071 to Cech, et al. and U.S. Patent 5,116,742 to Cech, et al. NOV mRNA can also be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules. See, e.g., Bartel et al., (1993) Science 261:1411-1418.

Alternatively, NOV gene expression can be inhibited by targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the NOV nucleic acid (e.g., the NOV promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the NOV gene in target cells. See, e.g., Helene, 1991. Anticancer Drug Des. 6: 569-84; Helene, et al. 1992. Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 27-36; Maher, 1992. Bioassays 14: 807-15.

In various embodiments, the NOV nucleic acids can be modified at the base moiety, sugar moiety or phosphate backbone to improve, e.g., the stability, hybridization, or solubility of the molecule. For example, the deoxyribose phosphate backbone of the nucleic acids can be modified to generate peptide nucleic acids. See, e.g., Hyrup, et al., 1996. Bioorg Med Chem 4: 5-23. As used herein, the terms "peptide nucleic acids" or "PNAs" refer to nucleic acid mimics (e.g., DNA mimics) in which the deoxyribose phosphate backbone is replaced by a pseudopeptide backbone and only the four natural nucleobases are retained. The neutral backbone of PNAs has been shown to allow for specific hybridization to DNA and RNA under conditions of low ionic strength. The synthesis of PNA oligomers can be performed using standard solid phase peptide synthesis protocols as described in Hyrup, et al., 1996. supra; Perry-O'Keefe, et al., 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670-14675.

PNAs of NOV can be used in therapeutic and diagnostic applications. For example, PNAs can be used as antisense or antigene agents for sequence-specific modulation of gene expression by, e.g., inducing transcription or translation arrest or inhibiting replication. PNAs of NOV can also be used, for example, in the analysis of single base pair mutations in a gene (e.g., PNA directed PCR clamping; as artificial restriction enzymes when used in combination with other enzymes, e.g., S1 nucleases (see, Hyrup, et al., 1996.supra); or as probes or primers for DNA sequence and hybridization (see, Hyrup, et al., 1996, supra; Perry-O'Keefe, et al., 1996. supra).

In another embodiment, PNAs of NOV can be modified, e.g., to enhance their stability or cellular uptake, by attaching lipophilic or other helper groups to PNA, by the formation of PNA-DNA chimeras, or by the use of liposomes or other techniques of drug delivery known in the art. For example, PNA-DNA chimeras of NOV can be generated that may combine the advantageous properties of PNA and DNA. Such chimeras allow DNA recognition enzymes (e.g., RNase H and DNA polymerases) to interact with the DNA portion while the PNA portion would provide high binding affinity and specificity. PNA-DNA chimeras can be linked using linkers of appropriate lengths selected in terms of base stacking, number of bonds between the nucleobases, and orientation (see, Hyrup, etal., 1996. supra). The synthesis of PNA-DNA chimeras can be performed as described in Hyrup, et al., 1996. supra and Finn, et al., 1996. Nucl Acids Res 24: 3357-3363. For example, a DNA chain can be synthesized on a solid support using standard phosphoramidite coupling chemistry, and modified nucleoside analogs, e.g., 5'-(4-methoxytrityl)amino-5'-deoxy-thymidine phosphoramidite, can be used between the PNA and the 5' end of DNA. See, e.g., Mag, et al., 1989. Nucl Acid Res 17: 5973-5988. PNA monomers are then coupled in a stepwise manner to produce a chimeric molecule with a 5' PNA segment and a 3' DNA segment. See, e.g., Finn, et al., 1996. supra. Alternatively, chimeric molecules can be synthesized with a 5' DNA segment and a 3' PNA segment. See, e.g., Petersen, et al., 1975. Bioorg. Med. Chem. Lett. 5: 1119-11124.

In other embodiments, the oligonucleotide may include other appended groups such as peptides (e.g., for targeting host cell receptors in vivo), or agents facilitating transport across the cell membrane (see, e.g., Letsinger, et al., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556; Lemaitre, et al., 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652; PCT Publication No. WO88/09810) or the blood-brain barrier (see, e.g., PCT Publication No. WO 89/10134). In addition, oligonucleotides can be modified with hybridization triggered cleavage agents (see, e.g., Krol, et al., 1988. BioTechniques 6:958-976) or intercalating agents (see, e.g., Zon, 1988. Pharm. Res. 5: 539-549). To this end, the oligonucleotide can be conjugated to another molecule, e.g., a peptide, a hybridization triggered cross-linking agent, a transport agent, a hybridization-triggered cleavage agent, and the like.

NOV Polypeptides

A polypeptide according to the invention includes a polypeptide including the amino acid sequence of NOV polypeptides whose sequences are provided in SEQ ID NO:2, 5, or 7. The invention also includes a mutant or variant protein any of whose residues can be changed from the corresponding residues shown in SEQ ID NO:2, 5, or 7, while still encoding a protein that maintains its NOV activities and physiological functions, or a functional fragment thereof.

In general, a NOV variant that preserves NOV-like function includes any variant in which residues at a particular position in the sequence have been substituted by other amino acids, and further include the possibility of inserting an additional residue or residues between two residues of the parent protein as well as the possibility of deleting one or more residues from the parent sequence. Any amino acid substitution, insertion, or deletion is encompassed by the invention. In favorable circumstances, the substitution is a conservative substitution as defined above.

One aspect of the invention pertains to isolated NOV proteins, and biologically-active portions thereof, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. Also provided are polypeptide fragments suitable for use as immunogens to raise anti-NOV antibodies. In one embodiment, native NOV proteins can be isolated from cells or tissue sources by an appropriate purification scheme using standard protein purification techniques. In another embodiment, NOV proteins are produced by recombinant DNA techniques. Alternative to recombinant expression, a NOV protein or polypeptide can be synthesized chemically using standard peptide synthesis techniques.

An "isolated" or "purified" polypeptide or protein or biologically-active portion thereof is substantially free of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source from which the NOV protein is derived, or substantially free from chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. The language "substantially free of cellular material" includes preparations of NOV proteins in which the protein is separated from cellular components of the cells from which it is isolated or recombinantly-produced. In one embodiment, the language "substantially free of cellular material" includes preparations of NOV proteins having less than about 30% (by dry weight) of non-NOV proteins (also referred to herein as a "contaminating protein"), more preferably less than about 20% of non-NOV proteins, still more preferably less than about 10% of non-NOV proteins, and most preferably less than about 5% of non-NOV proteins. When the NOV protein or biologically-active portion thereof is recombinantly-produced, it is also preferably substantially free of culture medium, i.e., culture medium represents less than about 20%, more preferably less than about 10%, and most preferably less than about 5% of the volume of the NOV protein preparation.

The language "substantially free of chemical precursors or other chemicals" includes preparations of NOV proteins in which the protein is separated from chemical precursors or other chemicals that are involved in the synthesis of the protein. In one embodiment, the language "substantially free of chemical precursors or other chemicals" includes preparations of NOV proteins having less than about 30% (by dry weight) of chemical precursors or non-

NOV chemicals, more preferably less than about 20% chemical precursors or non-NOV chemicals, still more preferably less than about 10% chemical precursors or non-NOV chemicals, and most preferably less than about 5% chemical precursors or non-NOV chemicals.

Biologically-active portions of NOV proteins include peptides comprising amino acid sequences sufficiently homologous to or derived from the amino acid sequences of the NOV proteins (e.g., the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, 5, or 7) that include fewer amino acids than the full-length NOV proteins, and exhibit at least one activity of a NOV protein. Typically, biologically-active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the NOV protein. A biologically-active portion of a NOV protein can be a polypeptide which is, for example, 10, 25, 50, 100 or more amino acid residues in length. Moreover, other biologically-active portions, in which other regions of the protein are deleted, can be prepared by recombinant techniques and evaluated for one or more of the functional activities of a native NOV protein.

In an embodiment, the NOV protein has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, 5, or 7. In other embodiments, the NOV protein is substantially homologous to SEQ ID NO:2, 5, or 7, and retains the functional activity of the protein of SEQ ID NO:2, 5, or 7, yet differs in amino acid sequence due to natural allelic variation or mutagenesis, as described in detail, below. Accordingly, in another embodiment, the NOV protein is a protein that comprises an amino acid sequence at least about 45% homologous to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, 5, or 7 and retains the functional activity of the NOV proteins of SEQ ID NO:2, 5, or 7.

Determining Homology Between Two or More Sequences

To determine the percent homology of two amino acid sequences or of two nucleic acids, the sequences are aligned for optimal comparison purposes (e.g., gaps can be introduced in the sequence of a first amino acid or nucleic acid sequence for optimal alignment with a second amino or nucleic acid sequence). The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are homologous at that position (i.e., as used herein amino acid or nucleic acid "homology" is equivalent to amino acid or nucleic acid "identity").

The nucleic acid sequence homology can be determined as the degree of identity between two sequences. The homology can be determined using computer programs known

in the art, such as GAP software provided in the GCG program package. See, Needleman and Wunsch, 1970. J Mol Biol 48: 443-453. Using GCG GAP software with the following settings for nucleic acid sequence comparison: GAP creation penalty of 5.0 and GAP extension penalty of 0.3, the coding region of the analogous nucleic acid sequences referred to above exhibits a degree of identity preferably of at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, or 99%, with the CDS (encoding) part of the DNA sequence shown in SEQ ID NO:1, 4, or 6.

The term "sequence identity" refers to the degree to which two polynucleotide or polypeptide sequences are identical on a residue-by-residue basis over a particular region of comparison. The term "percentage of sequence identity" is calculated by comparing two optimally aligned sequences over that region of comparison, determining the number of positions at which the identical nucleic acid base (e.g., A, T, C, G, U, or I, in the case of nucleic acids) occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the region of comparison (i.e., the window size), and multiplying the result by 100 to yield the percentage of sequence identity. The term "substantial identity" as used herein denotes a characteristic of a polynucleotide sequence, wherein the polynucleotide comprises a sequence that has at least 80 percent sequence identity, preferably at least 85 percent identity and often 90 to 95 percent sequence identity, more usually at least 99 percent sequence identity as compared to a reference sequence over a comparison region.

Chimeric and Fusion Proteins

The invention also provides NOV chimeric or fusion proteins. As used herein, a NOV "chimeric protein" or "fusion protein" comprises a NOV polypeptide operatively-linked to a non-NOV polypeptide. An "NOV polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a NOV protein (SEQ ID NO:2, 5, or 7), whereas a "non-NOV polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein that is not substantially homologous to the NOV protein, e.g., a protein that is different from the NOV protein and that is derived from the same or a different organism. Within a NOV fusion protein the NOV polypeptide can correspond to all or a portion of a NOV protein. In one embodiment, a NOV fusion protein comprises at least one biologically-active portion of a NOV protein. In another embodiment, a NOV fusion protein comprises at least two biologically-active portions of a NOV protein. In yet another embodiment, a NOV fusion protein comprises at least three biologically-active portions of a NOV protein. Within the fusion protein, the term "operatively-linked" is intended to indicate that the NOV polypeptide

and the non-NOV polypeptide are fused in-frame with one another. The non-NOV polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the NOV polypeptide.

In one embodiment, the fusion protein is a GST-NOV fusion protein in which the NOV sequences are fused to the C-terminus of the GST (glutathione S-transferase) sequences. Such fusion proteins can facilitate the purification of recombinant NOV polypeptides.

In another embodiment, the fusion protein is a NOV protein containing a heterologous signal sequence at its N-terminus. In certain host cells (e.g., mammalian host cells), expression and/or secretion of NOV can be increased through use of a heterologous signal sequence.

In yet another embodiment, the fusion protein is a NOV-immunoglobulin fusion protein in which the NOV sequences are fused to sequences derived from a member of the immunoglobulin protein family. The NOV-immunoglobulin fusion proteins of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions and administered to a subject to inhibit an interaction between a NOV ligand and a NOV protein on the surface of a cell, to thereby suppress NOV-mediated signal transduction in vivo. The NOV-immunoglobulin fusion proteins can be used to affect the bioavailability of a NOV cognate ligand. Inhibition of the NOV ligand/NOV interaction can be useful therapeutically for both the treatment of proliferative and differentiative disorders, as well as modulating (e.g. promoting or inhibiting) cell survival. Moreover, the NOV-immunoglobulin fusion proteins of the invention can be used as immunogens to produce anti-NOV antibodies in a subject, to purify NOV ligands, and in screening assays to identify molecules that inhibit the interaction of NOV with a NOV ligand.

A NOV chimeric or fusion protein of the invention can be produced by standard recombinant DNA techniques. For example, DNA fragments coding for the different polypeptide sequences are ligated together in-frame in accordance with conventional techniques, e.g., by employing blunt-ended or stagger-ended termini for ligation, restriction enzyme digestion to provide for appropriate termini, filling-in of cohesive ends as appropriate, alkaline phosphatase treatment to avoid undesirable joining, and enzymatic ligation. In another embodiment, the fusion gene can be synthesized by conventional techniques including automated DNA synthesizers. Alternatively, PCR amplification of gene fragments can be carried out using anchor primers that give rise to complementary overhangs between two consecutive gene fragments that can subsequently be annealed and reamplified to generate a chimeric gene sequence (see, e.g., Ausubel, et al. (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Moreover, many expression vectors are commercially available that already encode a fusion moiety (e.g., a GST polypeptide). A

NOV-encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the NOV protein.

NOV Agonists and Antagonists

The invention also pertains to variants of the NOV proteins that function as either NOV agonists (i.e., mimetics) or as NOV antagonists. Variants of the NOV protein can be generated by mutagenesis (e.g., discrete point mutation or truncation of the NOV protein). An agonist of the NOV protein can retain substantially the same, or a subset of, the biological activities of the naturally occurring form of the NOV protein. An antagonist of the NOV protein can inhibit one or more of the activities of the naturally occurring form of the NOV protein by, for example, competitively binding to a downstream or upstream member of a cellular signaling cascade which includes the NOV protein. Thus, specific biological effects can be elicited by treatment with a variant of limited function. In one embodiment, treatment of a subject with a variant having a subset of the biological activities of the naturally occurring form of the protein has fewer side effects in a subject relative to treatment with the naturally occurring form of the NOV proteins.

Variants of the NOV proteins that function as either NOV agonists (i.e., mimetics) or as NOV antagonists can be identified by screening combinatorial libraries of mutants (e.g., truncation mutants) of the NOV proteins for NOV protein agonist or antagonist activity. In one embodiment, a variegated library of NOV variants is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level and is encoded by a variegated gene library. A variegated library of NOV variants can be produced by, for example, enzymatically ligating a mixture of synthetic oligonucleotides into gene sequences such that a degenerate set of potential NOV sequences is expressible as individual polypeptides, or alternatively, as a set of larger fusion proteins (e.g., for phage display) containing the set of NOV sequences therein. There are a variety of methods which can be used to produce libraries of potential NOV variants from a degenerate oligonucleotide sequence. Chemical synthesis of a degenerate gene sequence can be performed in an automatic DNA synthesizer, and the synthetic gene then ligated into an appropriate expression vector. Use of a degenerate set of genes allows for the provision, in one mixture, of all of the sequences encoding the desired set of potential NOV sequences. Methods for synthesizing degenerate oligonucleotides are well-known within the art. See, e.g., Narang, 1983. Tetrahedron 39: 3; Itakura, et al., 1984. Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura, et al., 1984. Science 198: 1056; Ike, et al., 1983. Nucl. Acids Res. 11: 477.

Polypeptide Libraries

In addition, libraries of fragments of the NOV protein coding sequences can be used to generate a variegated population of NOV fragments for screening and subsequent selection of variants of a NOV protein. In one embodiment, a library of coding sequence fragments can be generated by treating a double stranded PCR fragment of a NOV coding sequence with a nuclease under conditions wherein nicking occurs only about once per molecule, denaturing the double stranded DNA, renaturing the DNA to form double-stranded DNA that can include sense/antisense pairs from different nicked products, removing single stranded portions from reformed duplexes by treatment with S1 nuclease, and ligating the resulting fragment library into an expression vector. By this method, expression libraries can be derived which encodes N-terminal and internal fragments of various sizes of the NOV proteins.

Various techniques are known in the art for screening gene products of combinatorial libraries made by point mutations or truncation, and for screening cDNA libraries for gene products having a selected property. Such techniques are adaptable for rapid screening of the gene libraries generated by the combinatorial mutagenesis of NOV proteins. The most widely used techniques, which are amenable to high throughput analysis, for screening large gene libraries typically include cloning the gene library into replicable expression vectors, transforming appropriate cells with the resulting library of vectors, and expressing the combinatorial genes under conditions in which detection of a desired activity facilitates isolation of the vector encoding the gene whose product was detected. Recursive ensemble mutagenesis (REM), a new technique that enhances the frequency of functional mutants in the libraries, can be used in combination with the screening assays to identify NOV variants. See, e.g., Arkin and Yourvan, 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7811-7815; Delgrave, et al., 1993. Protein Engineering 6:327-331.

Anti-NOV Antibodies

The invention encompasses antibodies and antibody fragments, such as Fab or $(Fab)_2$, that bind immunospecifically to any of the NOV polypeptides of said invention.

An isolated NOV protein, or a portion or fragment thereof, can be used as an immunogen to generate antibodies that bind to NOV polypeptides using standard techniques for polyclonal and monoclonal antibody preparation. The full-length NOV proteins can be used or, alternatively, the invention provides antigenic peptide fragments of NOV proteins for use as immunogens. The antigenic NOV peptides comprises at least 4 amino acid residues of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, 5, or 7, and encompasses an epitope of NOV such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with NOV. Preferably, the antigenic peptide comprises at least 6, 8, 10, 15, 20, or 30 amino acid residues.

Longer antigenic peptides are sometimes preferable over shorter antigenic peptides, depending on use and according to methods well known to someone skilled in the art.

In certain embodiments of the invention, at least one epitope encompassed by the antigenic peptide is a region of NOV that is located on the surface of the protein (e.g., a hydrophilic region). As a means for targeting antibody production, hydropathy plots showing regions of hydrophilicity and hydrophobicity can be generated by any method well known in the art, including, for example, the Kyte Doolittle or the Hopp Woods methods, either with or without Fourier transformation (see, e.g., Hopp and Woods, 1981. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828; Kyte and Doolittle, 1982. J. Mol. Biol. 157: 105-142, each incorporated herein by reference in their entirety).

As disclosed herein, NOV protein sequences of SEQ ID NO:2, 5, 7, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof, can be utilized as immunogens in the generation of antibodies that immunospecifically-bind these protein components. The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically-active portions of immunoglobulin molecules, i.e., molecules that contain an antigen binding site that specifically-binds (immunoreacts with) an antigen, such as NOV. Such antibodies include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab and $F(ab')_2$ fragments, and an Fab expression library. In a specific embodiment, antibodies to human NOV proteins are disclosed. Various procedures known within the art can be used for the production of polyclonal or monoclonal antibodies to a NOV protein sequence of SEQ ID NO: 2, 5, 7, or a derivative, fragment, analog or homolog thereof. Some of these proteins are discussed below.

For the production of polyclonal antibodies, various suitable host animals (e.g., rabbit, goat, mouse or other mammal) can be immunized by injection with the native protein, or a synthetic variant thereof, or a derivative of the foregoing. An appropriate immunogenic preparation can contain, for example, recombinantly-expressed NOV protein or a chemically-synthesized NOV polypeptide. The preparation can further include an adjuvant. Various adjuvants used to increase the immunological response include, but are not limited to, Freund's (complete and incomplete), mineral gels (e.g., aluminum hydroxide), surface active substances (e.g., lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, dinitrophenol, etc.), human adjuvants such as Bacille Calmette-Guerin and Corynebacterium parvum, or similar immunostimulatory agents. If desired, the antibody molecules directed against NOV can be isolated from the mammal (e.g., from the blood) and further purified by well known techniques, such as protein A chromatography to obtain the IgG fraction.

The term "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition", as used herein, refers to a population of antibody molecules that contain only one species of an antigen binding site capable of immunoreacting with a particular epitope of NOV. A monoclonal antibody composition thus typically displays a single binding affinity for a particular NOV protein with which it immunoreacts. For preparation of monoclonal antibodies directed towards a particular NOV protein, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof, any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell line culture can be utilized. Such techniques include, but are not limited to, the hybridoma technique (see, e.g., Kohler & Milstein, 1975. Nature 256: 495-497); the trioma technique; the human B-cell hybridoma technique (see, e.g., Kozbor, et al., 1983. Immunol. Today 4: 72) and the EBV hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (see, e.g., Cole, et al., 1985. In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Human monoclonal antibodies can be utilized in the practice of the invention and can be produced by using human hybridomas (see, e.g., Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) or by transforming human B-cells with Epstein Barr Virus in vitro (see, e.g., Cole, et al., 1985. In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Each of the above citations is incorporated herein by reference in their entirety.

According to the invention, techniques can be adapted for the production of single-chain antibodies specific to a NOV protein (see, e.g., U.S. Patent No. 4,946,778). In addition, methods can be adapted for the construction of Fab expression libraries (see, e.g., Huse, et al., 1989. Science 246: 1275-1281) to allow rapid and effective identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for a NOV protein or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. Non-human antibodies can be "humanized" by techniques well known in the art. See, e.g., U.S. Patent No. 5,225,539. Antibody fragments that contain the idiotypes to a NOV protein can be produced by techniques known in the art including, but not limited to: (i) an $F(ab')_2$ fragment produced by pepsin digestion of an antibody molecule; (ii) an Fab fragment generated by reducing the disulfide bridges of an $F(ab')_2$ fragment; (iii) an Fab fragment generated by the treatment of the antibody molecule with papain and a reducing agent; and (iv) Fv fragments.

Additionally, recombinant anti-NOV antibodies, such as chimeric and humanized monoclonal antibodies, comprising both human and non-human portions, which can be made using standard recombinant DNA techniques, are within the scope of the invention. Such chimeric and humanized monoclonal antibodies can be produced by recombinant DNA

techniques known in the art, for example using methods described in International Application No. PCT/US86/02269; European Patent Application No. 184,187; European Patent Application No. 171,496; European Patent Application No. 173,494; PCT International Publication No. WO 86/01533; U.S. Patent No. 4,816,567; U.S. Pat. No. 5,225,539; European Patent Application No. 125,023; Better, et al., 1988. Science 240: 1041-1043; Liu, et al., 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Liu, et al., 1987. J. Immunol. 139: 3521-3526; Sun, et al., 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218; Nishimura, et al., 1987. Cancer Res. 47: 999-1005; Wood, et al., 1985. Nature 314 :446-449; Shaw, et al., 1988. J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559); Morrison(1985) Science 229:1202-1207; Oi, et al. (1986) BioTechniques 4:214; Jones, et al., 1986. Nature 321: 552-525; Verhoeyan, et al., 1988. Science 239: 1534; and Beidler, et al., 1988. J. Immunol. 141: 4053-4060. Each of the above citations are incorporated herein by reference in their entirety.

In one embodiment, methods for the screening of antibodies that possess the desired specificity include, but are not limited to, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and other immunologically-mediated techniques known within the art. In a specific embodiment, selection of antibodies that are specific to a particular domain of a NOV protein is facilitated by generation of hybridomas that bind to the fragment of a NOV protein possessing such a domain. Thus, antibodies that are specific for a desired domain within a NOV protein, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof, are also provided herein.

Anti-NOV antibodies can be used in methods known within the art relating to the localization and/or quantitation of a NOV protein (e.g., for use in measuring levels of the NOV protein within appropriate physiological samples, for use in diagnostic methods, for use in imaging the protein, and the like). In a given embodiment, antibodies for NOV proteins, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof, that contain the antibody derived binding domain, are utilized as pharmacologically-active compounds (hereinafter "Therapeutics"). An anti-NOV antibody (e.g., monoclonal antibody) can be used to isolate a NOV polypeptide by standard techniques, such as affinity chromatography or immunoprecipitation. An anti-NOV antibody can facilitate the purification of natural NOV polypeptide from cells and of recombinantly-produced NOV polypeptide expressed in host cells. Moreover, an anti-NOV antibody can be used to detect NOV protein (e.g., in a cellular lysate or cell supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the NOV protein. Anti-NOV antibodies can be used diagnostically to monitor protein levels in tissue as part of a clinical testing procedure, e.g., to, for example, determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling (i.e., physically linking) the antibody to a detectable

substance. Examples of detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, beta-galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin, and examples of suitable radioactive material include ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S or ^{3}H.

NOV Recombinant Expression Vectors and Host Cells

Another aspect of the invention pertains to vectors, preferably expression vectors, containing a nucleic acid encoding a NOV protein, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. As used herein, the term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments can be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments can be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) are integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively-linked. Such vectors are referred to herein as "expression vectors". In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" can be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (e.g., replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

The recombinant expression vectors of the invention comprise a nucleic acid of the invention in a form suitable for expression of the nucleic acid in a host cell, which means that the recombinant expression vectors include one or more regulatory sequences, selected on the basis of the host cells to be used for expression, that is operatively-linked to the nucleic acid sequence to be expressed. Within a recombinant expression vector, "operably-linked" is

intended to mean that the nucleotide sequence of interest is linked to the regulatory sequence(s) in a manner that allows for expression of the nucleotide sequence (e.g., in an in vitro transcription/translation system or in a host cell when the vector is introduced into the host cell).

The term "regulatory sequence" is intended to includes promoters, enhancers and other expression control elements (e.g., polyadenylation signals). Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Regulatory sequences include those that direct constitutive expression of a nucleotide sequence in many types of host cell and those that direct expression of the nucleotide sequence only in certain host cells (e.g., tissue-specific regulatory sequences). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector can depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, etc. The expression vectors of the invention can be introduced into host cells to thereby produce proteins or peptides, including fusion proteins or peptides, encoded by nucleic acids as described herein (e.g., NOV proteins, mutant forms of NOV proteins, fusion proteins, etc.).

The recombinant expression vectors of the invention can be designed for expression of NOV proteins in prokaryotic or eukaryotic cells. For example, NOV proteins can be expressed in bacterial cells such as Escherichia coli, insect cells (using baculovirus expression vectors) yeast cells or mammalian cells. Suitable host cells are discussed further in Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Alternatively, the recombinant expression vector can be transcribed and translated in vitro, for example using T7 promoter regulatory sequences and T7 polymerase.

Expression of proteins in prokaryotes is most often carried out in Escherichia coli with vectors containing constitutive or inducible promoters directing the expression of either fusion or non-fusion proteins. Fusion vectors add a number of amino acids to a protein encoded therein, usually to the amino terminus of the recombinant protein. Such fusion vectors typically serve three purposes: (i) to increase expression of recombinant protein; (ii) to increase the solubility of the recombinant protein; and (iii) to aid in the purification of the recombinant protein by acting as a ligand in affinity purification. Often, in fusion expression vectors, a proteolytic cleavage site is introduced at the junction of the fusion moiety and the recombinant protein to enable separation of the recombinant protein from the fusion moiety subsequent to purification of the fusion protein. Such enzymes, and their cognate recognition sequences, include Factor

Xa, thrombin and enterokinase. Typical fusion expression vectors include pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 1988. Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) that fuse glutathione S-transferase (GST), maltose E binding protein, or protein A, respectively, to the target recombinant protein. Examples of suitable inducible non-fusion E. coli expression vectors include pTrc (Amrann et al., (1988) Gene 69:301-315) and pET 11d (Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89).

One strategy to maximize recombinant protein expression in E. coli is to express the protein in a host bacteria with an impaired capacity to proteolytically cleave the recombinant protein. See, e.g., Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128. Another strategy is to alter the nucleic acid sequence of the nucleic acid to be inserted into an expression vector so that the individual codons for each amino acid are those preferentially utilized in E. coli (see, e.g., Wada, et al., 1992. Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118). Such alteration of nucleic acid sequences of the invention can be carried out by standard DNA synthesis techniques.

In another embodiment, the NOV expression vector is a yeast expression vector. Examples of vectors for expression in yeast Saccharomyces cerivisae include pYepSec1 (Baldari, et al., 1987. EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, 1982. Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al., 1987. Gene 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), and picZ (InVitrogen Corp, San Diego, Calif.). Alternatively, NOV can be expressed in insect cells using baculovirus expression vectors. Baculovirus vectors available for expression of proteins in cultured insect cells (e.g., SF9 cells) include the pAc series (Smith, et al., 1983. Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165) and the pVL series (Lucklow and Summers, 1989. Virology 170: 31-39).

In yet another embodiment, a nucleic acid of the invention is expressed in mammalian cells using a mammalian expression vector. Examples of mammalian expression vectors include pCDM8 (Seed, 1987. Nature 329: 840) and pMT2PC (Kaufman, et al., 1987. EMBO J. 6: 187-195). When used in mammalian cells, the expression vector's control functions are often provided by viral regulatory elements. For example, commonly used promoters are derived from polyoma, adenovirus 2, cytomegalovirus, and simian virus 40. For other suitable expression systems for both prokaryotic and eukaryotic cells see, e.g., Chapters 16 and 17 of Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold

Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

In another embodiment, the recombinant mammalian expression vector is capable of directing expression of the nucleic acid preferentially in a particular cell type (e.g., tissue-specific regulatory elements are used to express the nucleic acid). Tissue-specific regulatory elements are known in the art. Non-limiting examples of suitable tissue-specific promoters include the albumin promoter (liver-specific; Pinkert, et al., 1987. Genes Dev. 1: 268-277), lymphoid-specific promoters (Calame and Eaton, 1988. Adv. Immunol. 43: 235-275), in particular promoters of T cell receptors (Winoto and Baltimore, 1989. EMBO J. 8: 729-733) and immunoglobulins (Banerji, et al., 1983. Cell 33: 729-740; Queen and Baltimore, 1983. Cell 33: 741-748), neuron-specific promoters (e.g., the neurofilament promoter; Byrne and Ruddle, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477), pancreas-specific promoters (Edlund, et al., 1985. Science 230: 912-916), and mammary gland-specific promoters (e.g., milk whey promoter; U.S. Pat. No. 4,873,316 and European Application Publication No. 264,166). Developmentally-regulated promoters are also encompassed, e.g., the murine hox promoters (Kessel and Gruss, 1990. Science 249: 374-379) and the α-fetoprotein promoter (Campes and Tilghman, 1989. Genes Dev. 3: 537-546).

The invention further provides a recombinant expression vector comprising a DNA molecule of the invention cloned into the expression vector in an antisense orientation. That is, the DNA molecule is operatively-linked to a regulatory sequence in a manner that allows for expression (by transcription of the DNA molecule) of an RNA molecule that is antisense to NOV mRNA. Regulatory sequences operatively linked to a nucleic acid cloned in the antisense orientation can be chosen that direct the continuous expression of the antisense RNA molecule in a variety of cell types, for instance viral promoters and/or enhancers, or regulatory sequences can be chosen that direct constitutive, tissue specific or cell type specific expression of antisense RNA. The antisense expression vector can be in the form of a recombinant plasmid, phagemid or attenuated virus in which antisense nucleic acids are produced under the control of a high efficiency regulatory region, the activity of which can be determined by the cell type into which the vector is introduced. For a discussion of the regulation of gene expression using antisense genes see, e.g., Weintraub, et al., "Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis," Reviews-Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986.

Another aspect of the invention pertains to host cells into which a recombinant expression vector of the invention has been introduced. The terms "host cell" and "recombinant host cell" are used interchangeably herein. It is understood that such terms refer

not only to the particular subject cell but also to the progeny or potential progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term as used herein.

A host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell. For example, NOV protein can be expressed in bacterial cells such as E. coli, insect cells, yeast or mammalian cells (such as Chinese hamster ovary cells (CHO) or COS cells). Other suitable host cells are known to those skilled in the art.

Vector DNA can be introduced into prokaryotic or eukaryotic cells via conventional transformation or transfection techniques. As used herein, the terms "transformation" and "transfection" are intended to refer to a variety of art-recognized techniques for introducing foreign nucleic acid (e.g., DNA) into a host cell, including calcium phosphate or calcium chloride co-precipitation, DEAE-dextran-mediated transfection, lipofection, or electroporation. Suitable methods for transforming or transfecting host cells can be found in Sambrook, et al. (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), and other laboratory manuals.

For stable transfection of mammalian cells, it is known that, depending upon the expression vector and transfection technique used, only a small fraction of cells may integrate the foreign DNA into their genome. In order to identify and select these integrants, a gene that encodes a selectable marker (e.g., resistance to antibiotics) is generally introduced into the host cells along with the gene of interest. Various selectable markers include those that confer resistance to drugs, such as G418, hygromycin and methotrexate. Nucleic acid encoding a selectable marker can be introduced into a host cell on the same vector as that encoding NOV or can be introduced on a separate vector. Cells stably transfected with the introduced nucleic acid can be identified by drug selection (e.g., cells that have incorporated the selectable marker gene will survive, while the other cells die).

A host cell of the invention, such as a prokaryotic or eukaryotic host cell in culture, can be used to produce (i.e., express) NOV protein. Accordingly, the invention further provides methods for producing NOV protein using the host cells of the invention. In one embodiment, the method comprises culturing the host cell of invention (into which a recombinant expression vector encoding NOV protein has been introduced) in a suitable medium such that NOV protein is produced. In another embodiment, the method further comprises isolating NOV protein from the medium or the host cell.

Transgenic NOV Animals

The host cells of the invention can also be used to produce non-human transgenic animals. For example, in one embodiment, a host cell of the invention is a fertilized oocyte or an embryonic stem cell into which NOV protein-coding sequences have been introduced. Such host cells can then be used to create non-human transgenic animals in which exogenous NOV sequences have been introduced into their genome or homologous recombinant animals in which endogenous NOV sequences have been altered. Such animals are useful for studying the function and/or activity of NOV protein and for identifying and/or evaluating modulators of NOV protein activity. As used herein, a "transgenic animal" is a non-human animal, preferably a mammal, more preferably a rodent such as a rat or mouse, in which one or more of the cells of the animal includes a transgene. Other examples of transgenic animals include non-human primates, sheep, dogs, cows, goats, chickens, amphibians, etc. A transgene is exogenous DNA that is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops and that remains in the genome of the mature animal, thereby directing the expression of an encoded gene product in one or more cell types or tissues of the transgenic animal. As used herein, a "homologous recombinant animal" is a non-human animal, preferably a mammal, more preferably a mouse, in which an endogenous NOV gene has been altered by homologous recombination between the endogenous gene and an exogenous DNA molecule introduced into a cell of the animal, e.g., an embryonic cell of the animal, prior to development of the animal.

A transgenic animal of the invention can be created by introducing NOV-encoding nucleic acid into the male pronuclei of a fertilized oocyte (e.g., by microinjection, retroviral infection) and allowing the oocyte to develop in a pseudopregnant female foster animal. The human NOV cDNA sequences of SEQ ID NO:1, 4, or 6, can be introduced as a transgene into the genome of a non-human animal. Alternatively, a non-human homologue of the human NOV gene, such as a mouse NOV gene, can be isolated based on hybridization to the human NOV cDNA (described further supra) and used as a transgene. Intronic sequences and polyadenylation signals can also be included in the transgene to increase the efficiency of expression of the transgene. A tissue-specific regulatory sequence(s) can be operably-linked to the NOV transgene to direct expression of NOV protein to particular cells. Methods for generating transgenic animals via embryo manipulation and microinjection, particularly animals such as mice, have become conventional in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,736,866; 4,870,009; and 4,873,191; and Hogan, 1986. In: MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

Spring Harbor, N.Y. Similar methods are used for production of other transgenic animals. A transgenic founder animal can be identified based upon the presence of the NOV transgene in its genome and/or expression of NOV mRNA in tissues or cells of the animals. A transgenic founder animal can then be used to breed additional animals carrying the transgene. Moreover, transgenic animals carrying a transgene-encoding NOV protein can further be bred to other transgenic animals carrying other transgenes.

To create a homologous recombinant animal, a vector is prepared which contains at least a portion of a NOV gene into which a deletion, addition or substitution has been introduced to thereby alter, e.g., functionally disrupt, the NOV gene. The NOV gene can be a human gene (e.g., the cDNA of SEQ ID NO:1, 4, or 6), but more preferably, is a non-human homologue of a human NOV gene. For example, a mouse homologue of human NOV gene of SEQ ID NO:1, 4, or 6, can be used to construct a homologous recombination vector suitable for altering an endogenous NOV gene in the mouse genome. In one embodiment, the vector is designed such that, upon homologous recombination, the endogenous NOV gene is functionally disrupted (i.e., no longer encodes a functional protein; also referred to as a "knock out" vector).

Alternatively, the vector can be designed such that, upon homologous recombination, the endogenous NOV gene is mutated or otherwise altered but still encodes functional protein (e.g., the upstream regulatory region can be altered to thereby alter the expression of the endogenous NOV protein). In the homologous recombination vector, the altered portion of the NOV gene is flanked at its 5'- and 3'-termini by additional nucleic acid of the NOV gene to allow for homologous recombination to occur between the exogenous NOV gene carried by the vector and an endogenous NOV gene in an embryonic stem cell. The additional flanking NOV nucleic acid is of sufficient length for successful homologous recombination with the endogenous gene. Typically, several kilobases of flanking DNA (both at the 5'- and 3'-termini) are included in the vector. See, e.g., Thomas, et al., 1987. Cell 51: 503 for a description of homologous recombination vectors. The vector is then introduced into an embryonic stem cell line (e.g., by electroporation) and cells in which the introduced NOV gene has homologously-recombined with the endogenous NOV gene are selected. See, e.g., Li, et al., 1992. Cell 69: 915.

The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (e.g., a mouse) to form aggregation chimeras. See, e.g., Bradley, 1987. In: TERATOCARCINOMAS AND EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH, Robertson, ed. IRL, Oxford, pp. 113-152. A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female

foster animal and the embryo brought to term. Progeny harboring the homologously-recombined DNA in their germ cells can be used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously-recombined DNA by germline transmission of the transgene. Methods for constructing homologous recombination vectors and homologous recombinant animals are described further in Bradley, 1991. Curr. Opin. Biotechnol. 2: 823-829; PCT International Publication Nos.: WO 90/11354; WO 91/01140; WO 92/0968; and WO 93/04169.

In another embodiment, transgenic non-humans animals can be produced that contain selected systems that allow for regulated expression of the transgene. One example of such a system is the cre/loxP recombinase system of bacteriophage P1. For a description of the cre/loxP recombinase system, See, e.g., Lakso, et al., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236. Another example of a recombinase system is the FLP recombinase system of Saccharomyces cerevisiae. See, O'Gorman, et al., 1991. Science 251:1351-1355. If a cre/loxP recombinase system is used to regulate expression of the transgene, animals containing transgenes encoding both the Cre recombinase and a selected protein are required. Such animals can be provided through the construction of "double" transgenic animals, e.g., by mating two transgenic animals, one containing a transgene encoding a selected protein and the other containing a transgene encoding a recombinase.

Clones of the non-human transgenic animals described herein can also be produced according to the methods described in Wilmut, et al., 1997. Nature 385: 810-813. In brief, a cell (e.g., a somatic cell) from the transgenic animal can be isolated and induced to exit the growth cycle and enter G0 phase. The quiescent cell can then be fused, e.g., through the use of electrical pulses, to an enucleated oocyte from an animal of the same species from which the quiescent cell is isolated. The reconstructed oocyte is then cultured such that it develops to morula or blastocyte and then transferred to pseudopregnant female foster animal. The offspring borne of this female foster animal will be a clone of the animal from which the cell (e.g., the somatic cell) is isolated.

Pharmaceutical Compositions

The NOV nucleic acid molecules, NOV proteins, and anti-NOV antibodies (also referred to herein as "active compounds") of the invention, and derivatives, fragments, analogs and homologs thereof, can be incorporated into pharmaceutical compositions suitable for administration. Such compositions typically comprise the nucleic acid molecule, protein, or antibody and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings,

antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. Suitable carriers are described in the most recent edition of Remington's Pharmaceutical Sciences, a standard reference text in the field, which is incorporated herein by reference. Preferred examples of such carriers or diluents include, but are not limited to, water, saline, finger's solutions, dextrose solution, and 5% human serum albumin. Liposomes and non-aqueous vehicles such as fixed oils may also be used. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the compositions is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

A pharmaceutical composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral, e.g., intravenous, intradermal, subcutaneous, oral (e.g., inhalation), transdermal (i.e., topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); buffers such as acetates, citrates or phosphates, and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. The pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy syringeability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by

the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can be achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as manitol, sorbitol, sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound (e.g., a NOV protein or anti-NOV antibody) in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying that yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. They can be enclosed in gelatin capsules or compressed into tablets. For the purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules. Oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash, wherein the compound in the fluid carrier is applied orally and swished and expectorated or swallowed. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient such as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, Primogel, or corn starch; a lubricant such as magnesium stearate or Sterotes; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring.

For administration by inhalation, the compounds are delivered in the form of an aerosol spray from pressured container or dispenser which contains a suitable propellant, e.g., a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer.

Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example, for transmucosal administration, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Transmucosal administration can be accomplished through the use of nasal sprays or suppositories. For transdermal administration, the active compounds are formulated into ointments, salves, gels, or creams as generally known in the art.

The compounds can also be prepared in the form of suppositories (e.g., with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

In one embodiment, the active compounds are prepared with carriers that will protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art. The materials can also be obtained commercially from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells with monoclonal antibodies to viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, for example, as described in U.S. Patent No. 4,522,811.

It is especially advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved, and the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of individuals.

The nucleic acid molecules of the invention can be inserted into vectors and used as gene therapy vectors. Gene therapy vectors can be delivered to a subject by, for example, intravenous injection, local administration (see, e.g., U.S. Patent No. 5,328,470) or by stereotactic injection (see, e.g., Chen, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054-3057).

The pharmaceutical preparation of the gene therapy vector can include the gene therapy vector in an acceptable diluent, or can comprise a slow release matrix in which the gene delivery vehicle is imbedded. Alternatively, where the complete gene delivery vector can be produced intact from recombinant cells, e.g., retroviral vectors, the pharmaceutical preparation can include one or more cells that produce the gene delivery system. The pharmaceutical compositions can be included in a container, pack, or dispenser together with instructions for administration.

Screening and Detection Methods

The isolated nucleic acid molecules of the invention can be used to express NOV protein (e.g., via a recombinant expression vector in a host cell in gene therapy applications), to detect NOV mRNA (e.g., in a biological sample) or a genetic lesion in a NOV gene, and to modulate NOV activity, as described further, below. In addition, the NOV proteins can be used to screen drugs or compounds that modulate the NOV protein activity or expression as well as to treat disorders characterized by insufficient or excessive production of NOV protein or production of NOV protein forms that have decreased or aberrant activity compared to NOV wild-type protein. In addition, the anti-NOV antibodies of the invention can be used to detect and isolate NOV proteins and modulate NOV activity.

The invention further pertains to novel agents identified by the screening assays described herein and uses thereof for treatments as described, supra.

Screening Assays

The invention provides a method (also referred to herein as a "screening assay") for identifying modulators, i.e., candidate or test compounds or agents (e.g., peptides, peptidomimetics, small molecules or other drugs) that bind to NOV proteins or have a stimulatory or inhibitory effect on, e.g., NOV protein expression or NOV protein activity. The invention also includes compounds identified in the screening assays described herein.

In one embodiment, the invention provides assays for screening candidate or test compounds which bind to or modulate the activity of the membrane-bound form of a NOV protein or polypeptide or biologically-active portion thereof. The test compounds of the invention can be obtained using any of the numerous approaches in combinatorial library methods known in the art, including: biological libraries; spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries; synthetic library methods requiring deconvolution; the "one-bead one-compound" library method; and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library approach is limited to peptide libraries, while the other four approaches are

applicable to peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds. See, e.g., Lam, 1997. Anticancer Drug Design 12: 145.

A "small molecule" as used herein, is meant to refer to a composition that has a molecular weight of less than about 5 kD and most preferably less than about 4 kD. Small molecules can be, e.g., nucleic acids, peptides, polypeptides, peptidomimetics, carbohydrates, lipids or other organic or inorganic molecules. Libraries of chemical and/or biological mixtures, such as fungal, bacterial, or algal extracts, are known in the art and can be screened with any of the assays of the invention.

Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in the art, for example in: DeWitt, et al., 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909; Erb, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 11422; Zuckermann, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 2678; Cho, et al., 1993. Science 261: 1303; Carrell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; and Gallop, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 1233.

Libraries of compounds can be presented in solution (e.g., Houghten, 1992. Biotechniques 13: 412-421), or on beads (Lam, 1991. Nature 354: 82-84), on chips (Fodor, 1993. Nature 364: 555-556), bacteria (Ladner, U.S. Patent No. 5,223,409), spores (Ladner, U.S. Patent 5,233,409), plasmids (Cull, et al., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869) or on phage (Scott and Smith, 1990. Science 249: 386-390; Devlin, 1990. Science 249: 404-406; Cwirla, et al., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 6378-6382; Felici, 1991. J. Mol. Biol. 222: 301-310; Ladner, U.S. Patent No. 5,233,409.).

In one embodiment, an assay is a cell-based assay in which a cell which expresses a membrane-bound form of NOV protein, or a biologically-active portion thereof, on the cell surface is contacted with a test compound and the ability of the test compound to bind to a NOV protein determined. The cell, for example, can of mammalian origin or a yeast cell. Determining the ability of the test compound to bind to the NOV protein can be accomplished, for example, by coupling the test compound with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the test compound to the NOV protein or biologically-active portion thereof can be determined by detecting the labeled compound in a complex. For example, test compounds can be labeled with ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, or ^{3}H, either directly or indirectly, and the radioisotope detected by direct counting of radioemission or by scintillation counting. Alternatively, test compounds can be enzymatically-labeled with, for example, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase, and the enzymatic label detected by determination of conversion of an appropriate substrate to product. In one embodiment, the assay comprises contacting a cell

which expresses a membrane-bound form of NOV protein, or a biologically-active portion thereof, on the cell surface with a known compound which binds NOV to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with a NOV protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with a NOV protein comprises determining the ability of the test compound to preferentially bind to NOV protein or a biologically-active portion thereof as compared to the known compound.

In another embodiment, an assay is a cell-based assay comprising contacting a cell expressing a membrane-bound form of NOV protein, or a biologically-active portion thereof, on the cell surface with a test compound and determining the ability of the test compound to modulate (e.g., stimulate or inhibit) the activity of the NOV protein or biologically-active portion thereof.

Determining the ability of the test compound to modulate the activity of NOV or a biologically-active portion thereof can be accomplished, for example, by determining the ability of the NOV protein to bind to or interact with a NOV target molecule. As used herein, a "target molecule" is a molecule with which a NOV protein binds or interacts in nature, for example, a molecule on the surface of a cell which expresses a NOV interacting protein, a molecule on the surface of a second cell, a molecule in the extracellular milieu, a molecule associated with the internal surface of a cell membrane or a cytoplasmic molecule. A NOV target molecule can be a non-NOV molecule or a NOV protein or polypeptide of the invention . In one embodiment, a NOV target molecule is a component of a signal transduction pathway that facilitates transduction of an extracellular signal (e.g. a signal generated by binding of a compound to a membrane-bound NOV molecule) through the cell membrane and into the cell. The target, for example, can be a second intercellular protein that has catalytic activity or a protein that facilitates the association of downstream signaling molecules with NOV.

Determining the ability of the NOV protein to bind to or interact with a NOV target molecule can be accomplished by one of the methods described above for determining direct binding. In one embodiment, determining the ability of the NOV protein to bind to or interact with a NOV target molecule can be accomplished by determining the activity of the target molecule. For example, the activity of the target molecule can be determined by detecting induction of a cellular second messenger of the target (i.e. intracellular Ca^{2+}, diacylglycerol, IP3, etc.), detecting catalytic/enzymatic activity of the target an appropriate substrate, detecting the induction of a reporter gene (comprising a NOV-responsive regulatory element

operatively linked to a nucleic acid encoding a detectable marker, e.g., luciferase), or detecting a cellular response, for example, cell survival, cellular differentiation, or cell proliferation.

In yet another embodiment, an assay of the invention is a cell-free assay comprising contacting a NOV protein or biologically-active portion thereof with a test compound and determining the ability of the test compound to bind to the NOV protein or biologically-active portion thereof. Binding of the test compound to the NOV protein can be determined either directly or indirectly as described above. In one such embodiment, the assay comprises contacting the NOV protein or biologically-active portion thereof with a known compound which binds NOV to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with a NOV protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with a NOV protein comprises determining the ability of the test compound to preferentially bind to NOV or biologically-active portion thereof as compared to the known compound.

In still another embodiment, an assay is a cell-free assay comprising contacting NOV protein or biologically-active portion thereof with a test compound and determining the ability of the test compound to modulate (e.g. stimulate or inhibit) the activity of the NOV protein or biologically-active portion thereof. Determining the ability of the test compound to modulate the activity of NOV can be accomplished, for example, by determining the ability of the NOV protein to bind to a NOV target molecule by one of the methods described above for determining direct binding. In an alternative embodiment, determining the ability of the test compound to modulate the activity of NOV protein can be accomplished by determining the ability of the NOV protein to further modulate a NOV target molecule. For example, the catalytic/enzymatic activity of the target molecule on an appropriate substrate can be determined as described, supra.

In yet another embodiment, the cell-free assay comprises contacting the NOV protein or biologically-active portion thereof with a known compound which binds NOV protein to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with a NOV protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with a NOV protein comprises determining the ability of the NOV protein to preferentially bind to or modulate the activity of a NOV target molecule.

The cell-free assays of the invention are amenable to use of both the soluble form or the membrane-bound form of NOV protein. In the case of cell-free assays comprising the membrane-bound form of NOV protein, it can be desirable to utilize a solubilizing agent such

that the membrane-bound form of NOV protein is maintained in solution. Examples of such solubilizing agents include non-ionic detergents such as n-octylglucoside, n-dodecylglucoside, n-dodecylmaltoside, octanoyl-N-methylglucamide, decanoyl-N-methylglucamide, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecypoly(ethylene glycol ether)n, N-dodecyl--N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane sulfonate, 3-(3-cholamidopropyl) dimethylamminiol-1-propane sulfonate (CHAPS), or 3-(3-cholamidopropyl)dimethylamminiol-2-hydroxy-1-propane sulfonate (CHAPSO).

In more than one embodiment of the above assay methods of the invention, it can be desirable to immobilize either NOV protein or its target molecule to facilitate separation of complexed from uncomplexed forms of one or both of the proteins, as well as to accommodate automation of the assay. Binding of a test compound to NOV protein, or interaction of NOV protein with a target molecule in the presence and absence of a candidate compound, can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples of such vessels include microtiter plates, test tubes, and micro-centrifuge tubes. In one embodiment, a fusion protein can be provided that adds a domain that allows one or both of the proteins to be bound to a matrix. For example, GST-NOV fusion proteins or GST-target fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, MO) or glutathione derivatized microtiter plates, that are then combined with the test compound or the test compound and either the non-adsorbed target protein or NOV protein, and the mixture is incubated under conditions conducive to complex formation (e.g., at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtiter plate wells are washed to remove any unbound components, the matrix immobilized in the case of beads, complex determined either directly or indirectly, for example, as described, supra. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, and the level of NOV protein binding or activity determined using standard techniques.

Other techniques for immobilizing proteins on matrices can also be used in the screening assays of the invention. For example, either the NOV protein or its target molecule can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated NOV protein or target molecules can be prepared from biotin-NHS (N-hydroxy-succinimide) using techniques well-known within the art (e.g., biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies reactive with NOV protein or target molecules, but which do not interfere with binding of the NOV protein to its target molecule, can be derivatized to the wells of the plate, and unbound target or NOV protein trapped in the wells by antibody

conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies reactive with the NOV protein or target molecule, as well as enzyme-linked assays that rely on detecting an enzymatic activity associated with the NOV protein or target molecule.

In another embodiment, modulators of NOV protein expression are identified in a method wherein a cell is contacted with a candidate compound and the expression of NOV mRNA or protein in the cell is determined. The level of expression of NOV mRNA or protein in the presence of the candidate compound is compared to the level of expression of NOV mRNA or protein in the absence of the candidate compound. The candidate compound can then be identified as a modulator of NOV mRNA or protein expression based upon this comparison. For example, when expression of NOV mRNA or protein is greater (i.e., statistically significantly greater) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as a stimulator of NOV mRNA or protein expression. Alternatively, when expression of NOV mRNA or protein is less (statistically significantly less) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as an inhibitor of NOV mRNA or protein expression. The level of NOV mRNA or protein expression in the cells can be determined by methods described herein for detecting NOV mRNA or protein.

In yet another aspect of the invention, the NOV proteins can be used as "bait proteins" in a two-hybrid assay or three hybrid assay (see, e.g., U.S. Patent No. 5,283,317; Zervos, et al., 1993. Cell 72: 223-232; Madura, et al., 1993. J. Biol. Chem. 268: 12046-12054; Bartel, et al., 1993. Biotechniques 14: 920-924; Iwabuchi, et al., 1993. Oncogene 8: 1693-1696; and Brent WO 94/10300), to identify other proteins that bind to or interact with NOV ("NOV-binding proteins" or "NOV-bp") and modulate NOV activity. Such NOV-binding proteins are also likely to be involved in the propagation of signals by the NOV proteins as, for example, upstream or downstream elements of the NOV pathway.

The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the assay utilizes two different DNA constructs. In one construct, the gene that codes for NOV is fused to a gene encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (e.g., GAL-4). In the other construct, a DNA sequence, from a library of DNA sequences, that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") is fused to a gene that codes for the activation domain of the known transcription factor. If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact, in vivo, forming a NOV-dependent complex, the DNA-binding and activation domains of the

transcription factor are brought into close proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene (e.g., LacZ) that is operably linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be detected and cell colonies containing the functional transcription factor can be isolated and used to obtain the cloned gene that encodes the protein which interacts with NOV.

The invention further pertains to novel agents identified by the aforementioned screening assays and uses thereof for treatments as described herein.

Detection Assays

Portions or fragments of the cDNA sequences identified herein (and the corresponding complete gene sequences) can be used in numerous ways as polynucleotide reagents. By way of example, and not of limitation, these sequences can be used to: (i) map their respective genes on a chromosome; and, thus, locate gene regions associated with genetic disease; (ii) identify an individual from a minute biological sample (tissue typing); and (iii) aid in forensic identification of a biological sample. Some of these applications are described in the subsections, below.

Chromosome Mapping

Once the sequence (or a portion of the sequence) of a gene has been isolated, this sequence can be used to map the location of the gene on a chromosome. This process is called chromosome mapping. Accordingly, portions or fragments of the NOV sequences, SEQ ID NO: 1, 4, or 6, or fragments or derivatives thereof, can be used to map the location of the NOV genes, respectively, on a chromosome. The mapping of the NOV sequences to chromosomes is an important first step in correlating these sequences with genes associated with disease.

Briefly, NOV genes can be mapped to chromosomes by preparing PCR primers (preferably 15-25 bp in length) from the NOV sequences. Computer analysis of the NOV, sequences can be used to rapidly select primers that do not span more than one exon in the genomic DNA, thus complicating the amplification process. These primers can then be used for PCR screening of somatic cell hybrids containing individual human chromosomes. Only those hybrids containing the human gene corresponding to the NOV sequences will yield an amplified fragment.

Somatic cell hybrids are prepared by fusing somatic cells from different mammals (e.g., human and mouse cells). As hybrids of human and mouse cells grow and divide, they gradually lose human chromosomes in random order, but retain the mouse chromosomes. By using media in which mouse cells cannot grow, because they lack a particular enzyme, but in which human cells can, the one human chromosome that contains the gene encoding the

needed enzyme will be retained. By using various media, panels of hybrid cell lines can be established. Each cell line in a panel contains either a single human chromosome or a small number of human chromosomes, and a full set of mouse chromosomes, allowing easy mapping of individual genes to specific human chromosomes. See, e.g., D'Eustachio, et al., 1983. Science 220: 919-924. Somatic cell hybrids containing only fragments of human chromosomes can also be produced by using human chromosomes with translocations and deletions.

PCR mapping of somatic cell hybrids is a rapid procedure for assigning a particular sequence to a particular chromosome. Three or more sequences can be assigned per day using a single thermal cycler. Using the NOV sequences to design oligonucleotide primers, sub-localization can be achieved with panels of fragments from specific chromosomes. Fluorescence in situ hybridization (FISH) of a DNA sequence to a metaphase chromosomal spread can further be used to provide a precise chromosomal location in one step. Chromosome spreads can be made using cells whose division has been blocked in metaphase by a chemical like colcemid that disrupts the mitotic spindle. The chromosomes can be treated briefly with trypsin, and then stained with Giemsa. A pattern of light and dark bands develops on each chromosome, so that the chromosomes can be identified individually. The FISH technique can be used with a DNA sequence as short as 500 or 600 bases. However, clones larger than 1,000 bases have a higher likelihood of binding to a unique chromosomal location with sufficient signal intensity for simple detection. Preferably 1,000 bases, and more preferably 2,000 bases, will suffice to get good results at a reasonable amount of time. For a review of this technique, see, Verma, et al., HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES (Pergamon Press, New York 1988).

Reagents for chromosome mapping can be used individually to mark a single chromosome or a single site on that chromosome, or panels of reagents can be used for marking multiple sites and/or multiple chromosomes. Reagents corresponding to noncoding regions of the genes actually are preferred for mapping purposes. Coding sequences are more likely to be conserved within gene families, thus increasing the chance of cross hybridizations during chromosomal mapping.

Once a sequence has been mapped to a precise chromosomal location, the physical position of the sequence on the chromosome can be correlated with genetic map data. Such data are found, e.g., in McKusick, MENDELIAN INHERITANCE IN MAN, available on-line through Johns Hopkins University Welch Medical Library). The relationship between genes and disease, mapped to the same chromosomal region, can then be identified through linkage

analysis (co-inheritance of physically adjacent genes), described in, e.g., Egeland, et al., 1987. Nature, 325: 783-787.

Moreover, differences in the DNA sequences between individuals affected and unaffected with a disease associated with the NOV gene, can be determined. If a mutation is observed in some or all of the affected individuals but not in any unaffected individuals, then the mutation is likely to be the causative agent of the particular disease. Comparison of affected and unaffected individuals generally involves first looking for structural alterations in the chromosomes, such as deletions or translocations that are visible from chromosome spreads or detectable using PCR based on that DNA sequence. Ultimately, complete sequencing of genes from several individuals can be performed to confirm the presence of a mutation and to distinguish mutations from polymorphisms.

Tissue Typing

The NOV sequences of the invention can also be used to identify individuals from minute biological samples. In this technique, an individual's genomic DNA is digested with one or more restriction enzymes, and probed on a Southern blot to yield unique bands for identification. The sequences of the invention are useful as additional DNA markers for RFLP ("restriction fragment length polymorphisms," described in U.S. Patent No. 5,272,057).

Furthermore, the sequences of the invention can be used to provide an alternative technique that determines the actual base-by-base DNA sequence of selected portions of an individual's genome. Thus, the NOV sequences described herein can be used to prepare two PCR primers from the 5'- and 3'-termini of the sequences. These primers can then be used to amplify an individual's DNA and subsequently sequence it.

Panels of corresponding DNA sequences from individuals, prepared in this manner, can provide unique individual identifications, as each individual will have a unique set of such DNA sequences due to allelic differences. The sequences of the invention can be used to obtain such identification sequences from individuals and from tissue. The NOV sequences of the invention uniquely represent portions of the human genome. Allelic variation occurs to some degree in the coding regions of these sequences, and to a greater degree in the noncoding regions. It is estimated that allelic variation between individual humans occurs with a frequency of about once per each 500 bases. Much of the allelic variation is due to single nucleotide polymorphisms (SNPs), which include restriction fragment length polymorphisms (RFLPs).

Each of the sequences described herein can, to some degree, be used as a standard against which DNA from an individual can be compared for identification purposes. Because

greater numbers of polymorphisms occur in the noncoding regions, fewer sequences are necessary to differentiate individuals. The noncoding sequences can comfortably provide positive individual identification with a panel of perhaps 10 to 1,000 primers that each yield a noncoding amplified sequence of 100 bases. If predicted coding sequences, such as those in SEQ ID NO:1, 4, or 6, are used, a more appropriate number of primers for positive individual identification would be 500-2,000.

Predictive Medicine

The invention also pertains to the field of predictive medicine in which diagnostic assays, prognostic assays, pharmacogenomics, and monitoring clinical trials are used for prognostic (predictive) purposes to thereby treat an individual prophylactically. Accordingly, one aspect of the invention relates to diagnostic assays for determining NOV protein and/or nucleic acid expression as well as NOV activity, in the context of a biological sample (e.g., blood, serum, cells, tissue) to thereby determine whether an individual is afflicted with a disease or disorder, or is at risk of developing a disorder, associated with aberrant NOV expression or activity. The invention also provides for prognostic (or predictive) assays for determining whether an individual is at risk of developing a disorder associated with NOV protein, nucleic acid expression or activity. For example, mutations in a NOV gene can be assayed in a biological sample. Such assays can be used for prognostic or predictive purpose to thereby prophylactically treat an individual prior to the onset of a disorder characterized by or associated with NOV protein, nucleic acid expression, or biological activity.

Another aspect of the invention provides methods for determining NOV protein, nucleic acid expression or activity in an individual to thereby select appropriate therapeutic or prophylactic agents for that individual (referred to herein as "pharmacogenomics"). Pharmacogenomics allows for the selection of agents (e.g., drugs) for therapeutic or prophylactic treatment of an individual based on the genotype of the individual (e.g., the genotype of the individual examined to determine the ability of the individual to respond to a particular agent.)

Yet another aspect of the invention pertains to monitoring the influence of agents (e.g., drugs, compounds) on the expression or activity of NOV in clinical trials.

These and other agents are described in further detail in the following sections.

Diagnostic Assays

An exemplary method for detecting the presence or absence of NOV in a biological sample involves obtaining a biological sample from a test subject and contacting the biological sample with a compound or an agent capable of detecting NOV protein or nucleic acid (e.g.,

mRNA, genomic DNA) that encodes NOV protein such that the presence of NOV is detected in the biological sample. An agent for detecting NOV mRNA or genomic DNA is a labeled nucleic acid probe capable of hybridizing to NOV mRNA or genomic DNA. The nucleic acid probe can be, for example, a full-length NOV nucleic acid, such as the nucleic acid of SEQ ID NO:1, 4, 6, or a portion thereof, such as an oligonucleotide of at least 15, 30, 50, 100, 250 or 500 nucleotides in length and sufficient to specifically hybridize under stringent conditions to NOV mRNA or genomic DNA. Other suitable probes for use in the diagnostic assays of the invention are described herein.

An agent for detecting NOV protein is an antibody capable of binding to NOV protein, preferably an antibody with a detectable label. Antibodies can be polyclonal, or more preferably, monoclonal. An intact antibody, or a fragment thereof (e.g., Fab or $F(ab')_2$) can be used. The term "labeled", with regard to the probe or antibody, is intended to encompass direct labeling of the probe or antibody by coupling (i.e., physically linking) a detectable substance to the probe or antibody, as well as indirect labeling of the probe or antibody by reactivity with another reagent that is directly labeled. Examples of indirect labeling include detection of a primary antibody using a fluorescently-labeled secondary antibody and end-labeling of a DNA probe with biotin such that it can be detected with fluorescently-labeled streptavidin. The term "biological sample" is intended to include tissues, cells and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells and fluids present within a subject. That is, the detection method of the invention can be used to detect NOV mRNA, protein, or genomic DNA in a biological sample in vitro as well as in vivo. For example, in vitro techniques for detection of NOV mRNA include Northern hybridizations and in situ hybridizations. In vitro techniques for detection of NOV protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), Western blots, immunoprecipitations, and immunofluorescence. In vitro techniques for detection of NOV genomic DNA include Southern hybridizations. Furthermore, in vivo techniques for detection of NOV protein include introducing into a subject a labeled anti-NOV antibody. For example, the antibody can be labeled with a radioactive marker whose presence and location in a subject can be detected by standard imaging techniques. In one embodiment, the biological sample contains protein molecules from the test subject. Alternatively, the biological sample can contain mRNA molecules from the test subject or genomic DNA molecules from the test subject. A preferred biological sample is a peripheral blood leukocyte sample isolated by conventional means from a subject.

In another embodiment, the methods further involve obtaining a control biological sample from a control subject, contacting the control sample with a compound or agent capable of detecting NOV protein, mRNA, or genomic DNA, such that the presence of NOV protein, mRNA or genomic DNA is detected in the biological sample, and comparing the presence of NOV protein, mRNA or genomic DNA in the control sample with the presence of NOV protein, mRNA or genomic DNA in the test sample.

The invention also encompasses kits for detecting the presence of NOV in a biological sample. For example, the kit can comprise: a labeled compound or agent capable of detecting NOV protein or mRNA in a biological sample; means for determining the amount of NOV in the sample; and means for comparing the amount of NOV in the sample with a standard. The compound or agent can be packaged in a suitable container. The kit can further comprise instructions for using the kit to detect NOV protein or nucleic acid.

Prognostic Assays

The diagnostic methods described herein can furthermore be utilized to identify subjects having or at risk of developing a disease or disorder associated with aberrant NOV expression or activity. For example, the assays described herein, such as the preceding diagnostic assays or the following assays, can be utilized to identify a subject having or at risk of developing a disorder associated with NOV protein, nucleic acid expression or activity. For example, those involving development, differentiation, and activation of thymic immune cells; in pathologies related to spermatogenesis and male infertility; diagnosis of several human neoplasias; in diseases or pathologies of cells in blood circulation such as red blood cells and platelets; neurological, cardiac and vascular pathologies; rheumatoid arthritis; congenital muscular dystrophies; various muscle disorders; fixed deformities (arthrogryposis); small cell lung cancer NCI-H23; prostate cancer; and abnormal white matter. Alternatively, the prognostic assays can be utilized to identify a subject having or at risk for developing a disease or disorder. Thus, the invention provides a method for identifying a disease or disorder associated with aberrant NOV expression or activity in which a test sample is obtained from a subject and NOV protein or nucleic acid (e.g., mRNA, genomic DNA) is detected, wherein the presence of NOV protein or nucleic acid is diagnostic for a subject having or at risk of developing a disease or disorder associated with aberrant NOV expression or activity. As used herein, a "test sample" refers to a biological sample obtained from a subject of interest. For example, a test sample can be a biological fluid (e.g., serum), cell sample, or tissue.

Furthermore, the prognostic assays described herein can be used to determine whether a subject can be administered an agent (e.g., an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein,

peptide, nucleic acid, small molecule, or other drug candidate) to treat a disease or disorder associated with aberrant NOV expression or activity. For example, such methods can be used to determine whether a subject can be effectively treated with an agent for a disorder. Thus, the invention provides methods for determining whether a subject can be effectively treated with an agent for a disorder associated with aberrant NOV expression or activity in which a test sample is obtained and NOV protein or nucleic acid is detected (e.g., wherein the presence of NOV protein or nucleic acid is diagnostic for a subject that can be administered the agent to treat a disorder associated with aberrant NOV expression or activity).

The methods of the invention can also be used to detect genetic lesions in a NOV gene, thereby determining if a subject with the lesioned gene is at risk for a disorder characterized by aberrant cell proliferation and/or differentiation. In various embodiments, the methods include detecting, in a sample of cells from the subject, the presence or absence of a genetic lesion characterized by at least one of an alteration affecting the integrity of a gene encoding a NOV-protein, or the misexpression of the NOV gene. For example, such genetic lesions can be detected by ascertaining the existence of at least one of: (i) a deletion of one or more nucleotides from a NOV gene; (ii) an addition of one or more nucleotides to a NOV gene; (iii) a substitution of one or more nucleotides of a NOV gene, (iv) a chromosomal rearrangement of a NOV gene; (v) an alteration in the level of a messenger RNA transcript of a NOV gene, (vi) aberrant modification of a NOV gene, such as of the methylation pattern of the genomic DNA, (vii) the presence of a non-wild-type splicing pattern of a messenger RNA transcript of a NOV gene, (viii) a non-wild-type level of a NOV protein, (ix) allelic loss of a NOV gene, and (x) inappropriate post-translational modification of a NOV protein. As described herein, there are a large number of assay techniques known in the art which can be used for detecting lesions in a NOV gene. A preferred biological sample is a peripheral blood leukocyte sample isolated by conventional means from a subject. However, any biological sample containing nucleated cells can be used, including, for example, buccal mucosal cells.

In certain embodiments, detection of the lesion involves the use of a probe/primer in a polymerase chain reaction (PCR) (see, e.g., U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202), such as anchor PCR or RACE PCR, or, alternatively, in a ligation chain reaction (LCR) (see, e.g., Landegran, et al., 1988. Science 241: 1077-1080; and Nakazawa, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 360-364), the latter of which can be particularly useful for detecting point mutations in the NOV-gene (see, Abravaya, et al., 1995. Nucl. Acids Res. 23: 675-682). This method can include the steps of collecting a sample of cells from a patient, isolating nucleic acid (e.g., genomic, mRNA or both) from the cells of the sample, contacting the nucleic acid

sample with one or more primers that specifically hybridize to a NOV gene under conditions such that hybridization and amplification of the NOV gene (if present) occurs, and detecting the presence or absence of an amplification product, or detecting the size of the amplification product and comparing the length to a control sample. It is anticipated that PCR and/or LCR can be desirable to use as a preliminary amplification step in conjunction with any of the techniques used for detecting mutations described herein.

Alternative amplification methods include: self sustained sequence replication (see, Guatelli, et al., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878), transcriptional amplification system (see, Kwoh, et al., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177); Q Rep licase (see, Lizardi, et al, 1988. BioTechnology 6: 1197), or any other nucleic acid amplification method, followed by the detection of the amplified molecules using techniques well known to those of skill in the art. These detection schemes are especially useful for the detection of nucleic acid molecules if such molecules are present in very low numbers.

In an alternative embodiment, mutations in a NOV gene from a sample cell can be identified by alterations in restriction enzyme cleavage patterns. For example, sample and control DNA is isolated, amplified (optionally), digested with one or more restriction endonucleases, and fragment length sizes are determined by gel electrophoresis and compared. Differences in fragment length sizes between sample and control DNA indicates mutations in the sample DNA. Moreover, the use of sequence specific ribozymes (see, e.g., U.S. Patent No. 5,493,531) can be used to score for the presence of specific mutations by development or loss of a ribozyme cleavage site.

In other embodiments, genetic mutations in NOV can be identified by hybridizing a sample and control nucleic acids, e.g., DNA or RNA, to high-density arrays containing hundreds or thousands of oligonucleotides probes. See, e.g., Cronin, et al., 1996. Human Mutation 7: 244-255; Kozal, et al., 1996. Nat. Med. 2: 753-759. For example, genetic mutations in NOV can be identified in two dimensional arrays containing light-generated DNA probes as described in Cronin, et al., supra. Briefly, a first hybridization array of probes can be used to scan through long stretches of DNA in a sample and control to identify base changes between the sequences by making linear arrays of sequential overlapping probes. This step allows the identification of point mutations. This is followed by a second hybridization array that allows the characterization of specific mutations by using smaller, specialized probe arrays complementary to all variants or mutations detected. Each mutation array is composed of parallel probe sets, one complementary to the wild-type gene and the other complementary to the mutant gene.

In yet another embodiment, any of a variety of sequencing reactions known in the art can be used to directly sequence the NOV gene and detect mutations by comparing the sequence of the sample NOV with the corresponding wild-type (control) sequence. Examples of sequencing reactions include those based on techniques developed by Maxim and Gilbert, 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560 or Sanger, 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463. It is also contemplated that any of a variety of automated sequencing procedures can be utilized when performing the diagnostic assays (see, e.g., Naeve, et al., 1995. Biotechniques 19: 448), including sequencing by mass spectrometry (see, e.g., PCT International Publication No. WO 94/16101; Cohen, et al., 1996. Adv. Chromatography 36: 127-162; and Griffin, et al., 1993. Appl. Biochem. Biotechnol. 38: 147-159).

Other methods for detecting mutations in the NOV gene include methods in which protection from cleavage agents is used to detect mismatched bases in RNA/RNA or RNA/DNA heteroduplexes. See, e.g., Myers, et al., 1985. Science 230: 1242. In general, the art technique of "mismatch cleavage" starts by providing heteroduplexes of formed by hybridizing (labeled) RNA or DNA containing the wild-type NOV sequence with potentially mutant RNA or DNA obtained from a tissue sample. The double-stranded duplexes are treated with an agent that cleaves single-stranded regions of the duplex such as which will exist due to basepair mismatches between the control and sample strands. For instance, RNA/DNA duplexes can be treated with RNase and DNA/DNA hybrids treated with S1 nuclease to enzymatically digesting the mismatched regions. In other embodiments, either DNA/DNA or RNA/DNA duplexes can be treated with hydroxylamine or osmium tetroxide and with piperidine in order to digest mismatched regions. After digestion of the mismatched regions, the resulting material is then separated by size on denaturing polyacrylamide gels to determine the site of mutation. See, e.g., Cotton, et al., 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397; Saleeba, et al., 1992. Methods Enzymol. 217: 286-295. In an embodiment, the control DNA or RNA can be labeled for detection.

In still another embodiment, the mismatch cleavage reaction employs one or more proteins that recognize mismatched base pairs in double-stranded DNA (so called "DNA mismatch repair" enzymes) in defined systems for detecting and mapping point mutations in NOV cDNAs obtained from samples of cells. For example, the mutY enzyme of E. coli cleaves A at G/A mismatches and the thymidine DNA glycosylase from HeLa cells cleaves T at G/T mismatches. See, e.g., Hsu, et al., 1994. Carcinogenesis 15: 1657-1662. According to an exemplary embodiment, a probe based on a NOV sequence, e.g., a wild-type NOV sequence, is hybridized to a cDNA or other DNA product from a test cell(s). The duplex is

treated with a DNA mismatch repair enzyme, and the cleavage products, if any, can be detected from electrophoresis protocols or the like. See, e.g., U.S. Patent No. 5,459,039.

In other embodiments, alterations in electrophoretic mobility will be used to identify mutations in NOV genes. For example, single strand conformation polymorphism (SSCP) can be used to detect differences in electrophoretic mobility between mutant and wild type nucleic acids. See, e.g., Orita, et al., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 86: 2766; Cotton, 1993. Mutat. Res. 285: 125-144; Hayashi, 1992. Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73-79. Single-stranded DNA fragments of sample and control NOV nucleic acids will be denatured and allowed to renature. The secondary structure of single-stranded nucleic acids varies according to sequence, the resulting alteration in electrophoretic mobility enables the detection of even a single base change. The DNA fragments can be labeled or detected with labeled probes. The sensitivity of the assay can be enhanced by using RNA (rather than DNA), in which the secondary structure is more sensitive to a change in sequence. In one embodiment, the subject method utilizes heteroduplex analysis to separate double stranded heteroduplex molecules on the basis of changes in electrophoretic mobility. See, e.g., Keen, et al., 1991. Trends Genet. 7: 5.

In yet another embodiment, the movement of mutant or wild-type fragments in polyacrylamide gels containing a gradient of denaturant is assayed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). See, e.g., Myers, et al., 1985. Nature 313: 495. When DGGE is used as the method of analysis, DNA will be modified to insure that it does not completely denature, for example by adding a GC clamp of approximately 40 bp of high-melting GC-rich DNA by PCR. In a further embodiment, a temperature gradient is used in place of a denaturing gradient to identify differences in the mobility of control and sample DNA. See, e.g., Rosenbaum and Reissner, 1987. Biophys. Chem. 265: 12753.

Examples of other techniques for detecting point mutations include, but are not limited to, selective oligonucleotide hybridization, selective amplification, or selective primer extension. For example, oligonucleotide primers can be prepared in which the known mutation is placed centrally and then hybridized to target DNA under conditions that permit hybridization only if a perfect match is found. See, e.g., Saiki, et al., 1986. Nature 324: 163; Saiki, et al., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6230. Such allele specific oligonucleotides are hybridized to PCR amplified target DNA or a number of different mutations when the oligonucleotides are attached to the hybridizing membrane and hybridized with labeled target DNA.

Alternatively, allele specific amplification technology that depends on selective PCR amplification can be used in conjunction with the instant invention. Oligonucleotides used as primers for specific amplification may carry the mutation of interest in the center of the molecule (so that amplification depends on differential hybridization; see, e.g., Gibbs, et al., 1989. Nucl. Acids Res. 17: 2437-2448) or at the extreme 3'-terminus of one primer where, under appropriate conditions, mismatch can prevent, or reduce polymerase extension (see, e.g., Prossner, 1993. Tibtech. 11: 238). In addition it can be desirable to introduce a novel restriction site in the region of the mutation to create cleavage-based detection. See, e.g., Gasparini, et al., 1992. Mol. Cell Probes 6: 1. It is anticipated that in certain embodiments amplification may also be performed using Taq ligase for amplification. See, e.g., Barany, 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189. In such cases, ligation will occur only if there is a perfect match at the 3'-terminus of the 5' sequence, making it possible to detect the presence of a known mutation at a specific site by looking for the presence or absence of amplification.

The methods described herein can be performed, for example, by utilizing pre-packaged diagnostic kits comprising at least one probe nucleic acid or antibody reagent described herein, which can be conveniently used, e.g., in clinical settings to diagnose patients exhibiting symptoms or family history of a disease or illness involving a NOV gene. Furthermore, any cell type or tissue, preferably peripheral blood leukocytes, in which NOV is expressed can be utilized in the prognostic assays described herein. However, any biological sample containing nucleated cells can be used, including, for example, buccal mucosal cells.

Pharmacogenomics

Agents, or modulators that have a stimulatory or inhibitory effect on NOV activity (e.g., NOV gene expression), as identified by a screening assay described herein can be administered to individuals to treat (prophylactically or therapeutically) disorders (e.g., cancer or immune disorders associated with aberrant NOV activity. In conjunction with such treatment, the pharmacogenomics (i.e., the study of the relationship between an individual's genotype and that individual's response to a foreign compound or drug) of the individual can be considered. Differences in metabolism of therapeutics can lead to severe toxicity or therapeutic failure by altering the relation between dose and blood concentration of the pharmacologically active drug. Thus, the pharmacogenomics of the individual permits the selection of effective agents (e.g., drugs) for prophylactic or therapeutic treatments based on a consideration of the individual's genotype. Such pharmacogenomics can further be used to determine appropriate dosages and therapeutic regimens. Accordingly, the activity of NOV protein, expression of NOV nucleic acid, or mutation content of NOV genes in an individual

can be determined to thereby select appropriate agent(s) for therapeutic or prophylactic treatment of the individual.

Pharmacogenomics deals with clinically significant hereditary variations in the response to drugs due to altered drug disposition and abnormal action in affected persons. See e.g., Eichelbaum, 1996. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 23: 983-985; Linder, 1997. Clin. Chem., 43: 254-266. In general, two types of pharmacogenetic conditions can be differentiated. Genetic conditions transmitted as a single factor altering the way drugs act on the body (altered drug action) or genetic conditions transmitted as single factors altering the way the body acts on drugs (altered drug metabolism). These pharmacogenetic conditions can occur either as rare defects or as polymorphisms. For example, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is a common inherited enzymopathy in which the main clinical complication is hemolysis after ingestion of oxidant drugs (anti-malarials, sulfonamides, analgesics, nitrofurans) and consumption of fava beans.

As an illustrative embodiment, the activity of drug metabolizing enzymes is a major determinant of both the intensity and duration of drug action. The discovery of genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes (e.g., N-acetyltransferase 2 (NAT 2) and cytochrome P450 enzymes CYP2D6 and CYP2C19) has provided an explanation as to why some patients do not obtain the expected drug effects or show exaggerated drug response and serious toxicity after taking the standard and safe dose of a drug. These polymorphisms are expressed in two phenotypes in the population, the extensive metabolizer (EM) and poor metabolizer (PM). The prevalence of PM is different among different populations. For example, the gene coding for CYP2D6 is highly polymorphic and several mutations have been identified in PM, which all lead to the absence of functional CYP2D6. Poor metabolizers of CYP2D6 and CYP2C19 quite frequently experience exaggerated drug response and side effects when they receive standard doses. If a metabolite is the active therapeutic moiety, PM show no therapeutic response, as demonstrated for the analgesic effect of codeine mediated by its CYP2D6-formed metabolite morphine. At the other extreme are the so called ultra-rapid metabolizers who do not respond to standard doses. Recently, the molecular basis of ultra-rapid metabolism has been identified to be due to CYP2D6 gene amplification.

Thus, the activity of NOV protein, expression of NOV nucleic acid, or mutation content of NOV genes in an individual can be determined to thereby select appropriate agent(s) for therapeutic or prophylactic treatment of the individual. In addition, pharmacogenetic studies can be used to apply genotyping of polymorphic alleles encoding drug-metabolizing enzymes to the identification of an individual's drug responsiveness

phenotype. This knowledge, when applied to dosing or drug selection, can avoid adverse reactions or therapeutic failure and thus enhance therapeutic or prophylactic efficiency when treating a subject with a NOV modulator, such as a modulator identified by one of the exemplary screening assays described herein.

Monitoring of Effects During Clinical Trials

Monitoring the influence of agents (e.g., drugs, compounds) on the expression or activity of NOV (e.g., the ability to modulate aberrant cell proliferation and/or differentiation) can be applied not only in basic drug screening, but also in clinical trials. For example, the effectiveness of an agent determined by a screening assay as described herein to increase NOV gene expression, protein levels, or upregulate NOV activity, can be monitored in clinical trails of subjects exhibiting decreased NOV gene expression, protein levels, or downregulated NOV activity. Alternatively, the effectiveness of an agent determined by a screening assay to decrease NOV gene expression, protein levels, or downregulate NOV activity, can be monitored in clinical trails of subjects exhibiting increased NOV gene expression, protein levels, or upregulated NOV activity. In such clinical trials, the expression or activity of NOV and, preferably, other genes that have been implicated in, for example, a cellular proliferation or immune disorder can be used as a "read out" or markers of the immune responsiveness of a particular cell.

By way of example, and not of limitation, genes, including NOV, that are modulated in cells by treatment with an agent (e.g., compound, drug or small molecule) that modulates NOV activity (e.g., identified in a screening assay as described herein) can be identified. Thus, to study the effect of agents on cellular proliferation disorders, for example, in a clinical trial, cells can be isolated and RNA prepared and analyzed for the levels of expression of NOV and other genes implicated in the disorder. The levels of gene expression (i.e., a gene expression pattern) can be quantified by Northern blot analysis or RT-PCR, as described herein, or alternatively by measuring the amount of protein produced, by one of the methods as described herein, or by measuring the levels of activity of NOV or other genes. In this manner, the gene expression pattern can serve as a marker, indicative of the physiological response of the cells to the agent. Accordingly, this response state can be determined before, and at various points during, treatment of the individual with the agent.

In one embodiment, the invention provides a method for monitoring the effectiveness of treatment of a subject with an agent (e.g., an agonist, antagonist, protein, peptide, peptidomimetic, nucleic acid, small molecule, or other drug candidate identified by the screening assays described herein) comprising the steps of (i) obtaining a pre-administration

sample from a subject prior to administration of the agent; (ii) detecting the level of expression of a NOV protein, mRNA, or genomic DNA in the preadministration sample; (iii) obtaining one or more post-administration samples from the subject; (iv) detecting the level of expression or activity of the NOV protein, mRNA, or genomic DNA in the post-administration samples; (v) comparing the level of expression or activity of the NOV protein, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample with the NOV protein, mRNA, or genomic DNA in the post administration sample or samples; and (vi) altering the administration of the agent to the subject accordingly. For example, increased administration of the agent can be desirable to increase the expression or activity of NOV to higher levels than detected, i.e., to increase the effectiveness of the agent. Alternatively, decreased administration of the agent can be desirable to decrease expression or activity of NOV to lower levels than detected, i.e., to decrease the effectiveness of the agent.

Methods of Treatment

The invention provides for both prophylactic and therapeutic methods of treating a subject at risk of (or susceptible to) a disorder or having a disorder associated with aberrant NOV expression or activity. Such related diseases or disorders include for NOV1 for example, those involving development, differentiation, and activation of thymic immune cells; in pathologies related to spermatogenesis and male infertility; diagnosis of several human neoplasias; in diseases or pathologies of cells in blood circulation such as red blood cells and platelets; and small cell lung cancer NCI-H23; for NOV2, for example, neurological, cardiac and vascular pathologies; for NOV3, for example, rheumatoid arthritis; congenital muscular dystrophies; various muscle disorders; fixed deformities (arthrogryposis); prostate cancer; and abnormal white matter. These methods of treatment will be discussed more fully, below.

Disease and Disorders

Diseases and disorders that are characterized by increased (relative to a subject not suffering from the disease or disorder) levels or biological activity can be treated with Therapeutics that antagonize (i.e., reduce or inhibit) activity. Therapeutics that antagonize activity can be administered in a therapeutic or prophylactic manner. Therapeutics that can be utilized include, but are not limited to: (i) an aforementioned peptide, or analogs, derivatives, fragments or homologs thereof; (ii) antibodies to an aforementioned peptide; (iii) nucleic acids encoding an aforementioned peptide; (iv) administration of antisense nucleic acid and nucleic acids that are "dysfunctional" (i.e., due to a heterologous insertion within the coding sequences of coding sequences to an aforementioned peptide) that are utilized to "knockout" endoggenous function of an aforementioned peptide by homologous recombination (see, e.g.,

Capecchi, 1989. Science 244: 1288-1292); or (v) modulators (i.e., inhibitors, agonists and antagonists, including additional peptide mimetic of the invention or antibodies specific to a peptide of the invention) that alter the interaction between an aforementioned peptide and its binding partner.

Diseases and disorders that are characterized by decreased (relative to a subject not suffering from the disease or disorder) levels or biological activity can be treated with Therapeutics that increase (i.e., are agonists to) activity. Therapeutics that upregulate activity can be administered in a therapeutic or prophylactic manner. Therapeutics that can be utilized include, but are not limited to, an aforementioned peptide, or analogs, derivatives, fragments or homologs thereof; or an agonist that increases bioavailability.

Increased or decreased levels can be readily detected by quantifying peptide and/or RNA, by obtaining a patient tissue sample (e.g., from biopsy tissue) and assaying it in vitro for RNA or peptide levels, structure and/or activity of the expressed peptides (or mRNAs of an aforementioned peptide). Methods that are well-known within the art include, but are not limited to, immunoassays (e.g., by Western blot analysis, immunoprecipitation followed by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis, immunocytochemistry, etc.) and/or hybridization assays to detect expression of mRNAs (e.g., Northern assays, dot blots, in situ hybridization, and the like).

Prophylactic Methods

In one aspect, the invention provides a method for preventing, in a subject, a disease or condition associated with an aberrant NOV expression or activity, by administering to the subject an agent that modulates NOV expression or at least one NOV activity. These conditions include for NOV1, for example, those involving development, differentiation, and activation of thymic immune cells; in pathologies related to spermatogenesis and male infertility; diagnosis of several human neoplasias; in diseases or pathologies of cells in blood circulation such as red blood cells and platelets; and small cell lung cancer NCI-H23; for NOV2, for example, neurological, cardiac and vascular pathologies; for NOV3, for example, rheumatoid arthritis; congenital muscular dystrophies; various muscle disorders; fixed deformities (arthrogryposis); prostate cancer; and abnormal white matter. Subjects at risk for a disease that is caused or contributed to by aberrant NOV expression or activity can be identified by, for example, any or a combination of diagnostic or prognostic assays as described herein. Administration of a prophylactic agent can occur prior to the manifestation of symptoms characteristic of the NOV aberrancy, such that a disease or disorder is prevented or, alternatively, delayed in its progression. Depending upon the type of NOV aberrancy, for

example, a NOV agonist or NOV antagonist agent can be used for treating the subject. The appropriate agent can be determined based on screening assays described herein. The prophylactic methods of the invention are further discussed in the following subsections.

Therapeutic Methods

Another aspect of the invention pertains to methods of modulating NOV expression or activity for therapeutic purposes. The modulatory method of the invention involves contacting a cell with an agent that modulates one or more of the activities of NOV protein activity associated with the cell. An agent that modulates NOV protein activity can be an agent as described herein, such as a nucleic acid or a protein, a naturally-occurring cognate ligand of a NOV protein, a peptide, a NOV peptidomimetic, or other small molecule. In one embodiment, the agent stimulates one or more NOV protein activity. Examples of such stimulatory agents include active NOV protein and a nucleic acid molecule encoding NOV that has been introduced into the cell. In another embodiment, the agent inhibits one or more NOV protein activity. Examples of such inhibitory agents include antisense NOV nucleic acid molecules and anti-NOV antibodies. These modulatory methods can be performed in vitro (e.g., by culturing the cell with the agent) or, alternatively, in vivo (e.g., by administering the agent to a subject). As such, the invention provides methods of treating an individual afflicted with a disease or disorder characterized by aberrant expression or activity of a NOV protein or nucleic acid molecule. In one embodiment, the method involves administering an agent (e.g., an agent identified by a screening assay described herein), or combination of agents that modulates (e.g., up-regulates or down-regulates) NOV expression or activity. In another embodiment, the method involves administering a NOV protein or nucleic acid molecule as therapy to compensate for reduced or aberrant NOV expression or activity.

Stimulation of NOV activity is desirable in situations in which NOV is abnormally downregulated and/or in which increased NOV activity is likely to have a beneficial effect. One example of such a situation is where a subject has a disorder characterized by aberrant cell proliferation and/or differentiation (e.g., cancer or immune associated disorders). Another example of such a situation is where the subject has a gestational disease (e.g., preclampsia).

Determination of the Biological Effect of the Therapeutic

In various embodiments of the invention, suitable in vitro or in vivo assays are performed to determine the effect of a specific Therapeutic and whether its administration is indicated for treatment of the affected tissue.

In various specific embodiments, in vitro assays can be performed with representative cells of the type(s) involved in the patient's disorder, to determine if a given Therapeutic exerts

the desired effect upon the cell type(s). Compounds for use in therapy can be tested in suitable animal model systems including, but not limited to rats, mice, chicken, cows, monkeys, rabbits, and the like, prior to testing in human subjects. Similarly, for in vivo testing, any of the animal model system known in the art can be used prior to administration to human subjects.

Prophylactic and Therapeutic Uses of the Compositions of the Invention

The NOV nucleic acids and proteins of the invention are useful in potential prophylactic and therapeutic applications implicated in a variety of disorders including, but not limited to: for NOV1 those involving development, differentiation, and activation of thymic immune cells; in pathologies related to spermatogenesis and male infertility; diagnosis of several human neoplasias; in diseases or pathologies of cells in blood circulation such as red blood cells and platelets; in blood circulation such as red blood cells and platelets; for NOV2 neurological, cardiac and vascular pathologies; for NOV3 rheumatoid arthritis; congenital muscular dystrophies; various muscle disorders; fixed deformities (arthrogryposis); and abnormal white matter.

As an example, a cDNA encoding the NOV protein of the invention can be useful in gene therapy, and the protein can be useful when administered to a subject in need thereof. By way of non-limiting example, the compositions of the invention will have efficacy for treatment of patients suffering from the above mentioned disorders.

Both the novel nucleic acid encoding the NOV protein, and the NOV protein of the invention, or fragments thereof, may also be useful in diagnostic applications, wherein the presence or amount of the nucleic acid or the protein are to be assessed. A further use could be as an anti-bacterial molecule (i.e., some peptides have been found to possess anti-bacterial properties). These materials are further useful in the generation of antibodies which immunospecifically-bind to the novel substances of the invention for use in therapeutic or diagnostic methods. Those involving development, differentiation, and activation of thymic immune cells; in pathologies related to spermatogenesis and male infertility; diagnosis of several human neoplasias; in diseases or pathologies of cells in blood circulation such as red blood cells and platelets; neurological, cardiac and vascular pathologies; rheumatoid arthritis; congenital muscular dystrophies; various muscle disorders; fixed deformities (arthrogryposis); and abnormal white matter

EXAMPLES

The following examples illustrate by way of non-limiting example various aspects of the invention.

Example 1. Quantitative expression analysis of NOV1 and NOV2 in various cells and tissues

The quantitative expression of various clones was assessed in about 41 normal and about 55 tumor samples by real time quantitative PCR (TAQMAN®) performed on a Perkin-Elmer Biosystems ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System. In the following Tables 12, 13, and 14, the following abbreviations are used:

ca. = carcinoma,

* = established from metastasis,

met = metastasis,

s cell var= small cell variant,

non-s = non-sm =non-small,

squam = squamous,

pl. eff = pl effusion = pleural effusion,

glio = glioma,

astro = astrocytoma, and

neuro = neuroblastoma

NAT = normal adjacent tissue.

First, up to 96 RNA samples were normalized to β-actin and GAPDH. RNA (~50 ng total or ~1 ng polyA+) was converted to cDNA using the TAQMAN® Reverse Transcription Reagents Kit (PE Biosystems, Foster City, CA; Catalog No. N808-0234) and random hexamers according to the manufacturer's protocol. Reactions were performed in 20 ul and incubated for 30 min. at 48°C. cDNA (5 ul) was then transferred to a separate plate for the TAQMAN® reaction using β-actin and GAPDH TAQMAN® Assay Reagents (PE Biosystems; Catalog Nos. 4310881E and 4310884E, respectively) and TAQMAN® universal PCR Master Mix (PE Biosystems; Catalog No. 4304447) according to the manufacturer's protocol. Reactions were performed in 25 ul using the following parameters: 2 min. at 50°C; 10 min. at 95°C; 15 sec. at 95°C/1 min. at 60°C (40 cycles). Results were recorded as CT values (cycle at which a given sample crosses a threshold level of fluorescence) using a log

scale, with the difference in RNA concentration between a given sample and the sample with the lowest CT value being represented as 2 to the power of delta CT. The percent relative expression is then obtained by taking the reciprocal of this RNA difference and multiplying by 100. The relative expression percent is in reference to the ß-actin and GAPDH levels. Higher relative expression in a normal versus a cancerous tissues indicates an increased expression of gene in cancerous tissues and that the gene is a marker for a type of cancer. The average CT values obtained for ß-actin and GAPDH were used to normalize RNA samples. The RNA sample generating the highest CT value required no further diluting, while all other samples were diluted relative to this sample according to their β-actin /GAPDH average CT values.

Normalized RNA (5 ul) was converted to cDNA and analyzed via TAQMAN® using One Step RT-PCR Master Mix Reagents (PE Biosystems; Catalog No. 4309169) and gene-specific primers according to the manufacturer's instructions. Probes and primers were designed for each assay according to Perkin Elmer Biosystem's *Primer Express* Software package (version I for Apple Computer's Macintosh Power PC) or a similar algorithm using the target sequence as input. Default settings were used for reaction conditions and the following parameters were set before selecting primers: primer concentration = 250 nM, primer melting temperature (T_m) range = 58°-60° C, primer optimal Tm = 59° C, maximum primer difference = 2° C, probe does not have 5' G, probe T_m must be 10° C greater than primer T_m, amplicon size 75 bp to 100 bp. The probes and primers selected (see below) were synthesized by Synthegen (Houston, TX, USA). Probes were double purified by HPLC to remove uncoupled dye and evaluated by mass spectroscopy to verify coupling of reporter and quencher dyes to the 5' and 3' ends of the probe, respectively. Their final concentrations were: forward and reverse primers, 900 nM each, and probe, 200nM.

PCR conditions: Normalized RNA from each tissue and each cell line was spotted in each well of a 96 well PCR plate (Perkin Elmer Biosystems). PCR cocktails including two probes (SEQX-specific and another gene-specific probe multiplexed with the SEQX probe) were set up using 1X TaqMan™ PCR Master Mix for the PE Biosystems 7700, with 5 mM MgCl2, dNTPs (dA, G, C, U at 1:1:1:2 ratios), 0.25 U/ml AmpliTaq Gold™ (PE Biosystems), and 0.4 U/ 1 RNase inhibitor, and 0.25 U/ 1 reverse transcriptase. Reverse transcription was performed at 48° C for 30 minutes followed by amplification/PCR cycles as follows: 95° C 10 min, then 40 cycles of 95° C for 15 seconds, 60° C for 1 minute.

A. NOV1

Probe Name: Ag190

Primers	Sequences	Length	Start Position	SEQ ID NO:
Forward	5'-TGGAGGAAGAATCACCACAAGA-3'	22	243	8
Probe	TET-5'-CAAGCCACAAACTGTGACGTGAACCTG-3'-TAMRA	27	271	9
Reverse	5'-GTGGCATCAGCACGGAGTG-3'	19	300	10

The results obtained for clone NOV1 using primer-probe set Ag190 are shown in Table 12.

Table 12.

Tissue_Name	Relative Expression %	Tissue_Name	Relative Expression %
Endothelial cells	0.0	Renal ca. 786-0	0.0
Endothelial cells (treated)	0.0	Renal ca. A498	0.0
Pancreas	0.0	Renal ca. RXF 393	0.0
Pancreatic ca. CAPAN 2	0.0	Renal ca. ACHN	0.9
Adrenal Gland (new lot*)	92.0	Renal ca. UO-31	0.0
Thyroid	0.0	Renal ca. TK-10	0.6
Salavary gland	23.8	Liver	0.0
Pituitary gland	0.0	Liver (fetal)	0.0
Brain (fetal)	0.0	Liver ca. (hepatoblast) HepG2	32.1
Brain (whole)	0.0	Lung	0.0
Brain (amygdala)	0.0	Lung (fetal)	0.0
Brain (cerebellum)	0.0	Lung ca. (small cell) LX-1	0.0
Brain (hippocampus)	0.0	Lung ca. (small cell) NCI-H69	22.9
Brain (thalamus)	0.0	Lung ca. (s.cell var.) SHP-77	0.0
Cerebral Cortex	1.2	Lung ca. (large cell)NCI-H460	4.0
Spinal cord	0.0	Lung ca. (non-sm. cell) A549	8.4
CNS ca. (glio/astro) U87-MG	2.5	Lung ca. (non-s.cell) NCI-H23	100.0
CNS ca. (glio/astro) U-118-MG	0.0	Lung ca (non-s.cell) HOP-62	0.8
CNS ca. (astro) SW1783	0.0	Lung ca. (non-s.cl) NCI-H522	15.4
CNS ca.* (neuro; met) SK-N-AS	7.8	Lung ca. (squam.) SW 900	0.0
CNS ca. (astro) SF-539	0.0	Lung ca. (squam.) NCI-H596	42.3
CNS ca. (astro) SNB-75	0.0	Mammary gland	0.0
CNS ca. (glio) SNB-19	2.1	Breast ca.* (pl. effusion) MCF-7	2.1
CNS ca. (glio) U251	0.0	Breast ca.* (pl.ef) MDA-MB-231	0.0
CNS ca. (glio) SF-295	0.3	Breast ca.* (pl. effusion) T47D	21.0
Heart	0.0	Breast ca. BT-549	0.0
Skeletal Muscle (new lot*)	0.0	Breast ca. MDA-N	16.5
Bone marrow	0.0	Ovary	0.0
Thymus	0.0	Ovarian ca. OVCAR-3	1.0
Spleen	0.0	Ovarian ca. OVCAR-4	0.2
Lymph node	0.0	Ovarian ca. OVCAR-5	1.8
Colorectal	0.0	Ovarian ca. OVCAR-8	7.5
Stomach	0.0	Ovarian ca. IGROV-1	3.9
Small intestine	7.3	Ovarian ca.* (ascites) SK-OV-3	0.5
Colon ca. SW480	0.0	Uterus	0.0
Colon ca.* (SW480 met)SW620	0.4	Placenta	0.0

Colon ca. HT29	0.0	Prostate	2.1
Colon ca. HCT-116	14.6	Prostate ca.* (bone met)PC-3	11.5
Colon ca. CaCo-2	14.5	Testis	0.0
83219 CC Well to Mod Diff (ODO3866)	0.0	Melanoma Hs688(A).T	0.0
Colon ca. HCC-2998	55.1	Melanoma* (met) Hs688(B).T	0.0
Gastric ca.* (liver met) NCI-N87	0.0	Melanoma UACC-62	0.0
Bladder	0.0	Melanoma M14	0.0
Trachea	0.0	Melanoma LOX IMVI	0.0
Kidney	4.4	Melanoma* (met) SK-MEL-5	0.0
Kidney (fetal)	6.1		

It is seen that clone NOV1 expression is enhanced in certain cancer cell lines, especially non-small cell lung cancer NCI-H23, but not in cell lines from the corresponding normal tissue. Therefore, NOV1 can be used as a cancer-specific marker in such tissues.

B. NOV2

Probe Name: Ag087

Primers	Sequences	Length	Start Position	SEQ ID NO:
Forward	5'-CGCAGTTTCACTCGGGAGAT-3'	20	1870	11
Probe	TET-5'-CCTCTAGGATCCACATCGAGAAAATCATCGG-3'-TAMRA	31	1895	12
Reverse	5'-AGCAGACTTCCCCGGAGTCT-3'	20	1932	13

The results obtained on a panel of cell lines for clone NOV2 using primer-probe set Ag087 are shown in Table 13, and those obtained on a second panel of surgical tissue samples are shown in Table 14. In Table 14, "NAT" designates surgical tissues deemed not cancerous obtained by the surgeon from the region immediately adjacent to a tumor or cancer.

Table 13.

Tissue_Name	Relative Expression %	Tissue_Name	Relative Expression %
Endothelial cells	0.3	Kidney (fetal)	1.0
Endothelial cells (treated)	0.6	Renal ca.786-0	0.6
Pancreas	1.0	Renal ca.A498	0.3
Pancreatic ca. CAPAN 2	2.5	Renal ca. RXF 393	0.2
Adipose	1.8	Renal ca. ACHN	0.4
Adrenal gland	0.2	Renal ca. UO-31	0.3
Thyroid	0.1	Renal ca. TK-10	1.3
Salavary gland	0.2	Liver	0.3
Pituitary gland	0.2	Liver (fetal)	0.1
Brain (fetal)	0.9	Liver ca. (hepatoblast) HepG2	1.0
Brain (whole)	3.0	Lung	0.2
Brain (amygdala)	0.7	Lung (fetal)	0.8
Brain (cerebellum)	7.1	Lung ca. (small cell) LX-1	0.3
Brain (hippocampus)	2.8	Lung ca. (small cell)NCI-H69	0.7
Brain (substantia nigra)	2.7	Lung ca. (s.cell var.) SHP-77	25.9
Brain (thalamus)	2.5	Lung ca. (large cell)NCI-H460	0.7

Brain (hypothalamus)	0.3	Lung ca. (non-sm. cell) A549	1.1
Spinal cord	2.1	Lung ca. (non-s.cell) NCI-H23	0.6
CNS ca. (glio/astro)U87-MG	0.4	Lung ca (non-s.cell) HOP-62	1.0
CNS ca. (glio/astro)U-118-MG	0.3	Lung ca. (non-s.cl) NCI-H522	0.3
CNS ca. (astro)SW 1783	0.3	Lung ca. (squam.) SW 900	11.5
CNS ca.* (neuro; met) SK-N-AS	1.1	Lung ca. (squam.) NCI-H596	0.8
CNS ca. (astro) SF-539	0.0	Mammary gland	1.8
CNS ca. (astro) SNB-75	2.2	Breast ca.* (pl. effusion) MCF-7	0.3
CNS ca. (glio) SNB-19	2.0	Breast ca.* (pl.ef) MDA-MB-231	1.6
CNS ca. (glio) U251	0.9	Breast ca.* (pl. effusion)T47D	0.5
CNS ca. (glio) SF-295	0.0	Breast ca. BT-549	4.7
Heart	0.4	Breast ca. MDA-N	1.6
Skeletal muscle	0.1	Ovary	0.6
Bone marrow	0.1	Ovarian ca. OVCAR-3	0.6
Thymus	3.5	Ovarian ca. OVCAR-4	0.5
Spleen	0.4	Ovarian ca. OVCAR-5	4.6
Lymph node	0.4	Ovarian ca.OVCAR-8	0.3
Colon (ascending)	0.6	Ovarian ca. IGROV-1	0.6
Stomach	1.3	Ovarian ca.* (ascites) SK-OV-3	1.0
Small intestine	0.5	Uterus	1.8
Colon ca. SW480	0.3	Placenta	1.5
Colon ca.* (SW480 met)SW620	0.2	Prostate	0.5
Colon ca. HT29	2.8	Prostate ca.* (bone met)PC-3	100.0
Colon ca. HCT-116	8.0	Testis	4.6
Colon ca. CaCo-2	1.2	Melanoma Hs688(A).T	0.1
Colon ca. HCT-15	0.9	Melanoma* (met) Hs688(B).T	0.1
Colon ca. HCC-2998	1.5	Melanoma UACC-62	0.8
Gastric ca.* (liver met) NCI-N87	2.8	Melanoma M14	0.3
Bladder	0.4	Melanoma LOX IMVI	0.7
Trachea	1.3	Melanoma* (met)SK-MEL-5	0.2
Kidney	1.7	Melanoma SK-MEL-28	0.3

TABLE 14.

Tissue_Name/Run_Name	Relative Expr. % 21nm723t	21nm819t	Tissue_Name/Run_Name	Relative Expr. % 21nm723t	21nm819t
Normal Colon GENPAK 061003	0.0	0.0	Kidney NAT Clontech 8120608	0.0	0.0
83219 CC Well to Mod Diff (ODO3866)	0.0	0.0	Kidney Cancer Clontech 8120613	0.0	0.0
83220 CC NAT (ODO3866)	0.0	0.0	Kidney NAT Clontech 8120614	0.0	0.0
83221 CC Gr.2 rectosigmoid (ODO3868)	0.0	0.0	Kidney Cancer Clontech 9010320	0.0	0.0
83222 CC NAT (ODO3868)	0.0	0.0	Kidney NAT Clontech 9010321	0.0	0.0
83235 CC Mod Diff (ODO3920)	0.0	0.0	Normal Uterus GENPAK 061018	0.0	0.0
83236 CC NAT (ODO3920)	0.0	0.0	Uterus Cancer GENPAK 064011	4.2	0.0
83237 CC Gr.2 ascend colon (ODO3921)	0.0	0.0	Normal Thyroid Clontech A+ 6570-1**	0.0	0.0
83238 CC NAT (ODO3921)	0.0	0.0	Thyroid Cancer GENPAK 064010	0.0	0.0
83241 CC from Partial Hepatectomy (ODO4309)	0.0	0.0	Thyroid Cancer INVITROGEN A302152	3.3	1.3
83242 Liver NAT (ODO4309)	27.0	3.0	Thyroid NAT INVITROGEN A302153	0.0	0.0
87472 Colon mets to lung (OD04451-01)	0.0	0.0	Normal Breast GENPAK 061019	3.8	2.9
87473 Lung NAT (OD04451-02)	0.0	0.0	84877 Breast Cancer (OD04566)	42.6	56.6
Normal Prostate Clontech A+ 6546-1	0.0	0.0	85975 Breast Cancer (OD04590-01)	7.6	6.0
84140 Prostate Cancer (OD04410)	5.6	5.8	85976 Breast Cancer Mets (OD04590-03)	39.2	38.4
84141 Prostate NAT (OD04410)	0.0	0.0	87070 Breast Cancer Metastasis (OD04655-05)	35.4	45.7
87073 Prostate Cancer (OD04720-01)	100.0	100.0	GENPAK Breast Cancer 064006	50.7	55.1
87074 Prostate NAT (OD04720-02)	0.6	0.0	Breast Cancer Clontech 9100266	46.0	28.5
Normal Lung GENPAK 061010	0.0	0.0	Breast NAT Clontech 9100265	2.1	0.0
83239 Lung Met to Muscle (ODO4286)	0.0	0.0	Breast Cancer INVITROGEN A209073	8.5	0.0
83240 Muscle NAT (ODO4286)	0.4	0.0	Breast NAT INVITROGEN A2090734	4.2	1.3
84136 Lung Malignant Cancer (OD03126)	1.2	0.0	Normal Liver GENPAK 061009	0.6	0.0
84137 Lung NAT (OD03126)	0.0	0.0	Liver Cancer GENPAK 064003	0.0	0.0
84871 Lung Cancer (OD04404)	1.7	0.0	Liver Cancer Research Genetics RNA 1025	0.5	0.0
84872 Lung NAT (OD04404)	0.0	0.0	Liver Cancer Research Genetics RNA 1026	0.0	0.0
84875 Lung Cancer (OD04565)	0.0	0.4	Paired Liver Cancer Tissue Research Genetics RNA 6004-T	0.0	0.0
85950 Lung Cancer (OD04237-01)	0.0	0.0	Paired Liver Tissue Research Genetics RNA 6004-N	0.0	0.0
85970 Lung NAT (OD04237-02)	0.0	0.0	Paired Liver Cancer Tissue Research Genetics RNA 6005-T	0.9	0.0
83255 Ocular Mel Met to Liver (ODO4310)	1.6	0.8	Paired Liver Tissue Research Genetics RNA 6005-N	2.7	0.0
83256 Liver NAT (ODO4310)	48.6	1.8	Normal Bladder GENPAK 061001	1.4	0.0
84139 Melanoma Mets to Lung (OD04321)	0.0	0.0	Bladder Cancer Research Genetics RNA 1023	0.0	0.0
84138 Lung NAT (OD04321)	0.0	0.0	Bladder Cancer INVITROGEN A302173	0.0	0.0

Normal Kidney GENPAK 061008	0.0	0.0	87071 Bladder Cancer (OD04718-01)	6.0 1.0
83786 Kidney Ca, Nuclear grade 2 (OD04338)	0.0	0.0	87072 Bladder Normal Adjacent (OD04718-03)	2.7 0.0

Tissue_Name/Run_Name	Relative 21m723t	Expr. % 21m819t	Tissue_Name/Run_Name	Relative 21m723t	Expr. % 21m819t
83787 Kidney NAT (OD04338)	0.0	0.0	Normal Ovary Res. Gen.	6.5	0.0
83788 Kidney Ca Nuclear grade 1/2 (OD04339)	0.0	0.0	Ovarian Cancer GENPAK 064008	0.0	0.0
83789 Kidney NAT (OD04339)	0.9	0.6	87492 Ovary Cancer (OD04768-07)	25.9	11.7
83790 Kidney Ca, Clear cell type (OD04340)	0.0	0.0	87493 Ovary NAT (OD04768-08)	0.0	0.0
83791 Kidney NAT (OD04340)	0.0	0.0	Normal Stomach GENPAK 061017	0.0	0.0
83792 Kidney Ca, Nuclear grade 3 (OD04348)	0.0	0.0	NAT Stomach Clontech 9060359	0.0	0.0
83793 Kidney NAT (OD04348)	0.0	0.0	Gastric Cancer Clontech 9060395	20.7	27.9
87474 Kidney Cancer (OD04622-01)	0.0	0.0	NAT Stomach Clontech 9060394	1.7	0.0
87475 Kidney NAT (OD04622-03)	0.0	0.0	Gastric Cancer Clontech 9060397	0.0	0.0
85973 Kidney Cancer (OD04450-01)	0.0	0.0	NAT Stomach Clontech 9060396	0.0	0.0
85974 Kidney NAT (OD04450-03)	0.0	0.0	Gastric Cancer GENPAK 064005	0.0	0.0
Kidney Cancer Clontech 8120607	0.0				

The results in Tables 13 and 14 demonstrate that clone NOV2 is highly expressed in certain tumors, especially prostate cancer metastasis, but not in corresponding normal cell lines (Table 13), and that this clone is highly expressed in many surgical tumor samples, especially prostate cancer, but minimally or not detectably in the immediate normal adjacent tissue. These results indicate that clone NOV2 may be used as a marker for certain cancers, especially prostate cancer.

EXAMPLE 2: Radiation Hybrid Mapping Provides the Chromosomal Location of NOV2 and NOV3

Radiation hybrid mapping using human chromosome markers was carried out for NOV2 and NOV3 in the present invention. The procedure used to obtain these results is analogous to that described in Steen, RG et al. (A High-Density Integrated Genetic Linkage and Radiation Hybrid Map of the Laboratory Rat, Genome Research 1999 (Published Online on May 21, 1999)Vol. 9, AP1-AP8, 1999). A panel of 93 cell clones containing randomized radiation-induced human chromosomal fragments was screened in 96 well plates using PCR primers designed to identify the sought clones in a unique fashion. Table 15 provides the results obtained for two of the three clones of the present invention, showing the markers straddling the gene of the invention, and the distance in cR separating them.

Table15

Clone	Chromosome	Distance from Marker, cR
NOV2	1	AFMA129ZB5, 0.0
NOV3	11	D11S913, 5.5
NOV3	11	WI-1409, 4.7

Example 3. Molecular Cloning of NOV2

The open reading frame of clone NOV2 codes for a Type I membrane protein with a transmembrane domain, predicted by PSORT, to be between residues 540-566. In addition, SIGNALP predicts that a signal peptidase cleavage site occurs between residues 27 and 28.

Accordingly the mature form of the predicted extracellular domain of clone NOV2 was targeted for cloning, from residue 28 to 538. Oligonucleotide primers were designed to PCR amplify a DNA segment coding for this mature domain of NOV2. The forward primer includes an in frame BamHJ site. The reverse primer contains an in frame XhoI restriction site. The sequences of the primers are the following:

NOV2 Forward: GGATCCGCGCGCGGCGAAGTGAATTTGCTGG (SEQ ID NO:14) and

NOV2 Reverse: CTCGAGGGTCCTGGTGTCATAGCGGGGCC (SEQ ID NO:15).

PCR reactions were set up using 5 ng human hypothalamus cDNA as a template, 1 microM of each of the NOV2 Forward and NOV2 Reverse primers, 5 micromoles dNTP (Clontech Laboratories, Palo Alto CA) and 1 microliter of 50xAdvantage-HF 2 polymerase (Clontech Laboratories, Palo Alto CA) in 50 microliter volume. The following reaction conditions were used:

a) 96°C 3 minutes
b) 96°C 30 seconds denaturation
c) 70°C 30 seconds, primer annealing. This temperature was gradually decreased by 1°C/cycle
d) 72°C 3 minutes extension.
Repeat steps b-d 10 times
e) 96°C 30 seconds denaturation
f) 60°C 30 seconds annealing
g) 72°C 3 minutes extension
Repeat steps e-g 25 times
h) 72°C 5 minutes final extension

A single amplified product having a size of approximately 1500 bp was detected by agarose gel electrophoresis. The product was isolated and ligated into the pCR2.1 vector (Invitrogen Corp, Carlsbad CA).

The construct was sequenced using the following gene-specific primers:

NOV2 S1: TACCTGGAGTCGGACCGC (SEQ ID NO:16),
NOV2 S2: GCGGTCCGACTCCAGGTA (SEQ ID NO:17),
NOV2 S3: CAGTGCGTGCGGCACTCAG (SEQ ID NO:18),
NOV2 S4: TGAGTGCCGCACGCACTGG (SEQ ID NO:19),
NOV2 S5: CTGGACCCAGGTGGCCGC (SEQ ID NO:20),
NOV2 S6: GCGGCCACCTGGGTCCAG (SEQ ID NO:21),
NOV2 S7: CCCGAGCAGCCGAACGGC (SEQ ID NO:22), and
NOV2 S8: GCCGTTCGGCTGCTCGGG (SEQ ID NO:23).

The cloned insert was verified to be 100% identical to the nucleotide sequence of clone NOV2 (SEQ ID NO:4) from residues 28 to 538. The construct is called pCR2.1-cgNOV2-S340-1C.

Example 4. Molecular Cloning of NOV3.

The open reading frame of clone NOV3 codes for a Type I membrane protein with a transmembrane domain, predicted by PSORT, between residues 547-580. SIGNALP predicted the signal peptidase cleavage site between residues 51 and 52. For these reasons the mature form of the extracellular domain was targeted for cloning, from residues 52 to 546. Oligonucleotide primers were designed to PCR amplify a DNA segment coding for this mature extracellular domain. The forward primer includes an in frame BamHI site. The reverse primer contains an in frame XhoI restriction site. The sequences of the primers are the following:

NOV3Forw: GGATCCACCACCTGCCCCTCGGTGTGC (SEQ ID NO:24) and
NOV3Rev: CTCGAGGCCAGCGTTCTGCTCCTGGTTGAGTGTGG (SEQ ID NO:25).

PCR reactions were set up using 5 ng human fetal brain cDNA template, 1 microM of each of the NOV3Forw and NOV3Rev primers, 5 micromoles dNTP (Clontech Laboratories, Palo Alto CA) and 1 microliter of 50xAdvantage-HF 2 polymerase (Clontech Laboratories, Palo Alto CA) in 50 microliter volume. The reaction conditions used were the same as described in Example A.

A single amplified product having a size of approximately 1500 bp was detected by agarose gel electrophoresis. The product was isolated and ligated into the pCR2.1 vector (Invitrogen Corp, Carlsbad CA).

The construct was sequenced using the following gene-specific primers:

NOV3S1: CGCACCATTGCCAGGGAC (SEQ ID NO:26),
NOV3S2: GTCCCTGGCAATGGTGCG (SEQ ID NO:27),
NOV3S3: CTGGTGCCGCAATTCGCTGGCC (SEQ ID NO:28),
NOV3S4: GGCCAGCGAATTGCGCACCAG (SEQ ID NO:29),
NOV3S5: CACGCCTCTGCCACCACG (SEQ ID NO:30), and
NOV3S6; CGTGGTGGCAGAGGCGTG (SEQ ID NO:31).

The cloned insert was verified as being 100% identical to clone NOV3 (SEQ ID NO:6) from residues 52 to 546. The construct is called pCR2.1-cgNOV3-S331-3A.

Example 5. Preparation of mammalian expression vector pCEP4/Sec

The oligonucleotide primers,

pSec-V5-His Forward: CTCGTCCTCGAGGGTAAGCCTATCCCTAAC
(SEQ ID NO:32) and
pSec-V5-His Reverse: CTCGTCGGGCCCCTGATCAGCGGGTTTAAAC
(SEQ ID NO:33),

were designed to amplify a fragment from the pcDNA3.1-V5His (Invitrogen, Carlsbad, CA) expression vector that includes V5 and His6. The PCR product was digested with XhoI and ApaI and ligated into the XhoI/ApaI digested pSecTag2 B vector harboring an Ig kappa leader sequence (Invitrogen, Carlsbad CA). The correct structure of the resulting vector, pSecV5His, including an in-frame Ig-kappa leader and V5-His6 was verified by DNA sequence analysis. The vector pSecV5His was digested with PmeI and NheI to provide a fragment retaining the above elements in the correct frame. The PmeI-NheI fragment was ligated into the

BamHI/Klenow and NheI treated vector pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA). The resulting vector was named pCEP4/Sec and includes an in-frame Ig kappa leader, a site for insertion of a clone of interest, V5 and His6 under control of the PCMV and/or the PT7 promoter. pCEP4/Sec is an expression vector that allows heterologous protein expression and secretion by fusing any protein to the Ig Kappa chain signal peptide. Detection and purification of the expressed protein are aided by the presence of the V5 epitope tag and 6xHis tag at the C-terminus (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Example 6. Expression of NOV2 in human embryonic kidney (HEK) 293 cells.

The BamHI-XhoI fragment containing the NOV2 sequence was isolated from pCR2.1-cgNOV2-S340-1C (Example 3) and subcloned into the vector pCEP4/Sec (Example 5) to generate expression vector pCEP4/Sec-NOV2. The pCEP4/Sec-NOV2 vector was transfected into HEK293 cells using the LipofectaminePlus reagent following the manufacturer's instructions (Gibco/BRL/Life Technologies, Rockville, MD). The cell pellet and supernatant were harvested 72 hours after transfection and examined for NOV2 expression by Western blotting, after SDS-PAGE run under reducing conditions, with an anti-V5 antibody. Fig. 1 shows that NOV2 is highly expressed in the supernatant medium as a polypeptide having an apparent molecular weight of approximately 64 kDa protein that is secreted by the transfected 293 cells. The molecular weight standard used was SeeBlue Marker (Invitrogen, Carlsbad, CA). This result is in reasonable agreement with the predicted molecular weight of 56842.5 Da. The program PROSITE predicts that there are three N-glycosylation sites in this polypeptide. Glycosylation of the polypeptide expressed in the transfected cells may be responsible for the difference between the predicted and observed molecular weights.

Example 7. Expression of NOV3 in human embryonic kidney 293 cells.

The BamHI-XhoI fragment containing the NOV3 sequence was isolated from pCR2.1-cgNOV3-S331-3A (Example 4) and subcloned into the vector pCEP4/Sec (Example 5) to generate expression vector pCEP4/Sec-NOV3. The pCEP4/Sec-NOV3 vector was transfected into HEK293 cells using the LipofectaminePlus reagent following the manufacturer's instructions (Gibco/BRL/Life Technologies). The cell pellet and supernatant were harvested 72 hours after transfection and examined for NOV3 expression by Western blotting, after SDS-PAGE run under reducing conditions, with an anti-V5 antibody. Fig. 2 shows that NOV3 is highly expressed in the supernatant as a polypeptide with an apparent molecular weight of approximately 70 kDa, secreted by the transfected 293 cells. The molecular weight standard

used was SeeBlue Marker (Invitrogen, Carlsbad, CA). This result is in reasonable agreement with the predicted molecular weight of 54572.3 Da. The program PROSITE predicts that there are three N-glycosylation sites in this polypeptide. Glycosylation of the polypeptide produced in the transfected cells may be responsible for the difference in the molecular weights. The program PROSITE predicts that there are two N-glycosylation sites in this polypeptide. Glycosylation of the polypeptide expressed in the transfected cells may be responsible for the difference between the predicted and observed molecular weights.

Other Embodiments

It is to be understood that while the invention has been described in conjunction with the detailed description thereof, the foregoing description is intended to illustrate and not limit the scope of the invention, which is defined by the scope of the appended claims. Other aspects, advantages, and modifications are within the scope of the following claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) a mature form of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 5, and 7;

(b) a variant of a mature form of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 5, and 7, wherein one or more amino acid residues in said variant differs from the amino acid sequence of said mature form, provided that said variant differs in no more than 15% of the amino acid residues from the amino acid sequence of said mature form;

(c) an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 5, and 7; and

(d) a variant of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 5, and 7, wherein one or more amino acid residues in said variant differs from the amino acid sequence of said mature form, provided that said variant differs in no more than 15% of amino acid residues from said amino acid sequence.

2. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence of a naturally-occurring allelic variant of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 5, and 7.

3. The polypeptide of claim 2, wherein said allelic variant comprises an amino acid sequence that is the translation of a nucleic acid sequence differing by a single nucleotide from a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, 4, and 6.

4. The polypeptide of claim 1, wherein the amino acid sequence of said variant comprises a conservative amino acid substitution.

5. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) a mature form of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 5, and 7;

(b) a variant of a mature form of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 5, and 7, wherein one or more amino acid residues in said variant differs from the amino acid sequence of said mature form, provided that said variant differs in no more than 15% of the amino acid residues from the amino acid sequence of said mature form;

(c) an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 5, and 7;

(d) a variant of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 5, and 7, wherein one or more amino acid residues in said variant differs from the amino acid sequence of said mature form, provided that said variant differs in no more than 15% of amino acid residues from said amino acid sequence;

(e) a nucleic acid fragment encoding at least a portion of a polypeptide comprising an amino acid sequence chosen from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 5, and 7, or a variant of said polypeptide, wherein one or more amino acid residues in said variant differs from the amino acid sequence of said mature form, provided that said variant differs in no more than 15% of amino acid residues from said amino acid sequence; and

(f) a nucleic acid molecule comprising the complement of (a), (b), (c), (d) or (e).

6. The nucleic acid molecule of claim 5, wherein the nucleic acid molecule comprises the nucleotide sequence of a naturally-occurring allelic nucleic acid variant.

7. The nucleic acid molecule of claim 5, wherein the nucleic acid molecule encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of a naturally-occurring polypeptide variant.

8. The nucleic acid molecule of claim 5, wherein the nucleic acid molecule differs by a single nucleotide from a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, 4, and 6.

9. The nucleic acid molecule of claim 5, wherein said nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of

(a) a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, 4, and 6;

(b) a nucleotide sequence differing by one or more nucleotides from a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, 4, and 6, provided that no more than 20% of the nucleotides differ from said nucleotide sequence;

(c) a nucleic acid fragment of (a); and

(d) a nucleic acid fragment of (b).

10. The nucleic acid molecule of claim 5, wherein said nucleic acid molecule hybridizes under stringent conditions to a nucleotide sequence chosen from the group consisting of SEQ ID NO: 1, 4, and 6, or a complement of said nucleotide sequence.

11. The nucleic acid molecule of claim 5, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of

(a) a first nucleotide sequence comprising a coding sequence differing by one or more nucleotide sequences from a coding sequence encoding said amino acid sequence, provided that no more than 20% of the nucleotides in the coding sequence in said first nucleotide sequence differ from said coding sequence;

(b) an isolated second polynucleotide that is a complement of the first polynucleotide; and

(c) a nucleic acid fragment of (a) or (b).

12. A vector comprising the nucleic acid molecule of claim 11.

13. The vector of claim 12, further comprising a promoter operably-linked to said nucleic acid molecule.

14. A cell comprising the vector of claim 12.

15. An antibody that immunospecifically-binds to the polypeptide of claim 1.

16. The antibody of claim 15, wherein said antibody is a monoclonal antibody.

17. The antibody of claim 15, wherein the antibody is a humanized antibody.

18. A method for determining the presence or amount of the polypeptide of claim 1 in a sample, the method comprising:

(a) providing the sample;

(b) contacting the sample with an antibody that binds immunospecifically to the polypeptide; and

(c) determining the presence or amount of antibody bound to said polypeptide,

thereby determining the presence or amount of polypeptide in said sample.

19. A method for determining the presence or amount of the nucleic acid molecule of claim 5 in a sample, the method comprising:

(a) providing the sample;

(b) contacting the sample with a probe that binds to said nucleic acid molecule; and

(c) determining the presence or amount of the probe bound to said nucleic acid molecule,

thereby determining the presence or amount of the nucleic acid molecule in said sample.

20. The method of claim19 wherein the nucleic acid comprises SEQ ID NO:1 or variants thereof and the sample is chosen from the group consisting of postmeotic hapolid speratids, developing or embryonic tissues, tumor cells, or T cell types.

21. The method of claim 19 wherein the nucleic acid comprises SEQ ID NO:4 or variants thereof and the sample is chosen from the group consisting of cells that express GPI-anchored ephrin-A ligands or mimics thereof.

22. The method of claim 19 wherein the nucleic acid comprises SEQ ID NO:6 or variants thereof and the sample is chosen from the group consisting of tissue from brain or kidney.

23. A method of identifying an agent that binds to a polypeptide of claim 1, the method comprising:

(a) contacting said polypeptide with said agent; and

(b) determining whether said agent binds to said polypeptide.

24. The method of claim 23 wherein the polypeptide comprises SEQ ID NO:2 or variants thereof and the agent is a compound that can modulate actin polymerization or the formation and stability of actin complexes with SEQ ID NO:2 or variants thereof.

25. A method for identifying an agent that modulates the expression or activity of the polypeptide of claim 1, the method comprising:

(a) providing a cell expressing said polypeptide;

(b) contacting the cell with said agent; and

(c) determining whether the agent modulates expression or activity of said polypeptide,

whereby an alteration in expression or activity of said peptide indicates said agent modulates expression or activity of said polypeptide.

26. A method for modulating the activity of the polypeptide of claim 1, the method comprising contacting a cell sample expressing the polypeptide of said claim with a compound that binds to said polypeptide in an amount sufficient to modulate the activity of the polypeptide.

27. A method of treating or preventing a NOV-associated disorder, said method comprising administering to a subject in which such treatment or prevention is desired the polypeptide of claim 1 in an amount sufficient to treat or prevent said NOV-associated disorder in said subject.

28. The method of claim 27, wherein said subject is a human.

29. A method of treating or preventing a NOV-associated disorder, said method comprising administering to a subject in which such treatment or prevention is desired the nucleic acid of claim 5 in an amount sufficient to treat or prevent said NOV-associated disorder in said subject.

30. The method of claim 29, wherein said subject is a human.

31. A method of treating or preventing a NOV-associated disorder, said method comprising administering to a subject in which such treatment or prevention is desired the antibody of claim 15 in an amount sufficient to treat or prevent said NOV-associated disorder in said subject.

32. The method of claim 15, wherein the subject is a human.

33. A pharmaceutical composition comprising the polypeptide of claim 1 and a pharmaceutically-acceptable carrier.

34. A pharmaceutical composition comprising the nucleic acid molecule of claim 5 and a pharmaceutically-acceptable carrier.

35. A pharmaceutical composition comprising the antibody of claim 15 and a pharmaceutically-acceptable carrier.

36. A kit comprising in one or more containers, the pharmaceutical composition of claim 33.

37. A kit comprising in one or more containers, the pharmaceutical composition of claim 34.

38. A kit comprising in one or more containers, the pharmaceutical composition of claim 35.

39. The use of a therapeutic in the manufacture of a medicament for treating a syndrome associated with a human disease, the disease selected from a NOV-associated disorder, wherein said therapeutic is selected from the group consisting of a NOV polypeptide, a NOV nucleic acid, and a NOV antibody.

40. A method for screening for a modulator of activity or of latency or predisposition to a NOV-associated disorder, said method comprising:

(a) administering a test compound to a test animal at increased risk for a NOV-associated disorder, wherein said test animal recombinantly expresses the polypeptide of claim 1;

(b) measuring the activity of said polypeptide in said test animal after administering the compound of step (a);

(c) comparing the activity of said protein in said test animal with the activity of said polypeptide in a control animal not administered said polypeptide, wherein a change in the activity of said polypeptide in said test animal relative to said control animal indicates the test compound is a modulator of latency of or predisposition to a NOV-associated disorder.

41. The method of claim 40, wherein said test animal is a recombinant test animal that expresses a test protein transgene or expresses said transgene under the control of a promoter at an increased level relative to a wild-type test animal, and wherein said promoter is not the native gene promoter of said transgene.

42. A method for determining the presence of or predisposition to a disease associated with

altered levels of the polypeptide of claim 1 in a first mammalian subject, the method comprising:

(a) measuring the level of expression of the polypeptide in a sample from the first mammalian subject; and

(b) comparing the amount of said polypeptide in the sample of step (a) to the amount of the polypeptide present in a control sample from a second mammalian subject known not to have, or not to be predisposed to, said disease,

wherein an alteration in the expression level of the polypeptide in the first subject as compared to the control sample indicates the presence of or predisposition to said disease.

43. A method for determining the presence of or predisposition to a disease associated with altered levels of the nucleic acid molecule of claim 5 in a first mammalian subject, the method comprising:

(a) measuring the amount of the nucleic acid in a sample from the first mammalian subject; and

(b) comparing the amount of said nucleic acid in the sample of step (a) to the amount of the nucleic acid present in a control sample from a second mammalian subject known not to have or not be predisposed to, the disease;

wherein an alteration in the level of the nucleic acid in the first subject as compared to the control sample indicates the presence of or predisposition to the disease.

44. The method of claim 43 wherein the disease is a type of cancer.

45. The method of claim 45 wherein the altered level of SEQ ID NO: 1 or a variant thereof is used to determine the presence of or predisposition to lung cancer.

46. The method of claim 44 wherein the altered level of SEQ ID NO: 4 or a variant thereof is used to determine the presence of or predisposition to prostate cancer.

47. A method of treating a pathological state in a mammal, the method comprising administering to the mammal a polypeptide in an amount that is sufficient to alleviate the pathological state, wherein the polypeptide is a polypeptide having an amino acid sequence at least 95% identical to a polypeptide comprising an amino acid sequence of at least one of SEQ ID NO: 2, 5, and 7, or a biologically active fragment thereof.

48. A method of treating a pathological state in a mammal, the method comprising administering to the mammal the antibody of claim 15 in an amount sufficient to alleviate the pathological state.

Fig. 1

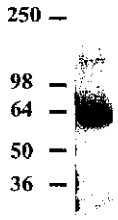
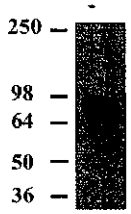


Fig. 2



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
26 April 2001 (26.04.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/29217 A3

(51) International Patent Classification⁷: C12N 15/12, 15/16, C07K 14/575, 14/705, 14/47, G01N 33/68, C12Q 1/68, C07K 16/18, 16/26, 16/28, C12N 5/10, A61K 31/7088, 38/17, 38/22, 39/395, 48/00

(21) International Application Number: PCT/US00/28474

(22) International Filing Date: 13 October 2000 (13.10.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/159,805	15 October 1999 (15.10.1999)	US
60/159,992	18 October 1999 (18.10.1999)	US
60/160,952	22 October 1999 (22.10.1999)	US
Not furnished	12 October 2000 (12.10.2000)	US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:

US	60/159,805 (CIP)
Filed on	15 October 1999 (15.10.1999)
US	60/159,992 (CIP)
Filed on	18 October 1999 (18.10.1999)
US	60/160,952 (CIP)
Filed on	22 October 1999 (22.10.1999)
US	Not furnished (CIP)
Filed on	12 October 2000 (12.10.2000)

(71) Applicant (*for all designated States except US*): CURAGEN CORPORATION [US/US]; 555 Long Wharf Drive, 11th floor, New Haven, CT 06511 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): PRAYAGA, Sudhirdas, K. [IN/US]; 140 Mill Street, Apt. 18-136, East Haven, CT 06512 (US). TAUPIER, Raymond, J., Jr. [US/US]; 407 Holmes Street, East Haven, CT 06512 (US). BANDARU, Raj [IN/US]; 3C 107 College Street, New Haven, CT 06511 (US).

(74) Agent: ELRIFI, Ivor, R.; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky, and Popeo, P.C., One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

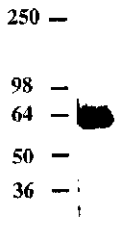
Published:
with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
10 January 2002

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

(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDES AND POLYNUCLEOTIDES ENCODING SAME

(57) Abstract: Disclosed herein are novel human nucleic acid sequences. Also disclosed are polypeptides encoded by these nucleic acid sequences, and antibodies which immunospecifically-bind to the polypeptide, as well as derivatives, variants, mutants, or fragments of the aforementioned polypeptide, polynucleotide, or antibody. The invention further discloses therapeutic, diagnostic and research methods for diagnosis, treatment, and prevention of disorders involving these novel nucleic acids and proteins.



WO 01/29217 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/28474

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/12 C12N15/16 C07K14/575 C07K14/705 C07K14/47
G01N33/68 C12Q1/68 C07K16/18 C07K16/26 C07K16/28
C12N5/10 A61K31/7088 A61K38/17 A61K38/22 A61K39/395
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C07K G01N C12Q 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)
EMBL, STRAND, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! accession: Z93023, 19 March 1997 (1997-03-19) WRAY P: "Homo sapiens DNA sequence from PAC 95883 on chromosome Xp22.11-Xp22.22. Contains ESTs STS and CpG island" XP002163902 ---	5-14,34, 37
X	DATABASE EMBL 'Online! accession: AA758513, 26 January 1998 (1998-01-26) NCI-CGAP: "ah66c02.s1 Soares_testis_NHT Homo sapiens cDNA clone 1320578 3' similar to gb:S54005 THYMOSIN BETA-10 (HUMAN);, mRNA sequence." XP002163903 ---	1-17, 33-38

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw 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.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 June 2001	05.07.01

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
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	Devijver, K

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/28474

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K48/00

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)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 47674 A (CORIXA CORP) 23 September 1999 (1999-09-23) SEQ ID NO:83 page 1 -page 32; claims 1-58; examples 1-4 --- -/--	5-14,19, 20,29, 30,34, 37,39, 43-45,47

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw 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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 June 2001	

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
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	Devijver, K

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No
PCT/US 00/28474

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! accession: AL035703, 12 March 1999 (1999-03-12) WILSON S : "Human DNA sequence from clone RP1-61A9 on chromosome 1p35.2-36.13 Contains part of the EPHB2 gene for tyrosine-protein kinase, the gene KIAA0478 for a C2H2 type zinc finger gene, ESTs, STSs, GSSs and three putative CpG Islands." XP002169952 ---	1-17, 33-38
X	DATABASE EMBL 'Online! accession: U72207, 25 December 1996 (1996-12-25) PARK S: "Mus musculus Eph-and Elk-related kinase (eek) mRNA, complete cds." XP002169953 -& PARK SOOCHUL ET AL: "The Eek receptor, a member of the Eph family of tyrosine protein kinases, can be activated by three different Eph family ligands." ONCOGENE, vol. 14, no. 5, 1997, pages 533-542, XP001009718 ---	1-17, 33-38
P,X	DATABASE EMBL 'Online! accession: AB040892, 23 May 2000 (2000-05-23) OHARA O ET AL: "Homo sapiens mRNA KIAA1459 protein, partial cds." XP002169954 -& NAGASE T ET AL: "PREDICTION OF THE CODING SEQUENCES OF UNIDENTIFIED HUMAN GENES. XVII. THE COMPLETE SEQUENCES OF 100 NEW SDNA CLONES FROM BRAIN WHICH CODE FOR LARGE PROTEINS IN VITRO" DNA RESEARCH,UNIVERSAL ACADEMY PRESS,JP, vol. 7, pages 143-150, XP000983090 ---	1-17, 33-38
X	DATABASE EMBL 'Online! accession: AF007139, 9 February 1998 (1998-02-09) ANDERSSON B ET AL: "Homo sapiens clone 23898 unknown mRNA, partial cds." XP002169955 --- -/--	1-17, 33-38

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/28474

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DATABASE EMBL 'Online! accession: AF169675, 31 January 2000 (2000-01-31) LACY S E ET AL: "Homo sapiens leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT1 (FLRT1) mRNA, complete cds." XP002169966 -& LACY SUSAN E ET AL: "Identification of FLRT1, FLRT2, and FLRT3: A novel family of transmembrane leucine-rich repeat proteins." GENOMICS, vol. 62, no. 3, 15 December 1999 (1999-12-15), pages 417-426, XP002169951	1-17, 33-38
P,X	DATABASE EMBL 'Online! accession: AP000597, 15 October 1999 (1999-10-15) HATTORI M ET AL: "Homo sapiens genomic DNA, chromosome 11q13 clone:RP11-45M18, WORKING DRAFT SEQUENCE, 14 unordered pieces. " XP002169957	5-14,34, 37
A	WETERMAN M A J ET AL: "THYMOSIN BETA-10 EXPRESSION IN MELANOMA CELL LINES AND MELANOCYTIC LESIONS: A NEW PROGRESSION MARKER FOR HUMAN CUTANEOUS MELANOMA" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER,US,NEW YORK, NY, vol. 53, no. 2, 21 January 1993 (1993-01-21), pages 278-284, XP002041675 ISSN: 0020-7136	
A	TUERECI OE ET AL: "HUMAN CARBONIC ANHYDRASE XII: CDNA CLONING,EXPRESSION, AND CHROMOSOMAL LOCALIZATION OF A CARBONIC ANHYDRASE GENE THAT IS OVEREXPRESSED IN SOME RENAL CELL CANCERS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON,US, vol. 95, no. 13, 23 June 1998 (1998-06-23), pages 7608-7613, XP000941354 ISSN: 0027-8424	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/28474

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 27-32,47,48 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [X] Claims Nos.: in part: 26
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [X] 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.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[X] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

International Application No. PCT/US 00 28474

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention 1:
Claims: in part 1-19,23,25-44,47,48 (all as far as applicable); completely: 20,24,45

Polynucleotide and polypeptide relating to SEQ ID NOs 1 and 2, and variants and fragments thereof. Expression vector and host cells comprising such a polynucleotide. Antibody specifically binding with such a polypeptide. Method for detecting such a polynucleotide or such a polypeptide. Method for identifying an agent that binds to such a polypeptide or modulates the expression or activity of such a polypeptide. Method for treating or preventing a disorder by using such a polynucleotide, polypeptide or antibody. Pharmaceutical composition comprising such a polynucleotide, polypeptide or antibody. Kit comprising such a composition. Use of a therapeutic in the manufacture of a medicament for treating a syndrome associated with a disease.

Invention 2:
Claims: in part 1-19,23,25-44,47,48 (all as far as applicable); completely: 21,46

As invention 1, but limited to subject-matter relating to SEQ ID NOs 4 and 5.

Invention 3
Claims: in part 1-19,23,25-44,47,48 (all as far as applicable); completely: 22

As invention 1, but limited to subject-matter relating to SEQ ID NOs 6 and 7.

International Application No. PCT/US 00/28474

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: in part: 26

Claim 26 refers to 'a method for modulating the activity of the polypeptide of claim 1, the method comprising contacting a cell sample expressing the polypeptide of said claim with a compound that binds to said polypeptide in an amount sufficient to modulate the activity of the polypeptide', without giving a true technical characterization of this compound. The claim covers all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds, namely antibodies which immunospecifically bind to the polypeptide of claim 1. In consequence, the scope of said claim is ambiguous and vague, and its subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (Art. 5 and 6 PCT).
An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved.
This lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claim which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to antibodies which immunospecifically bind to the polypeptide of claim 1.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/28474

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9947674 A	23-09-1999	US 6210883 B	03-04-2001
		AU 3094999 A	11-10-1999
		BR 9908823 A	21-11-2000
		EP 1064372 A	03-01-2001
		NO 20004631 A	15-11-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 7/02	Ａ６１Ｐ 7/02		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ 7/06	Ａ６１Ｐ 7/06		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ 9/00	Ａ６１Ｐ 9/00		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 15/08	Ａ６１Ｐ 15/08		
Ａ６１Ｐ 19/02	Ａ６１Ｐ 19/02		
Ａ６１Ｐ 21/00	Ａ６１Ｐ 21/00		
Ａ６１Ｐ 25/00	Ａ６１Ｐ 25/00		
Ａ６１Ｐ 29/00	Ａ６１Ｐ 29/00	１０１	
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ａ６１Ｐ 37/00	Ａ６１Ｐ 37/00		
Ａ６１Ｐ 43/00	Ａ６１Ｐ 43/00	１０５	
Ｃ０７Ｋ 14/47	Ｃ０７Ｋ 14/47		
Ｃ０７Ｋ 16/18	Ｃ０７Ｋ 16/18		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｑ 1/68	Ａ	
Ｃ１２Ｑ 1/68	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｍ	
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｇ０１Ｎ 33/566		
Ｇ０１Ｎ 33/577	Ｇ０１Ｎ 33/577	Ｂ	
// Ｃ１２Ｐ 21/08	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
	Ａ６１Ｋ 37/02		
	Ｃ１２Ｐ 21/08		

(31)優先権主張番号 09/689,486
(32)優先日 平成12年10月12日(2000.10.12)
(33)優先権主張国 米国(US)

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

(72)発明者 プラヤーガ, スーディルダス ケイ.
アメリカ合衆国 コネチカット ０６５１２, イースト ヘイブン, ミル ストリート １４０, アパートメント １８－１３６
(72)発明者 トーピアー, レイモンド ジェイ. ジュニア
アメリカ合衆国 コネチカット ０６５１２, イースト ヘイブン, ホルメス ストリート, ４０７
(72)発明者 バンダル, ラジ
アメリカ合衆国 コネチカット ０６５１１, ニュー ヘイブン, コテージ ストリート １０７ ３Ｃ

Ｆターム(参考) 2G045 AA25 AA29 AA40 BB20 CA25 CA26 CB01 CB17 CB21 DA12

	DA13	DA14	DA36	DA77	FB02	FB03	FB04	FB07		
4B024	AA01	AA12	BA21	BA63	BA80	CA04	DA02	EA04	GA11	HA12
4B063	QA01	QA18	QA19	QQ42	QR55	QR62	QS25	QS34		
4B064	AG02	AG20	AG27	CA10	CA19	CC24	DA01	DA14		
4B065	AA93X	AA93Y	AB01	AC14	BA02	CA24	CA44	CA46		
4C084	AA02	AA06	AA07	AA13	BA01	BA08	BA18	BA21	BA22	CA18
	CA53	NA14	ZA01	ZA36	ZA94	ZA96	ZB02	ZB11	ZB15	ZB26
	ZC41									
4C085	AA13	AA14	BB07	BB11	CC21	CC31	DD62	EE01		
4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	CA40	DA01	DA76	DA86	EA20
	EA51	FA74								

专利名称(译)	新的多肽和编码其的多核苷酸		
公开(公告)号	JP2004500046A	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2001532200	申请日	2000-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	CURAGEN CORP		
申请(专利权)人(译)	Kyurajen公司		
[标]发明人	プラヤーガスーディルダスケイ トーピアーレイモンドジェイジュニア バンダルラジ		
发明人	プラヤーガ, スーディルダス ケイ. トーピアー, レイモンド ジェイ. ジュニア バンダル, ラジ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/06 A61P9/00 A61P15/08 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/575 C07K14/705 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61K48/00 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/06 A61P9/00 A61P15/08 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/4725 C07K14/57581 C07K14/705		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/06 A61P9/00 A61P15/08 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00.105 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/577.B C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB04 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA21 4B024/BA63 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG02 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA14 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA36 4C084/ZA94 4C084/ZA96 4C084/ZB02 4C084/ZB11 4C084/ZB15 4C084/ZB26 4C084/ZC41 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB07 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/CC31 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/159805 1999-10-15 US 60/159992 1999-10-18 US 60/160952 1999-10-22 US 09/689486 2000-10-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开了新的人核酸序列。 还公开了由这些核酸序列编码的多肽，以及与该多肽免疫特异性结合的抗体，以及上述多肽，多核苷酸或抗体的衍生物，变体，突变体或片段。 本发明进一步公开了用于诊断，治疗和预防涉及这些新型核酸和蛋白质的疾病的治疗，诊断和研究方法。